



HAL
open science

Apport du couplage CE-ICP-MS dans l'étude de l'implication du cuivre (II) dans la Maladie d'Alzheimer

Coraline Duroux

► **To cite this version:**

Coraline Duroux. Apport du couplage CE-ICP-MS dans l'étude de l'implication du cuivre (II) dans la Maladie d'Alzheimer. Chimie analytique. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1026 . tel-04020534

HAL Id: tel-04020534

<https://theses.hal.science/tel-04020534>

Submitted on 9 Mar 2023

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.



N°d'ordre NNT :
2022LYSE1026

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N°206
Chimie de Lyon

Spécialité de doctorat : Chimie
Discipline : Chimie Analytique

Soutenue publiquement le 08/03/2022, par :
Coraline Duroux

**Apport du couplage CE-ICP-MS dans l'étude
de l'implication du cuivre (II) dans
la Maladie d'Alzheimer**

Devant le jury composé de :

Mme PERRIN, Catherine

Professeure des Universités, Université de Montpellier

Rapporteure

M. LOBINSKI, Ryszard

Directeur de Recherche CNRS, Pau

Rapporteur

M. MORELL, Christophe

Professeur des Universités, Université Claude Bernard Lyon 1

Examineur

Mme HAGEGE, Agnès

Chargée de Recherche CNRS, Lyon

Directrice de thèse



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Département de Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
UFR - Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR - Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR – Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieur de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : M. Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur provisoire : M. Pierre CHAREYRON

LABORATOIRE D'ACCUEIL

Institut des Sciences Analytiques UMR5280 5 rue de la Doua 69100 Villeurbanne	Directeur : M. Christophe MORELL
---	----------------------------------



UNIVERSITÉ
DE LYON

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements à Mme Catherine Perrin et M. Ryszard Lobinski pour avoir accepté d'être rapporteur(e) de ce travail. Je remercie également Christophe Morell pour avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examineur, mais aussi pour son accueil au sein de l'Institut des Sciences Analytiques.

Je remercie Florence Guillière et François Lux pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse. Vos recommandations et vos conseils m'ont beaucoup aidée.

C'est avec sincérité que je souhaite remercier Agnès Hagège, ma directrice de Thèse, pour m'avoir accompagnée tout au long de ces trois années, dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci pour ton soutien, ta disponibilité et ta bienveillance. Tu es une belle personne et j'ai été ravie de partager ce projet avec toi.

Un énorme merci à l'ensemble de l'équipe TechSep. Merci Vincent, Claire et Jérôme pour votre accueil et votre bonne humeur. J'ai beaucoup apprécié les sorties à la montagne, qui ont contribué à la bonne cohésion de l'équipe. Merci à Lucie, mon compère pendant ces trois années, avec qui j'ai pris plaisir à partager quelques parties de dessin et chanter quelques notes. Je n'oublie pas pour autant Frédéric, Michel, Adrien, François-Xavier, Julie, Nicolas, Andrea et toutes les personnes avec qui j'ai passé d'agréables moments au coin café ou lors des repas. Je souhaite également adresser quelques mots à Huian et Lucile, qui m'ont réservé le plus beau des accueils et qui sont devenus aujourd'hui de réels amis.

Un grand merci à Florence Guillière, Carole Chaix et Carole Farre pour le prêt des appareils et leurs conseils avisés. C'est bon de sentir que l'on peut s'entraider.

Evidemment, je ne pourrai manquer de remercier ma famille, mes amis et l'homme qui partage ma vie. Merci de m'avoir soutenue et d'avoir cru en moi. Je réalise plus que jamais la chance que j'ai de vous avoir à mes côtés. Un merci particulier à mes parents, sans qui je n'aurais pu accomplir ce projet. C'est en toute humilité que j'espère vous avoir rendu fiers.



UNIVERSITÉ
DE LYON

Table des matières

Remerciements.....	V
Table des matières.....	VII
Publications et communications	XI
Abréviations.....	XIII
Symboles et grandeurs	XV
Liste des figures.....	XVII
Liste des tableaux	XXI
Introduction générale.....	1
CHAPITRE I : Bibliographie	5
1. Présentation de la Maladie d'Alzheimer	6
1.1. Historique et chiffres clés.....	6
1.2. Des symptômes aux diagnostics.....	6
1.2.1. Manifestations cliniques.....	6
1.2.2. Rétrécissement du cortex cérébral	7
1.2.3. Peptide amyloïde et protéine Tau : les constituants principaux des lésions cérébrales	8
1.2.4. Un diagnostic tardif	10
2. Peptide amyloïde β : principal biomarqueur de la MA	11
2.1. Formation des peptides A β via l'APP.....	11
2.2. Agrégation du peptide A β	12
3. L'implication du cuivre dans la MA.....	15
3.1. Variations des niveaux de cuivre	15
3.2. Complexation des ions Cu(II) avec le peptide amyloïde β	16
3.2.1. Un site de complexation identifié	16
3.2.2. Une forte affinité	17
3.3. Les conséquences de l'interaction entre A β et Cu(II).....	20
3.3.1. Sur la production d'espèces réactives à l'oxygène.....	20
3.3.2. Sur l'agrégation du peptide amyloïde β	21
3.4. Détection simultanée du peptide amyloïde β et du cuivre	23
3.4.1. Dans le cerveau post-mortem	23
3.4.2. Dans les fluides biologiques	24



4. Conclusion et objectifs	25
CHAPITRE II : Etude d'Aβ-Cu(II) par CE-ICP-MS : une analyse complexe.....	29
1. Le couplage CE-ICP-MS : un outil de choix	30
1.1. La CE : une technique séparative adaptée	30
1.1.1. De la théorie.....	30
1.1.2. ... à la pratique	32
1.2. L'ICP-MS : une détection multi-élémentaire puissante.....	33
1.3. Etude de complexes peptide-métal ou protéine-métal en CE	34
1.3.1. Les avantages.....	34
1.3.2. Le phénomène de dissociation.....	34
2. Mise en place du couplage CE-ICP-MS	36
2.1. Conception expérimentale et interface : les points clés	36
2.2. Performances du couplage	37
2.2.1. Vérification de la dispersion externe due à l'interface	38
2.2.2. Répétabilité	39
3. Les difficultés analytiques liées à l'étude du complexe Aβ-Cu(II) par CE-ICP-MS.....	40
3.1. Le cuivre : un élément difficile à analyser à l'état de traces	40
3.1.1. Etude de la contamination en cuivre.....	40
3.1.2. Etude de la sorption du cuivre.....	43
3.1.2.a) Choix du capillaire	43
3.1.2.b) Sorption sur les parois en verre : influence du liquide additionnel	45
3.1.2.c) Sorption sur les électrodes	46
3.2. L'étude d'un complexe labile : un enjeu en science séparative.....	48
3.2.1. Influence du complexe étudié	48
3.2.2. Influence du tampon de séparation	51
3.2.3. Influence du capillaire	52
4. Performances du couplage CE-ICP-MS pour l'analyse de complexe de cuivre	53
4.1. Répétabilité	53
4.2. Linéarité.....	54
4.3. Limite de quantification.....	55
5. Conclusion du chapitre	56
CHAPITRE III : Détermination de la constante de complexation d'Aβ-Cu(II)	59
1. Etude de complexes métalliques par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE)	60
1.1. Principe de l'ACE.....	60
1.2. Détermination des mobilités électrophorétiques.....	62
1.3. Détermination de la constante de complexation par ACE	64
2. Article 1: Détermination de la constante d'affinité d'Aβ-Cu(II) par CE-ICP-MS	66



3. Conclusion du chapitre	87
CHAPITRE IV : Agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$: le rôle du cuivre	89
1. Etude de l'état d'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$	90
1.1. Séparation des formes par électrophorèse capillaire	90
1.1.1. Identification des différentes formes du peptide $A\beta_{1-42}$	91
1.1.2. Evaluation des performances de la méthode CE-UV.....	94
1.1.2.a) Répétabilité	94
1.1.2.b) Linéarité	95
1.1.2.c) Limite de quantification.....	95
1.2. Mise en solution du peptide $A\beta_{1-42}$	96
1.2.1. Auto-agrégation et variabilité de l'état d'agrégation initiale du peptide $A\beta_{1-42}$	96
1.2.2. Stratégie pour éliminer les formes agrégées	97
1.2.2.a) Utilisation d'agent de solubilisation.....	97
1.2.2.b) Ultrafiltration	100
1.2.3. Détermination de la concentration d'ammoniaque adaptée	102
1.3. Conservation du peptide $A\beta_{1-42}$ après la mise en solution	103
2. Influence des métaux sur l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ en CE-UV.....	105
2.1. Evolution de l'état d'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ sans métal	105
2.2. Influence de Cu(II) et de Zn(II) sur l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ dans des conditions stœchiométriques	107
2.3. Article 2 : Influence de Cu(II) sur l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ dans des conditions sous-stœchiométrique et étude de sa répartition.....	109
3. Conclusion du chapitre	133
Conclusion générale et perspectives.....	135
Annexe 1 : Partie expérimentale.....	141
1. Préparation des capillaires	141
1.1. Immobilisation thermique avec HPC	141
1.2. Recouvrement dynamique avec du polybrène	143
2. Préparation des solutions.....	144
2.1. Le peptide amyloïde	144
2.2. Les tampons.....	144
2.3. Solution diverses.....	145
3. Conditions opératoires	146
3.1. CE-UV	146
3.2. CE-ICP-MS	146
3.3. TDA-UV	147



Annexe 2 : Principe TDA	149
Annexe 3 : Détermination de la mobilité du complexe NTA-Cu(II) par ACE.....	151
Références.....	153
Résumé.....	160
Abstract.....	160

Publications et communications

Publications :

- **Interactions between copper (II) and β -amyloid peptide using capillary electrophoresis–ICP–MS: K_d measurements at the nanogram scale**

C. Duroux, A. Hagège

Analytical and Bioanalytical Chemistry, Accepted: Nov. 2021

doi : 10.1007/s00216-021-03769-8

- **CE-ICP-MS to probe $A\beta_{1-42}$ / copper (II) interactions, a complementary tool to study amyloid aggregation in Alzheimer's Disease**

C. Duroux, A. Hagège

Metalomics, Accepted: Dec. 2021

doi : 10.1093/mtomcs/mfab075

Communications :

- **Poster ITP 2019, Toulouse, 03/09/2019**

“Interactions between metals and peptides involved in neurodegenerative diseases using CE-ICP/MS: K_d measurements at the nanogram scale”

- **Poster MSB 2020, Saint Mallo, 30/09/2020 avec Prix du meilleur poster**

“CE-ICP/MS to probe $A\beta_{1-42}$ /copper interactions, a complementary tool to study Alzheimer's Disease (AD)”

- **Présentation orale SEP 2021, Paris 07/10/2021**

« CE-ICP-MS : un couplage adapté pour étudier l'implication du cuivre dans la maladie d'Alzheimer ? »





UNIVERSITÉ
DE LYON

Abréviations

A

A β	Peptide béta-amyloïde
ACE	Electrophorèse capillaire d'affinité
AFM	Microscope à force atomique
APP	Protéine précurseur de l'amyloïde

C

CE	Electrophorèse capillaire
CE-ICP-MS	CE couplée à l'ICP-MS
CE-UV	CE avec détection UV
CTAB	Cétyltriméthylammonium
Cp	Céruloplasmine

D

D	Coefficient de diffusion moléculaire
Da	Coefficient de Damköhler
DAB	Peroxyde d'hydrogène-diaminobenzidine
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DRX	Diffraction des rayons X

F

Fe	Fer
FET	Fétuine

FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
------	---

H

HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HFIP	Hexafluoroisopropanol
His	Histidine
HNO ₃	Acide nitrique
HPC	Hydroxypropyl cellulose
HPCL	Chromatographie en phase liquide haute performance

I

ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IDA	Acide iminodiacétique
IR	Infrarouge
IRM	Imagerie par résonance magnétique

K

K	Constante de complexation thermodynamique
k	Constante de complexation cinétique

L

L	Ligand
LA	Ablation laser
LCR	Liquide céphalorachidien
LIF	Fluorescence induite par laser



M

M	Métal
MA	Maladie d'Alzheimer
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
Micro-PIXE	Émission de rayons X induite par des protons
ML	Complexe métal-ligand
MS	Spectrométrie de masse
MW _{cutoff}	Molecular Weight cut off

N

NaCl	Chlorure de sodium
NH ₄ OH	Ammoniaque
NTA	Acide nitrilotriacétique

O

OMS	Organisation mondiale de la santé
-----	-----------------------------------

P

P	Pression appliquée
Polybrène	Hexadimethrine bromide
ppb	Partie par billion

R

RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Espèces réactives de l'oxygène

RPE	Résonance paramagnétique électronique
-----	---------------------------------------

S

SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
SXRF	Microsondes à fluorescence X synchrotron

T

TDA	Analyse par Dispersion de Taylor
TEP	Tomographie par émission de positons
ThT	Thioflavine-T

Tyr	Tyrosine
Tris	2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol

tm	Temps de migration
----	--------------------

U

U	Uranium
UF	Ultrafiltration

V

V	Voltage
---	---------

W

W	Largeur de la zone d'analyte
---	------------------------------



Symboles et grandeurs

$\lambda_{\text{excitation}}$	Longueur d'onde d'excitation
$\lambda_{\text{émission}}$	Longueur d'onde d'émission
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
L_T	Longueur total
L_D	Longueur de détection
R_h	Rayon hydrodynamique
t_m	Temps de migration de l'analyte
t_{NM}	Temps de migration du marqueur neutre
μ_{eo}	Mobilité électroosmotique
μ_{ep}	Mobilité électrophorétique
μ_{app}	Mobilité apparente
μM	Micro-molaire
v_{eo}	Vitesse électroosmotique
v_{ep}	Vitesse électrophorétique
\emptyset	Diamètre





Liste des figures

Figure 0-1 - Représentation schématique de deux chemins d'agrégation du peptide amyloïde aboutissant ou non à des dommages neuronaux. Image issue de « Progress Report on Alzheimer's Disease 2004-2005 ». ¹	1
Figure I-1 - Comparaison d'un cerveau sain et d'un cerveau d'un patient d'Alzheimer à un stade avancé de la maladie par IRM (Alsace Alzheimer 67).....	8
Figure I-2 - Désintégration des microtubules dans la maladie d'Alzheimer causée par l'enchevêtrement neurofibrillaire de la protéine Tau.	9
Figure I-3 - Evolution temporelle des marqueurs de la MA d'après Jack et al. ¹¹ A β et Tau, identifiés dans le LCR ou par tomographie par émission de positons (TEP) et atrophie cérébrale identifiée par IRM. 10	
Figure I-4 - Action des protéases dans le clivage de l'APP. (Adaptée de Querfurth et al. ¹⁴).....	11
Figure I-5 - Schématisation de la cascade amyloïde et images obtenues en MET pour les différentes formes agrégées issues des travaux réalisés par Williams et al. ²¹	12
Figure I-6 - Schématisation du processus d'auto-agrégation du peptide A β ₁₋₄₂ au cours du temps et domaine d'application des méthodes utilisées pour surveiller les différentes formes. (Adaptée de Borghesani et al. ²⁷).....	13
Figure I-7 - Cinétique d'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂ à différentes concentrations en peptide. (Adaptée de Hasecke et al. ²⁹).....	14
Figure I-8 - Séquence du peptide A β ₁₋₄₂ . Localisation de sa partie complexante (correspondant au fragment A β ₁₋₁₆) et de sa partie hydrophobe.....	16
Figure I-9 - Schématisation des sites d'interaction d'A β -Cu(II) à pH proche du pH biologique. (Adaptée d'Alies et al. ⁵⁶)	17
Figure I-10 - Cycle redox de Cu(II/I) lié à A β entraînant la production de ROS. (Adapté de Gu et al. ⁷³)	20
Figure I-11 - Influence du cuivre et de sa stœchiométrie sur l'agrégation d'A β ₁₋₄₂ . (A) Mécanismes potentiels aboutissant à la formation de formes agrégées différentes en fonction des rapports molaires en Cu(II). (B) Intensités de fluorescence de la ThT en fonction du temps d'incubation attendues en l'absence ou en présence de Cu(II). (Adapté de Weibull et al. ⁸⁵).....	22
Figure I-12 - Corrélation de distribution entre le peptide A β et le cuivre par épifluorescence après coloration à la ThS (A)	24
Figure I-13 - Profils électrophorétiques d'A β ₁₋₄₂ à différents temps d'incubation jusqu'à la précipitation de l'échantillon	26



Figure II-1 - Représentation schématique du principe de la CE avec un capillaire de silice.	30
Figure II-2 - Représentation schématique de la double couche régissant l'électroosmose en CE.	31
Figure II-3 - Représentation schématique des différentes étapes subies par l'échantillon en ICP-MS ..	33
Figure II-4 - Illustration des phénomènes de dissociation pouvant avoir lieu lors d'une séparation en CE. ¹²⁰	35
Figure II-5 - Schématisation du couplage CE-ICP-MS utilisé.....	37
Figure II-6 - Électrophérogrammes obtenus avec une détection UV de la fétuine et une détection ICP-MS du complexe fétuine/uranium.	38
Figure II-7 - Electrophérogrammes du complexe FET-U en CE-ICP-MS.....	39
Figure II-8 - Etude de l'efficacité de l'immobilisation thermique avec HPC et de sa stabilité après lavages à l'électrolyte (pH neutre) ou à l'HNO ₃ 1% (pH acide). Les μ_{eo} ont été déterminées par la méthode de Vigh.....	44
Figure II-9 - Formule semi-développée du polybrène.....	44
Figure II-10 - Electrophérogramme pour la séparation d'EDTA-Cu(II) en CE-ICP-MS à -20kV + 0,6 psi (A) et -20 kV +,0,2 psi (B), avec une électrode courte et du Tris 10 mM + EDTA 10 μ M comme solvant additionnel.	47
Figure II-11 : influence du voltage sur les taux de recouvrement du cuivre pour la séparation des complexes EDTA-Cu(II) (A), A β ₁₋₁₆ -Cu(II) (B) et NTA-Cu(II) (C) en CE-ICP-MS.	49
Figure II-12 - Influence du tampon sur les taux de recouvrement du cuivre pour la séparation des complexes A β ₁₋₁₆ -Cu(II) (A) et NTA-Cu(II) (B) en CE-ICP-MS à différents voltages.	51
Figure II-13 - Influence de la surface du capillaire sur les taux de recouvrement du cuivre pour la séparation des complexes A β ₁₋₁₆ -Cu(II) (A) et NTA-Cu(II) (B) à différents voltages.	52
Figure II-14 - Courbes de calibration réalisées en CE-ICP-MS pour les complexes EDTA-Cu(II) (A) et A β ₁₋₁₆ -Cu(II) (B).	55
Figure III-1 - Schématisation du principe de l'électrophorèse capillaire d'affinité.	61
Figure III-2 - Mobilogrammes obtenus pour l'étude ACE du peptide A β ₁₋₁₆ en présence de cuivre.....	62
Figure III-3 - Variation de la mobilité électrophorétique effective : (A) du peptide A β ₁₋₁₆ (●) et de la forme monomérique du peptide A β ₁₋₄₂ (●) en présence de cuivre, (B) des formes oligomériques du peptide A β ₁₋₄₂ en présence de cuivre (■) et (C) du peptide A β ₁₋₁₆ en présence de zinc (◆).....	63
Figure III-4 - Comparaison des données expérimentales obtenues par ACE et des modèles obtenus avec différentes constantes d'affinité pour les complexes A β ₁₋₁₆ -Zn(II) (A) et A β ₁₋₁₆ -Cu(II) (B)	65
Figure IV-1 - Electrophérogrammes obtenus pour la séparation de 100 μ M du peptide A β ₁₋₄₂ à t = 72h après dilution dans Tris 10 mM NaCl 15 NH ₄ OH 0,02%.	90



Figure IV-2 - Electrophérogrammes obtenus en CE-UV pour l'analyse de 100 μM de peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ préparé dans des conditions limitant l'agrégation (A) et dans les conditions favorisant l'auto-agrégation (B).	92
Figure IV-3 - Signaux UV et ajustements trimodaux obtenus en TDA-UV pour l'analyse de 100 μM de peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ préparé dans des conditions limitant l'agrégation (A) et dans les conditions favorisant l'auto-agrégation (B). Le signal de référence est représenté en trait plein noir. Les traits en pointillés représentent les ajustements des trois populations (violet, orange et vert) et la somme des populations (rouge).	92
Figure IV-4 - Courbe de calibration obtenue en CE-UV pour le peptide $\text{A}\beta_{1-16}$	95
Figure IV-5 - Comparaison de l'état d'agrégation initial de trois lots de peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ avec le peptide $\text{A}\beta_{1-16}$ en CE-UV.	96
Figure IV-6 - Comparaison du signal de la fluorescence à la ThT du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ issu du lot 2 avec celle du peptide $\text{A}\beta_{1-16}$	97
Figure IV-7 – Effet des ultra-sons après solubilisation du peptide dans 100% d'HFIP avec différents temps de sonication.	98
Figure IV-8 - Effet des ultra-sons après solubilisation du peptide dans 75% d'HFIP et 0,1% de NH_4OH avec différents temps de sonication	99
Figure IV-9 - Comparaison des électrophérogrammes obtenus pour la séparation du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ avant et après UF.	101
Figure IV-10 - Séparation de 100 μM de peptide $\text{A}\beta_{1-16}$ en CE-ICP-MS en présence de 10 μM de Cu(II) et d'une concentration croissante en NH_4OH	102
Figure IV-11 - Etude de la conservation de l'échantillon 1 à température ambiante. Injection à 0,5 psi 5 sec.	103
Figure IV-12 - Etude de la conservation de l'échantillon 2 à 4°C.	104
Figure IV-13 - Etude cinétique de l'agrégation du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ issu des lots 1 (A) et 2 (B).	105
Figure IV-14 - Evolution de l'aire corrigée de la population monomérique issue du lot 1 (A) et évolution du ratio des aires corrigées des différentes formes sur l'aire corrigée totale du signal UV pour le lot 2.	106
Figure IV-15 - Electrophérogrammes obtenus pour étudier la cinétique d'agrégation du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ en présence de Cu(II) (A) ou Zn(II) (B).	107
Figure IV-16 - Evolution de l'agrégation du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ au cours du temps en présence de Cu(II) (A) ou de Zn(II) (B).	108
Figure C-1 - Schéma illustrant la complémentarité de la CE avec détection UV ou couplée à l'ICP-MS pour étudier la répartition du cuivre dans les formes d'agrégation du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$	137



Figure C-2 : Signal ICP-MS et ajustement bimodal obtenus pour l'analyse d'une solution contenant 100 μM du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ et 50 μM de Cu(II) en TDA-ICP-MS. Le signal de référence est représenté en trait plein noir. Les traits en pointillés représentent les ajustements des deux populations (orange et vert) et la somme des populations (rouge).	138
Figure A-1 - Formule semi-développée de l'HPC.....	141
Figure A-2 - Montage pour la réalisation du greffage avec HPC.	142
Figure A-3 - Formule semi-développée du polybrène.....	143



Liste des tableaux

Tableau I-1 - Valeurs de références internationales de la concentration des biomarqueurs dans le LCR pour le diagnostic de la MA.....	9
Tableau I-2 - Comparaison des concentrations en cuivre dans diverses parties du cerveau de sujets contrôles ou atteints de la maladie d'Alzheimer.	15
Tableau I-3 - Résumé des constantes d'affinité conditionnelles obtenues par fluorescence, ITC et potentiométrie.	19
Tableau II-1 - Temps de migration et largeurs de pic à mi-hauteur obtenus pour la séparation de FET-U avec détection UV et ICP-MS.....	38
Tableau II-2 - Temps de migration, aires et hauteurs mesurés lors de la séparation du complexe FET-U en CE-ICP-MS.	39
Tableau II-3 - Etude de contamination du cuivre dans le matériel de laboratoire et les produits chimiques par ICP-MS.	42
Tableau II-4 - Evolution de la répétabilité de l'analyse d'EDTA-Cu(II) par couplage CE-ICP-MS pour en fonction de la nature du solvant additionnel.....	45
Tableau II-5 - Etude de la répétabilité pour l'analyse d'EDTA-Cu(II) en CE-ICP-MS en fonction de la taille de l'électrode.	47
Tableau II-6 - Etude de la répétabilité pour l'analyse d'EDTA-Cu(II) en CE-ICP-MS en présence ou non de voltage, avec l'utilisation d'une électrode courte et du Tris 10 mM + EDTA 10 μ M comme solvant additionnel.	48
Tableau II-7 - Mobilités électrophorétiques des ligands $A\beta_{1-16}$ et NTA libres ou complexés au cuivre, déterminées par ACE.....	50
Tableau II-8 - Temps, aire et hauteur pour la séparation d'une solution de 100 μ M de peptide $A\beta_{1-16}$ et 10 μ M de Cu(II) en CE-ICP-MS.....	54
Tableau II-9 - Temps de migration, aires et hauteurs de pic pour la séparation d'EDTA-Cu(II) en CE-ICP-MS avec différentes concentrations et différents rapports en cuivre.	54
Tableau II-10 - Temps de migration, aires et hauteurs de pic pour la séparation d' $A\beta_{1-16}$ -Cu(II) en CE-ICP-MS avec différentes concentrations et différents rapports en cuivre.....	55
Tableau III-1 - Mobilités électrophorétiques des peptides $A\beta_{1-16}$ et $A\beta_{1-42}$ libres ou complexés avec le cuivre ou le zinc déterminées par ACE.....	63



Tableau IV-1 - Mobilités électrophorétiques, rayons hydrodynamiques et proportions des différentes espèces présentes dans l'échantillon du peptide $A\beta_{1-42}$ préparé dans des conditions limitant son auto-agrégation (solution A).....	93
Tableau IV-2 - Mobilités électrophorétiques, rayons hydrodynamiques et proportions des différentes espèces présentes dans l'échantillon du peptide $A\beta_{1-42}$ préparé dans des conditions favorisant son auto-agrégation (solution B).	93
Tableau IV-3 - Temps de migration, aire corrigée et hauteur de pic pour la séparation de 100 μM de peptide $A\beta_{1-16}$ en CE-UV.....	94
Tableau IV-4 - Action d'HFIP après solubilisation du peptide dans 75% d'HFIP et 0,3% de NH_4OH avec différents temps de sonication.	99
Tableau IV-5 - Aires corrigées obtenues pour la séparation du peptide $A\beta_{1-42}$ avant et après UF.	101
Tableau IV-6 - Etude de l'influence de la concentration en ammoniaque sur la séparation du peptide $A\beta_{1-16}$ en présence de Cu(II)	102
Tableau IV-7 - Evolution au cours du temps de la séparation en CE-UV de l'échantillon 1 conservé à température ambiante.....	104
Tableau IV-8 - Evolution au cours du temps de la séparation en CE-UV de l'échantillon 2 conservé à 4°C.	104
Tableau A-1 - Mobilités électrophorétiques de NTA libre ou complexé au cuivre déterminées par ACE.	151







Introduction générale

Ces dernières décennies ont été marquées par une prise de conscience de la société du défi que représentent les maladies neurodégénératives, ces maladies touchant un nombre de personnes toujours plus grand, compte tenu de l'augmentation de l'espérance de vie de la population. Les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington et les maladies à prions partagent la caractéristique d'un mauvais repliement de protéines ou de peptides spécifiques. Parmi ces maladies neurodégénératives, la maladie d'Alzheimer est la plus répandue dans le monde.

La maladie d'Alzheimer se caractérise par deux grands types de lésions :

- les enchevêtrements neurofibrillaires de protéines Tau hautement phosphorylées associées aux microtubules dans le cerveau,
- le dépôt extracellulaire de peptides amyloïdes β ($A\beta$) sous forme de plaques séniles.

Les mécanismes de cette pathologie multifactorielle et complexe sont encore difficiles à appréhender. Toutefois, l'hypothèse retenue à l'heure actuelle est celle d'une cascade amyloïde, aboutissant à la formation d'espèces de tailles et de structures variées. Il semble en effet que l'agrégation des peptides $A\beta$ soit un événement clé dans le développement de cette maladie. Ainsi, bien que les peptides $A\beta$ soient inoffensifs dans leur forme monomérique, les oligomères, formés de façon intermédiaire au cours du processus d'agrégation, sont actuellement considérés comme les espèces délétères (**figure 0-1**).¹ Il est donc primordial de s'intéresser au processus d'agrégation, qui est néanmoins hautement complexe et implique diverses espèces transitoires et instables.

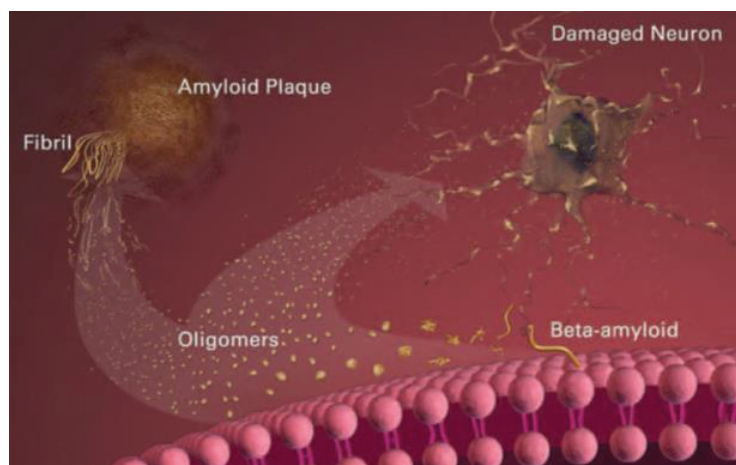


Figure 0-1 - Représentation schématique de deux chemins d'agrégation du peptide amyloïde aboutissant ou non à des dommages neuronaux. Image issue de « Progress Report on Alzheimer's Disease 2004-2005 ». ¹

Parallèlement, une dyshoméostasie des métaux, et notamment du cuivre, a été mise en évidence et pourrait être un facteur clé dans le développement de la MA car ces métaux auraient un impact significatif sur l'agrégation et l'activité redox des peptides A β .

De nombreuses recherches ont donc été consacrées à l'étude de la formation de complexes entre le cuivre et les peptides A β ainsi qu'à l'influence du cuivre sur leur agrégation. On constate souvent des tendances variables dues aux nombreux facteurs influençant cette agrégation (pH, température, état d'oligomérisation initial des peptides...) mais aussi à cause du fait que les techniques analytiques actuelles ne permettent d'acquérir que des informations parcellaires sur ces phénomènes.

Ce projet de thèse s'inscrit dans la lutte contre la MA et a pour objectif de fournir des informations complémentaires à celles existantes, en se focalisant sur l'interaction entre les différentes formes d'agrégation du peptide A β et le cuivre. Dans ce contexte, un couplage entre l'électrophorèse capillaire et l'ICP-MS (CE-ICP-MS) a été développé et combine les avantages d'une séparation efficace et d'une détection multi-élémentaire puissante.

Le premier chapitre de ce manuscrit sera dédié à la présentation générale de la maladie d'Alzheimer et à la description du principal biomarqueur, le peptide amyloïde β , ainsi qu'à l'exposé des connaissances actuelles concernant son agrégation. Le rôle des ions métalliques tels que le cuivre sera également discuté, notamment de par sa complexation avec le peptide A β ayant des conséquences sur son agrégation et sur la production d'espèces réactives à l'oxygène. Ce chapitre introductif détaillera les méthodes analytiques actuellement disponibles pour étudier l'implication de l'interaction entre le peptide A β et le cuivre (II) (Cu(II)) dans la MA ainsi que l'intérêt de développer de nouvelles méthodes.

Le second chapitre aura pour but de présenter les méthodes utilisées et les raisons qui font du couplage CE-ICP-MS un outil adapté à notre étude. Un accent particulier sera mis sur les difficultés analytiques rencontrées dans le cas particulièrement exigeant de l'analyse du cuivre à l'état de traces et d'un complexe labile.

Le troisième chapitre sera consacré à l'étude de l'affinité du peptide amyloïde β pour Cu(II) et le couplage CE-ICP-MS sera utilisé pour contribuer à l'établissement d'un consensus quant à la détermination de la constante de complexation.

Le quatrième chapitre sera dédié à l'étude de l'impact des ions métalliques, notamment le cuivre, sur l'agrégation du peptide amyloïde β . La complémentarité de l'électrophorèse capillaire avec détection UV et du couplage CE-ICP-MS sera exploitée pour fournir une répartition du cuivre dans les différentes formes d'agrégation du peptide, information encore non disponible à ce jour.





CHAPITRE I : Bibliographie

La maladie d'Alzheimer est la cause de démence la plus courante, à l'origine de 60-70% des cas, engendrant des enjeux importants sur le plan économique mais aussi social. La MA est une démence neurodégénérative complexe qui suscite l'intérêt des chercheurs depuis des décennies. En effet, les difficultés liées à la compréhension des processus impliqués dans cette maladie entravent la mise au point d'un traitement curatif. Etudier son évolution grâce à l'identification des symptômes et des biomarqueurs mais surtout mieux comprendre les mécanismes pathogènes sont indispensables pour stopper la dégénérescence neuronale.

Dans la première partie de ce chapitre, une présentation générale de la MA ainsi que des deux biomarqueurs principaux, la protéine Tau et le peptide amyloïde β , sera réalisée. Une description plus détaillée sera consacrée au peptide A β et à son agrégation car la cascade amyloïde est le facteur de déclenchement de la maladie qui prévaut à l'heure d'aujourd'hui. La troisième partie sera dédiée à l'implication du cuivre dans la MA de par son interaction entre le peptide A β et ses conséquences. Un accent sera porté sur les méthodes analytiques actuellement disponibles pour étudier le lien entre le peptide A β et le cuivre ainsi que l'intérêt de développer de nouvelles méthodes pour répondre aux nombreuses questions non élucidées.

1. Présentation de la Maladie d'Alzheimer

1.1. Historique et chiffres clés

La maladie d'Alzheimer doit son nom à Aloïs Alzheimer, neurologue allemand, qui en 1906, a diagnostiqué pour la première fois une démence sénile précoce chez une patiente âgée de 51 ans. Alzheimer décida de pratiquer une autopsie cérébrale sur sa patiente et constata une atrophie importante du cerveau. Par la suite, il découvrit deux types de dépôts anormaux, qu'on connaît aujourd'hui sous le nom de plaques de type amyloïde et dégénérescences neurofibrillaires impliquant la protéine Tau. Un deuxième cas quelques années plus tard a permis de valider sa théorie.

Au fil des décennies, les progrès médicaux et l'amélioration des conditions de vie ont entraîné une augmentation de l'espérance de vie et donc un accroissement du nombre de cas. Selon le World Alzheimer Report 2015, on dénombre plus de 35 millions de personnes touchées par la maladie dans le monde avec 7,7 millions de nouveaux cas chaque année. Cependant, le nombre réel de malades d'Alzheimer est certainement beaucoup plus élevé, étant donné que l'apparition des premières lésions survient dans le cerveau au moins 2 à 3 décennies avant l'apparition des premiers symptômes tels que la perte de mémoire. D'après l'OMS, le nombre de malades devrait presque doubler tous les 20 ans. Bien que cette pathologie touche principalement les personnes âgées (de plus de 65 ans), elle peut cependant survenir plus tôt. Le nombre de patients de moins de 60 ans atteints de la maladie d'Alzheimer est estimé à 33 000 en France. Par conséquent, le coût social et économique ne peut que suivre la même évolution. Les coûts médicaux associés à la MA sont estimés à plus de 5 milliards d'euros chaque année.

1.2. Des symptômes aux diagnostics

1.2.1. Manifestations cliniques

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative évolutive dont les symptômes externes, reconnaissables par l'entourage et le malade lui-même, sont étroitement liés à la perte progressive de fonctions neuronales. Principalement caractérisée par des pertes de mémoire, elle peut être décomposée en trois stades :

- le **premier stade**, d'une durée de 2 à 4 ans, marqué par une perte de mémoire discrète,
- le **stade intermédiaire** pouvant durer jusqu'à dix ans avec l'apparition des difficultés de reconnaissance et de communication avec les autres personnes,
- le **stade final** où le patient devient totalement dépendant et incapable de réaliser les activités de la vie quotidienne.

La détérioration lente de la mémoire affecte le langage, la capacité de raisonner, l'apprentissage, la faculté de prendre des décisions, les reconnaissances sensorielles, etc. Toutes ces pertes cognitives ont à terme des conséquences graves telles que la démence.

L'une des difficultés principales à l'établissement d'un diagnostic certain de la MA est liée à la similitude des effets secondaires provoqués par l'ingestion de substances de type alcool, médicaments ou drogues, ou par une pathologie psychiatrique telle que la schizophrénie ou la dépression. De ce fait, un diagnostic complet doit être réalisé. Actuellement, celui-ci repose sur un ensemble de critères énoncés dans le *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-5). Ce rapport propose une classification des troubles mentaux qui y sont décrits de manière concise, claire et systématique. A cet ouvrage s'ajoutent les normes établies par le NINCDS (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke*) et la ADRDA (*Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*).² Le principal examen clinique établi par le NINCDS-ADRDA est le MMSE (*Mini-Mental State Examination*), qui évalue la mémoire mais aussi d'autres fonctions cognitives telles que l'orientation dans le temps et dans l'espace, la compréhension.³ Il peut être associé à une multitude d'autres tests existants comme l'IMC (*association of Information - Memory - Concentration Test*) ou le CASI (*Cognitive Abilities Screening Instrument - Shortform*). Bien que ces contrôles cognitifs soient performants, ils sont limités par leur manque de spécificité à la MA.⁴ C'est pourquoi il est nécessaire de combiner ces tests avec des examens complémentaires dans le but de renforcer le diagnostic.

1.2.2. Rétrécissement du cortex cérébral

L'évolution de la MA est caractérisée par un rétrécissement du cortex cérébral. Ainsi, les techniques d'imagerie cérébrale telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont très sollicitées dans les étapes du diagnostic de la MA. Elles permettent d'observer la structure du cerveau et d'en détecter une potentielle atrophie. Une attention particulière est portée à l'examen de l'hippocampe qui est le siège de la mémoire. Cependant, l'observation de la réduction de la taille du cerveau d'un malade d'Alzheimer par rapport à celle d'une personne saine, possible grâce à l'imagerie (**figure I-1**), n'est notable qu'à un stade avancé de la maladie. Les différences d'activité cérébrale entre une personne saine et un malade d'Alzheimer sont trop faibles pour pouvoir être détectées efficacement dès les premiers stades de la maladie.

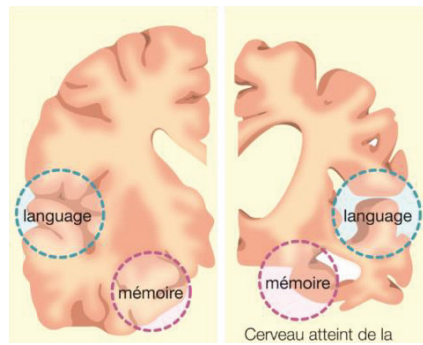


Figure I-1 - Comparaison d'un cerveau sain et d'un cerveau d'un patient d'Alzheimer à un stade avancé de la maladie par IRM (Alsace Alzheimer 67).

1.2.3. Peptide amyloïde et protéine Tau : les constituants principaux des lésions cérébrales

L'accumulation anormale de peptides amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire due à l'enchevêtrement de la protéine Tau (Tubule-Associated Unit) sont des marqueurs clés de la maladie d'Alzheimer.

Les dépôts de type amyloïde, premières lésions découvertes par Alois Alzheimer, sont localisés principalement au niveau de l'hippocampe, région du cerveau la plus touchée et apparaissent dans les milieux extracellulaires du cerveau des patients. Causées par l'agrégation du peptide amyloïde-bêta, la formation des diverses formes agrégées sera décrite plus précisément dans la suite de ce manuscrit.

Les enchevêtrements neurofibrillaires sont principalement constitués de protéines Tau. Celles-ci sont fortement exprimées dans les neurones et permettent de stabiliser les microtubules qui composent le cytosquelette des neurones. Les protéines Tau, qui possèdent jusqu'à 84 sites de phosphorylation potentiels, voient leur nombre de phosphorylations augmenter lors de la progression de la pathologie, ce qui modifie leur structure secondaire. Même si le nombre de sites de phosphorylation nécessaires pour modifier leur structure reste incertain, la phosphorylation de résidus spécifiques s'est montrée suffisante pour la modifier. Ces protéines, appelées Tau-hyperphosphorylées, auront alors tendance à s'agréger et former des enchevêtrements neurofibrillaires. Ce phénomène entraîne une diminution de leur affinité pour les microtubules et ainsi une perte de leur fonction de stabilisation (**figure I-2**). Par conséquent, les microtubules sont désorganisés et les neurones deviennent non fonctionnels.⁵

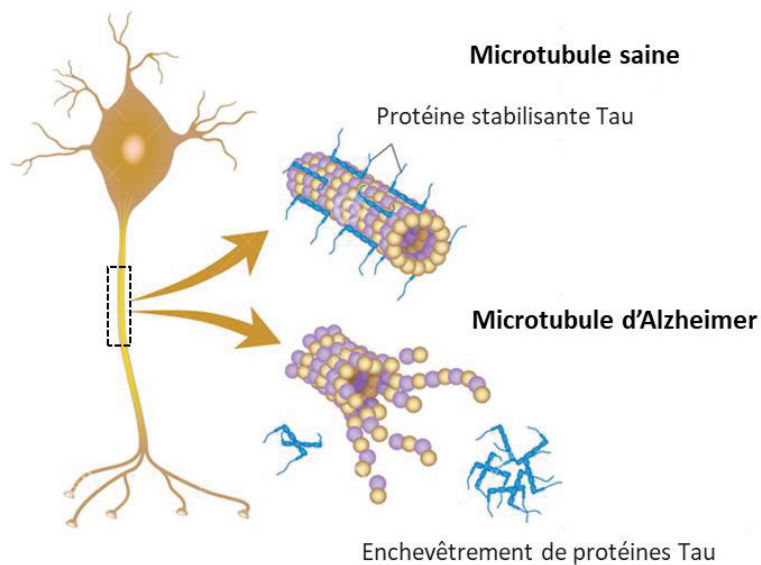


Figure I-2 - Désintégration des microtubules dans la maladie d'Alzheimer causée par l'enchevêtrement neurofibrillaire de la protéine Tau.

L'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR), obtenu par ponction lombaire, permet d'étudier les changements liés à ces deux biomarqueurs. Les données montrent la diminution de la quantité du peptide $A\beta_{1-42}$, constituant principal des dépôts, et l'augmentation des niveaux de protéine Tau (totale et hyperphosphorylée) chez les malades d'Alzheimer en comparaison des concentrations relevées chez les sujets sains.⁶⁻⁸ A noter que des analyses post-mortem ont montré une corrélation entre la diminution de la concentration d' $A\beta_{1-42}$ dans le LCR et la présence de plaques lors d'autopsies.^{9,10} Les valeurs de référence internationales pour les concentrations de ces deux biomarqueurs sont résumées dans le **tableau I-1**.

Tableau I-1 - Valeurs de références internationales de la concentration des biomarqueurs dans le LCR pour le diagnostic de la MA.

Biomarqueurs	LCR sujet sain (pg/mL)	LCR malade d'Alzheimer (pg/mL)
$A\beta_{1-42}$	794 ± 20	< 500
Tau totale	243 ± 127 (51 – 70 ans)	> 450
	341 ± 171 (> 71 ans)	> 600
Tau hyper-phosphorylée	23 ± 2	> 60

1.2.4. Un diagnostic tardif

Actuellement, le diagnostic de la MA repose sur la combinaison de manifestations cliniques, de tests neuropsychologiques et de techniques d'imagerie cérébrale. Même s'ils ont montré leur efficacité, le principal problème de ces tests est qu'ils ne permettent pas de diagnostiquer la maladie au stade précoce. La phase asymptomatique, qui peut durer plusieurs années, passe inaperçue car elle ne s'accompagne d'aucun signe clinique notable.

Des modèles étudiant l'évolution des biomarqueurs au cours de la MA montrent que ces derniers apparaissent 10 à 15 ans avant la manifestation des premiers symptômes cognitifs.^{11,12} Ces trajectoires hypothétiques, représentées dans la **figure I-3**, témoignent de l'existence de biomarqueurs accessibles du vivant du patient. Un défi important est d'améliorer la spécificité du diagnostic clinique grâce à l'utilisation de ces biomarqueurs.

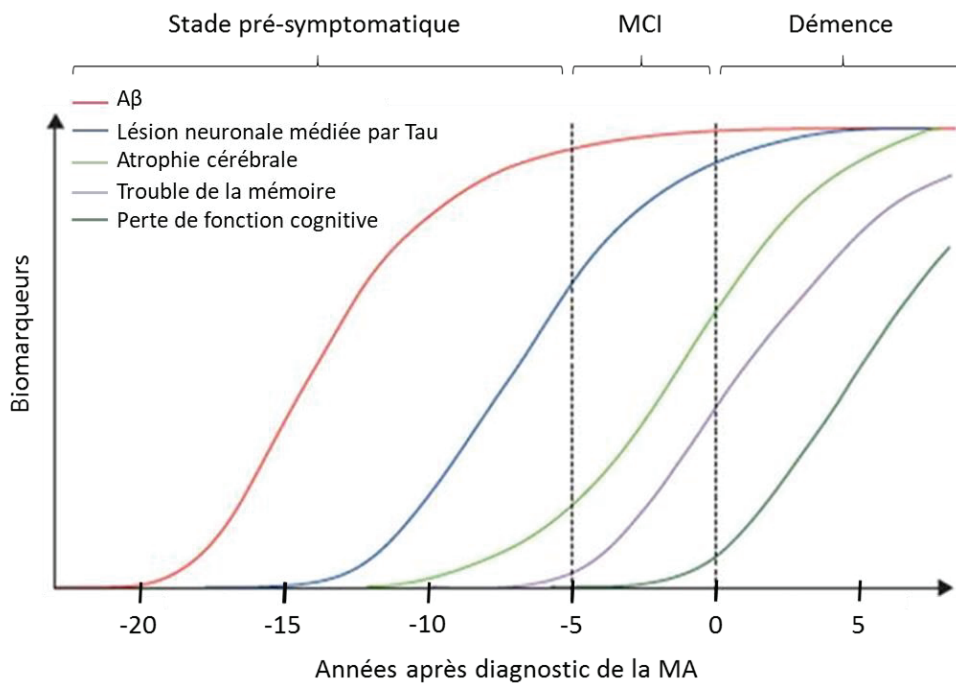


Figure I-3 - Evolution temporelle des marqueurs de la MA d'après Jack et al.¹¹ Aβ et Tau, identifiés dans le LCR ou par tomographie par émission de positons (TEP) et atrophie cérébrale identifiée par IRM.

2. Peptide amyloïde β : principal biomarqueur de la MA

2.1. Formation des peptides $A\beta$ via l'APP

La protéine précurseur de l'amyloïde (APP) est une glycoprotéine transmembranaire avec 695 à 770 acides aminés, codée par un gène localisé sur le bras long du chromosome 21 humain.¹³ Le clivage de l'APP résulte de l'action de deux paires de protéases, menant à deux voies représentées sur la **figure I-4**.

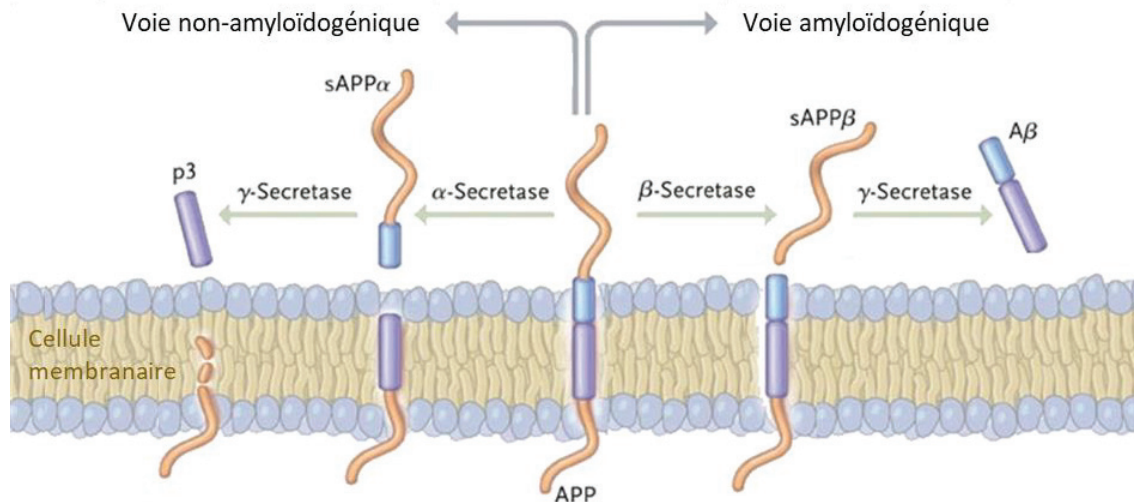


Figure I-4 - Action des protéases dans le clivage de l'APP. (Adaptée de Querfurth et al.¹⁴)

Le clivage de l'APP par l' α - et la γ -sécrétase conduit à la voie non amyloïdogénique et à la production d'un fragment neuro-protecteur appelé sAPP α et du peptide p3. L'autre paire, la β - et la γ -sécrétase, régit la formation du peptide amyloïde A β en libérant respectivement ses extrémités N- et C-terminales.¹⁵ Ce dernier est composé d'une partie hydrophobe constituée d'un nombre variable d'acides aminés, fonction de l'action de la γ -sécrétase donnant naissance à des longueurs de chaîne de 39 à 42 acides aminés principalement (en violet sur la figure I-4). La différence entre ce peptide et le peptide p3, qui est non nocif, est qu'il contient en plus une partie complexante capable de capter des ions métalliques tels que le cuivre (en bleu sur la **figure I-4**).¹⁶

Néanmoins, la voie amyloïdogénique ne conduit pas systématiquement à un caractère pathogène. Bien que le peptide A β soit naturellement présent chez une personne saine à des niveaux de concentrations de l'ordre du nanomolaire dans le LCR et le sérum,^{17,18} ce sont la densité, l'agrégation et l'accumulation de ce petit peptide qui semblent impliquées dans la MA.

2.2. Agrégation du peptide A β

Deux longueurs de peptides sont majoritairement présentes dans les fluides biologiques des individus sains ou malades d'Alzheimer : A β_{1-40} et A β_{1-42} . Alors que le peptide A β_{1-40} a été rapporté comme n'aboutissant pas à la formation d'espèces toxiques, le peptide A β_{1-42} (minoritaire par rapport A β_{1-40} et représentant environ 10% des peptides A β) est le fragment le plus abondant dans les plaques séniles car il est plus hydrophobe.^{17,19}

Le mécanisme d'agrégation du peptide A β_{1-42} , encore difficile à appréhender, aboutit in fine à la formation d'espèces amyloïdes insolubles via un processus en plusieurs étapes appelé cascade amyloïde,²⁰ aujourd'hui considérée comme une étape clé de la toxicité dans la MA. Les diverses espèces formées lors de l'agrégation, spontanée ou non, du peptide ont des structures et des tailles variées. L'évolution des formes agrégées du peptide A β_{1-42} au cours du processus est schématisée **figure I-5**, accompagnée d'images obtenues lors d'une étude portant sur la cinétique d'agrégation du peptide A β_{1-42} par microscopie électronique à transmission (MET).²¹

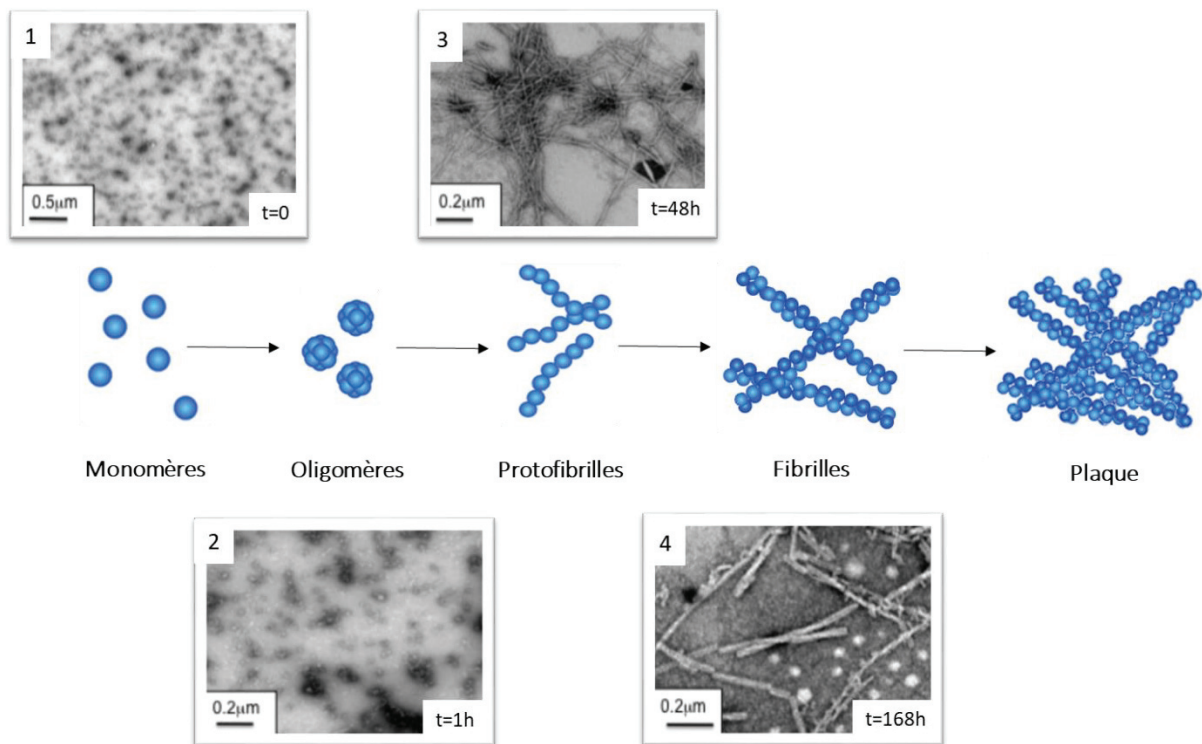


Figure I-5 - Schématisation de la cascade amyloïde et images obtenues en MET pour les différentes formes agrégées issues des travaux réalisés par Williams et al.²¹

Point de départ de l'agrégation, la forme monomérique du peptide (1) avec un rayon de quelques nanomètres, est non structurée et instable du fait de sa longue chaîne hydrophobe.²² Les monomères vont alors s'associer les uns aux autres pour former des petites structures plus stables enrichies en feuillets β antiparallèles,²³ appelés oligomères (2). Les oligomères ainsi formés sont composés d'un nombre variable de monomères, allant de deux à quelques dizaines, rendant cette population très hétérogène et difficile à étudier. L'observation en microscopie de cette population révèle des structures sphériques d'environ 4 à 20 nm de diamètre (image 2 de la figure I-5, 2).²¹ La quantité d'oligomères augmente de façon exponentielle jusqu'à l'apparition de protofibrilles (3) plus ordonnées et plus compactes dont le diamètre est de l'ordre du nm et dont la longueur peut atteindre plusieurs micromètres. Pour finir, les premières structures fibrillaires insolubles (4) apparaissent. L'accumulation des formes fibrillaires entraîne la formation de dépôts appelés plaques amyloïdes.

D'un point de vue cinétique, les études ont montré que la fibrillation du peptide $A\beta_{1-42}$ comporte trois grandes étapes fondamentales : la nucléation, l'élongation et la terminaison avec l'atteinte d'un état stationnaire.²⁴⁻²⁶ La **figure I-6** présente les espèces formées au cours de ces trois étapes et le domaine d'application des méthodes analytiques, basées sur la présence de feuillets β ou les changements de structure ou de taille, permettant de suivre l'apparition des différentes formes.

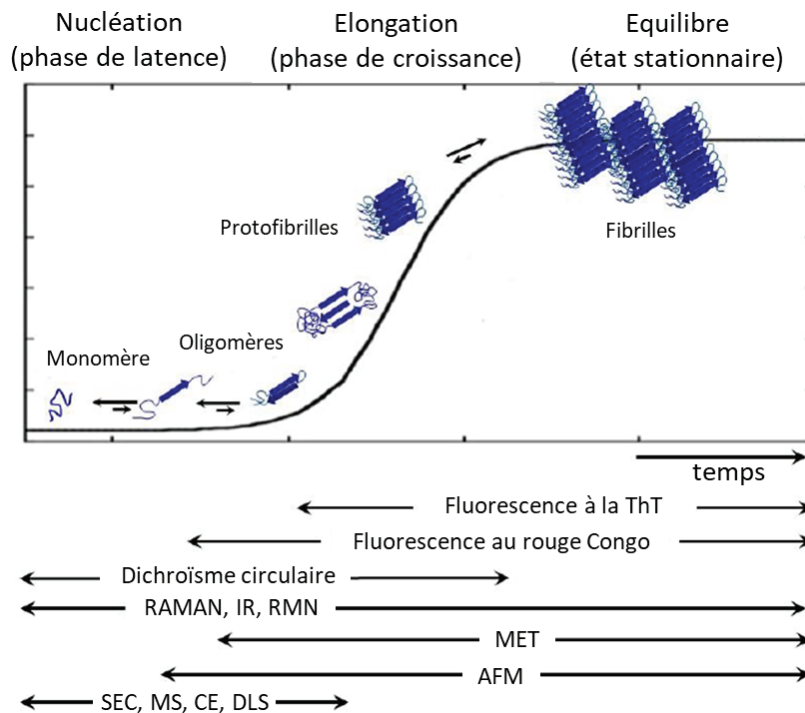


Figure I-6 - Schématisation du processus d'auto-agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ au cours du temps et domaine d'application des méthodes utilisées pour surveiller les différentes formes. (Adaptée de Borghesani et al. ²⁷)

L'étape de nucléation est l'étape cinétiquement déterminante et va avoir un impact sur la vitesse d'agrégation du peptide. La phase de latence dépend notamment :

- de la longueur du peptide, il a été montré *in vitro* que les étapes de nucléation et d'élongation étaient plus rapides dans le cas du peptide $A\beta_{1-42}$ que dans celui du peptide $A\beta_{1-40}$, du fait de ses deux résidus supplémentaires,^{24,28}
- de la concentration en peptide : plus la concentration en peptide est importante, plus la phase de latence est courte, jusqu'à devenir inexistante (**figure I-7**),²⁹
- de la présence d'ions métalliques tels que le cuivre, discutée dans la suite de ce manuscrit.

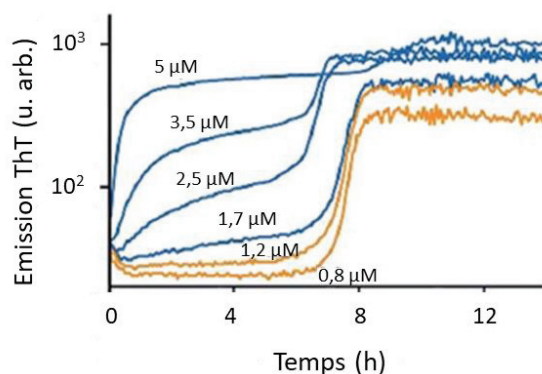


Figure I-7 – Cinétique d'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ à différentes concentrations en peptide. (Adaptée de Hasecke et al. ²⁹)

Du point de vue de la toxicité, les plaques amyloïdes ont dans un premier temps été considérées comme étant les espèces délétères. Cependant, les études semblent ne montrer aucun lien direct entre ces espèces et la perte de fonction neuronale. Les faits suggèrent plutôt que ce sont les formes intermédiaires du peptide $A\beta$ intervenant au cours de la cascade amyloïde qui sont toxiques : les oligomères.^{30,31} Ces derniers sont aujourd'hui pointés du doigt comme étant les composés les plus néfastes, en raison de leur niveau de concentration élevé très tôt dans le processus de la maladie, que ce soit dans le cerveau ou dans le LCR des malades d'Alzheimer.³²⁻³⁴ Ces oligomères seraient notamment responsables de la perturbation de l'activité synaptique car ils causeraient la déstabilisation des membranes neuronales affectant ainsi la perméabilité de celle-ci, même si cette hypothèse n'est pas encore vérifiée.^{21,33}

L'implication des oligomères d' $A\beta_{1-42}$ dans la MA pose une fois encore la question de l'origine de l'accumulation et de l'agrégation de ce peptide et les mécanismes sont aujourd'hui encore difficiles à appréhender. Plusieurs explications ont émané des nombreuses recherches liées à cette hypothèse telles que la surproduction de peptide $A\beta_{1-42}$ ou encore les interactions entre les ions métalliques et la partie complexante du peptide. A ce sujet, les ions métalliques semblent de plus en plus mis en cause dans la MA.

3. L'implication du cuivre dans la MA

3.1. Variations des niveaux de cuivre

Les métaux de transition tels que le cuivre, le fer et le zinc sont essentiels au bon fonctionnement d'un grand nombre de processus biologiques. En particulier, les propriétés redox du cuivre lui confèrent un statut crucial notamment dans l'activité de nombreuses enzymes (céruloplasmine, superoxyde dismutase, cytochrome C oxydase, ...). Le transport des ions cuivre et leur régulation sont assurés par une série de protéines de transport et de chaperones afin d'assurer l'homéostasie de ce métal car une carence ou un excès de cuivre peuvent avoir des conséquences importantes sur la santé de l'homme. La dérégulation de l'homéostasie du cuivre conduit à de nombreuses maladies, parmi lesquelles on peut citer la maladie de Wilson, qui se caractérise par une surcharge en cuivre,³⁵⁻³⁷ ou la maladie de Menkes, caractérisée par un déficit en cuivre.³⁸ Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, l'implication du cuivre est maintenant reconnue, même si son rôle exact reste à définir.³⁹ De nombreuses études ont montré une différence dans les concentrations de cuivre entre des personnes en bonne santé et des patients atteints de MA, à la fois dans diverses parties du cerveau et dans les fluides biologiques.

En ce qui concerne le cerveau, des controverses persistent sur les différences de concentration en cuivre chez les personnes saines ou atteintes de MA. Alors que des études ont montré l'absence de variation notable, certains auteurs décrivent une diminution significative de la concentration en cuivre chez les malades.⁴⁰ Des travaux font également état de variations qui dépendent de la région du cerveau étudiée.⁴¹⁻⁴⁴ Le **tableau I-2** regroupe les résultats obtenus dans diverses régions du cerveau par différents groupes.

Tableau I-2 - Comparaison des concentrations en cuivre dans diverses parties du cerveau de sujets contrôles ou atteints de la maladie d'Alzheimer.

Régions du cerveau	[Cu] contrôle (µg/g)	[Cu] MA (µg/g)	Référence bibliographique
Hippocampe	16,8 ± 0,9	13 ± 1	Deibel <i>et al.</i> 1996 ⁴²
	9 ± 2	12 ± 2	Magaki <i>et al.</i> 2007 ⁴³
	21 ± 5	12 ± 4	Xu <i>et al.</i> 2017 ⁴⁰
	10 ± 2	22 ± 3	Liu <i>et al.</i> 2022 ⁴⁴
Cortex entorhinal	19 ± 7	24 ± 6	Andrasi <i>et al.</i> 1995 ⁴¹
	20 ± 2	13 ± 4	Xu <i>et al.</i> 2017 ⁴⁰
Lobe temporel	22 ± 1	17 ± 1	Deibel <i>et al.</i> 1996 ⁴²
	23 ± 4	15 ± 3	Xu <i>et al.</i> 2017 ⁴⁰
Cervelet	31 ± 2	27 ± 1	Deibel <i>et al.</i> 1996 ⁴²
	45 ± 6	24 ± 4	Xu <i>et al.</i> 2017 ⁴⁰

Cette controverse peut s'expliquer par une très grande disparité des valeurs de référence. Une revue récente soulève ce problème de variabilité des valeurs dans différentes régions du cerveau humain, qui ne semble pas dépendre de la méthode d'analyse utilisée.⁴⁵ Par exemple, dans la région de l'hippocampe, le **tableau I-2** montre une concentration en cuivre chez les sujets sains qui varie entre 7 et 26 $\mu\text{g/g}$. De plus, bien qu'utiles pour étudier le rôle du cuivre dans la MA, ces analyses ne sont possibles que post-mortem et ne pourront donc pas être utilisées à des fins diagnostiques.

Dans les fluides biologiques, les résultats montrent que les variations de la concentration en cuivre total semblent dépendre de la matrice étudiée. Des méta-analyses de données publiées depuis les années 1980 ont été réalisées afin de déterminer si la concentration en cuivre peut être un éventuel biomarqueur de cette maladie.^{46,47} Alors que la concentration en cuivre dans le sérum est significativement plus élevée chez les malades d'Alzheimer, aucune différence significative entre les patients et les témoins n'a été observée dans le liquide céphalorachidien. En ce qui concerne le plasma, aucune conclusion n'a pu être apportée en raison de la trop grande hétérogénéité des résultats.

D'autres études ont étudié la variation des proportions de cuivre libre, c'est-à-dire non lié à la céruloplasmine (Cp), par rapport au cuivre total, en considérant 6 à 8 sites de complexation du cuivre pour Cp.⁴⁸ Les résultats indiquent que les personnes atteintes de la MA ont des niveaux plus élevés de cuivre libre (d'environ 10%) que les témoins sains.

3.2. Complexation des ions Cu(II) avec le peptide amyloïde β

3.2.1. Un site de complexation identifié

Le peptide amyloïde est constitué d'une séquence d'une quarantaine d'acides aminés. Il est caractérisé par la présence d'une région hydrophobe à son extrémité C-terminale et d'une partie complexante du côté N-terminal (**figure I-8**). Sa partie complexante est impliquée dans la coordination des ions cuivre, et a été intensément étudiée grâce à diverses techniques analytiques.^{49,50}



Figure I-8 - Séquence du peptide $A\beta_{1-42}$. Localisation de sa partie complexante (correspondant au fragment $A\beta_{1-16}$) et de sa partie hydrophobe.

Le site de complexation des ions Cu(II) du peptide amyloïde a principalement été étudié par résonance paramagnétique électronique (RPE) ⁵¹⁻⁵³ et par résonance magnétique nucléaire (RMN).^{51,52,54} Les études ont révélé un rôle important de la fonction imidazole des histidines (His6, His13, et His14) situées dans le domaine hydrophile (résidus 1-16). Les recherches sur des fragments de différentes longueurs tels que les peptides A β ₁₋₂₈ et A β ₁₋₄₂ confirment l'implication de ces résidus. ^{52,55} L'implication des acides aminés Asp1 et Ala2 dans l'interaction avec Cu(II) a également été rapportée.⁵⁴

A pH proche du pH physiologique, ce complexe peut adopter deux formes, dépendant du pH, pouvant être distinguées par RPE. ^{52,56} Ces complexes sont dénommés composé I (majoritaire pour les plus faibles pH) et II (majoritaire à plus haut pH). Ces principaux modes de coordination sont illustrés dans la **figure I-9** à pH physiologique.

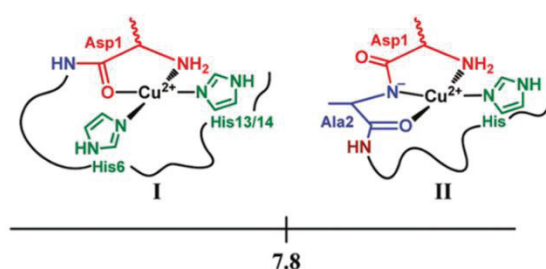


Figure I-9 - Schématisation des sites d'interaction d'A β -Cu(II) à pH proche du pH biologique. (Adaptée d'Alies et al. ⁵⁶)

La plupart des structures ont été identifiées sur les fragments tronqués du peptide A β (de 1-16 à 1-28) ou sur la forme monomérique du peptide A β ₁₋₄₂, qui sont solubles. Or, elles pourraient être différentes pour les formes agrégées. Même si les données disponibles sur le site d'interaction de Cu(II) avec les oligomères A β sont peu nombreuses, des analyses en RPE ⁵⁷ et RMN à l'état solide ⁵⁸ sur la forme fibrillaire du peptide A β ₁₋₄₀ ont permis de montrer une sphère de coordination de Cu(II) identique à celle du monomère du peptide A β ₁₋₁₆.

3.2.2. Une forte affinité

Compte tenu de l'emplacement du site de complexation du peptide A β pour Cu(II), le peptide A β ₁₋₁₆ s'avère être la séquence minimale requise pour étudier l'interaction avec le cuivre. Ce fragment a ainsi souvent servi de modèle, notamment dans les études de détermination de la constante d'affinité. Ceci permet d'éviter les difficultés liées à l'agrégation et à la faible solubilité des peptides plus longs. L'utilisation de ce peptide en tant que modèle est soutenue par le fait que la longueur du peptide semble n'avoir aucun effet sur son affinité avec le cuivre.⁵⁹ La potentiométrie, la spectroscopie de fluorescence et le titrage calorimétrique isotherme (ITC) sont les techniques les plus largement utilisées pour déterminer la constante d'affinité du peptide A β ₁₋₁₆ pour Cu(II).

Basée sur l'étude de la déprotonation du ligand lors de la complexation avec le métal par titrage pH-métrique, la potentiométrie est sujette à des limitations telles que :

- une consommation élevée d'échantillon : quelques millilitres de ligand à une concentration de l'ordre du millimolaire sont nécessaires et peu adaptés aux échantillons biologiques,
- un milieu non tamponné, la complexation des ions métalliques étant suivie en étudiant les variations de pH.

Afin d'accroître le caractère sélectif de la méthode, des chercheurs ont envisagé l'utilisation d'une électrode sélective au Cu(II) pour étudier les complexes peptide-Cu(II). Bien que prometteuse, cette approche reste limitée à cause d'une sensibilité insuffisante, de l'ordre de la dizaine de micromolaire.⁶⁰

Une autre technique couramment utilisée pour la détermination de constantes d'affinité est la spectroscopie de fluorescence.^{16,52,61-63} Elle est basée sur la forte extinction de fluorescence de la tyrosine (Tyr10), provoquée par la complexation avec des ions paramagnétiques tels que Cu(II).⁵⁰ Un des avantages est que cette technique consomme relativement peu d'échantillon (quelques millilitres de ligand à une concentration de l'ordre de la dizaine de micromolaires).

L'ITC permet d'étudier les paramètres thermodynamiques d'interaction en se basant sur la mesure de l'enthalpie de réaction. Elle donne ainsi accès à la stœchiométrie et à la constante de complexation, en utilisant quelques millilitres de ligand à une concentration de l'ordre de la centaine de micromolaires. L'une des difficultés majeures de l'ITC est que la variation de chaleur provoquée par la coordination doit être isolée des effets secondaires (mélange, dilution...). Cette contrainte est d'autant plus importante pour l'étude de complexes avec des métaux pour lesquels l'apparition de diverses réactions secondaires telles que la précipitation, l'hydrolyse ou l'oxydation, ne peut être négligée.⁶⁴ Ainsi, l'ITC nécessite une connaissance très approfondie du processus d'interaction pour éviter les erreurs systématiques.

Bien qu'elles soient difficiles à appréhender car elles ont été peu étudiées, les éventuelles interactions avec le tampon sont à prendre en considération pour déterminer la valeur de la constante de complexation. Un moyen de contourner cette difficulté est l'utilisation d'un compétiteur.⁵⁹ Pour cela, l'ensemble des paramètres de l'interaction de ce ligand compétiteur avec le métal doivent être connus et il ne doit pas contribuer à la formation de complexes ternaires.

Le **tableau I-3** regroupe les valeurs des constantes conditionnelles ${}^{\text{cond}}K_d$ (pH et tampon dépendantes) obtenues pour le peptide A β_{1-16} par différents groupes dans diverses conditions opératoires, en utilisant la fluorescence, la potentiométrie ou l'ITC.

Tableau I-3 - Résumé des constantes d'affinité conditionnelles obtenues par fluorescence, ITC et potentiométrie.
 K_d représentant la constante relative à l'équilibre $A\beta_{1-16} + Cu(II) \rightleftharpoons A\beta_{1-16} + Cu(II)$

Méthodes	[A β_{1-16}] (M)	Electrolyte	^{cond} K _d (M)	Référence bibliographique
Fluorescence	10 ⁻⁵	100 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH7,4	1,9x10 ⁻⁷	63
		H ₂ O, pH 7,8	1x10 ⁻⁷	61
		100 mM Hepes, pH 7,4	1,1x10 ⁻¹⁰	65
Potentiométrie	10 ⁻³	100 mM KNO ₃	2x10 ⁻¹⁰	66
ITC	10 ⁻⁴	20 mM Hepes, pH 7,4	1,5x10 ⁻¹⁰	59
		20 mM Hepes, pH 7,2	2,9x10 ⁻¹⁰	
		20 mM Pipes, pH 7,2	2,9x10 ⁻¹⁰	
		50 mM Tris, pH 7,4	2x10 ⁻⁷ /1,7x10 ⁻¹¹	

La valeur de la constante de complexation du peptide A β avec Cu(II) reste débattue, avec des valeurs qui diffèrent de plusieurs ordres de grandeur (de 10⁻⁷ à 10⁻¹¹ M), comme le montre le **tableau I-3**. Ceci peut être dû à la grande variété de techniques analytiques utilisées, mais plus significativement à la variabilité des conditions expérimentales (pH, concentration, tampon, compétiteur...). Bien que les interactions avec le tampon aient été prises en compte, les valeurs déterminées diffèrent encore de deux ordres de grandeur.^{59,67}

Bien qu'une grande partie des études ait été réalisée sur le peptide A β_{1-16} , les données sur des peptides de plus grande longueur ont abouti à des résultats similaires, tant en terme d'ordres de grandeur qu'en terme de disparité des résultats.⁴⁹ En ce qui concerne le peptide A β_{1-42} , la très grande majorité des études se sont concentrées sur la forme monomérique. L'une des rares études sur l'affinité de Cu(II) pour les agrégats d'A β_{1-42} , réalisée par fluorescence, rapporte une constante environ 100 fois plus élevée que celle du monomère.⁶⁸

L'existence d'un second site de complexation d'affinité plus faible pour Cu(II), avec $K_d = 10^{-5}$ M, ne peut cependant pas être écartée.^{62,16,69} Ce second site s'avère néanmoins non pertinent physiologiquement, du fait de sa faible affinité pour le cuivre.⁴⁹ Ainsi, seul le site de complexation ayant la plus forte affinité pour Cu(II) sera considéré dans la suite de ce manuscrit.

3.3. Les conséquences de l'interaction entre A β et Cu(II)

3.3.1. Sur la production d'espèces réactives à l'oxygène

La production anormale d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) semble être un des facteurs clés de la toxicité envers les neurones dans la MA. En ce sens, des niveaux élevés de ROS ont été trouvés dans les tissus cérébraux des patients affectés par la MA,⁷⁰ en particulier autour des plaques amyloïdes.⁷¹ Plusieurs facteurs peuvent expliquer la production élevée de ROS, comme l'augmentation des ions métalliques redox tels que le cuivre.⁷² Lorsque Cu(II) est réduit en Cu(I) en présence de réducteurs biologiques, comme l'ascorbate ou le glutathion, il est capable de générer des ROS telles que les radicaux hydroxyles (HO \cdot) (**figure I-10**).⁷³ Un excès de cuivre peut alors conduire à une surproduction de ROS, générant un stress oxydant impliqué dans de nombreuses maladies.

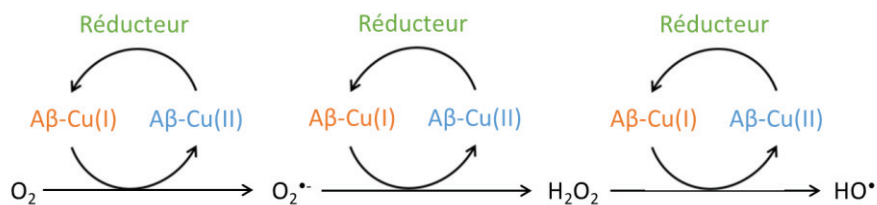


Figure I-10 - Cycle redox de Cu(II/I) lié à A β entraînant la production de ROS. (Adapté de Gu et al. ⁷³)

Des études *in vitro* suggèrent que l'interaction entre le peptide A β et Cu peut agir comme un catalyseur dans la production de ROS.^{74,75} Des études ont montré que le complexe A β -Cu(II) produisait plus de HO \cdot que d'autres complexes peptide - cuivre biologiques.^{76,77} Il a également été montré que la production de ROS était plus élevée en présence d'oligomères d'A β complexés au cuivre qu'en présence de monomères et que cette augmentation était proportionnelle au rapport cuivre/peptide.⁷⁸ Ces observations pourraient être une explication possible au rôle des oligomères dans la toxicité de la MA.

3.3.2. Sur l'agrégation du peptide amyloïde β

Bien que le peptide $A\beta_{1-42}$ soit capable de s'auto-agréger, il a été établi que les ions métalliques tels que Cu(II) influencent de manière significative son agrégation.^{79,80,49,81-84} Deux paramètres principaux pourraient expliquer l'effet de Cu(II) sur l'agrégation du peptide $A\beta$: les changements de structure 3D du peptide et sa charge globale imposée par la complexation. Dans ce contexte, l'influence du cuivre sur l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ a intensément été étudiée grâce au suivi des modifications de la taille des formes agrégées formées (microscopie, SDS-PAGE / Western Blot) ou la présence de feuillettes β (fluorescence à la thioflavine, dichroïsme circulaire).⁸⁵ Cependant, des divergences persistent et des effets promoteurs^{86,87} ou inhibiteurs^{88,89} des ions cuivre sur l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ ont été rapportés. Cette controverse est renforcée par le fait que plusieurs paramètres semblent entrer en jeu tels que le pH, la température et la stœchiométrie en métal.^{82,84}

La complémentarité des méthodes de microscopie et de fluorescence a permis d'arriver à un consensus sur le fait que le rapport molaire de Cu(II) : $A\beta_{1-42}$ a un rôle sur la morphologie des agrégats formés. A des rapports sous-stœchiométriques en cuivre (Cu(II) : $A\beta_{1-42} < 1$),^{84,90,91} les études en ThT ont montré une diminution de l'intensité de fluorescence, indiquant la présence d'espèces moins structurées que les fibrilles obtenues en absence de cuivre. Les images obtenues par microscopie ont confirmé la diminution ou l'absence de fibrilles et la présence de petits agrégats sphériques assimilables aux oligomères. Ainsi, le cuivre présent en faible quantité semble prévenir ou retarder l'apparition de fibrilles et favoriser la formation d'oligomères. En revanche, pour des rapports supra-stœchiométriques en cuivre (Cu(II) : $A\beta_{1-42} > 1$), la plupart des études ont montré que la formation de fibrilles est complètement inhibée et que les agrégats formés ont des morphologies amorphes.^{82,90-95} Les résultats obtenus pour des rapport équimolaires sont sensiblement les mêmes qu'en excès de Cu(II).^{93,94} Le schéma de la **figure I-11**, adapté des travaux de Weibull *et al.*,⁸⁵ résume le consensus qui semble être établi.

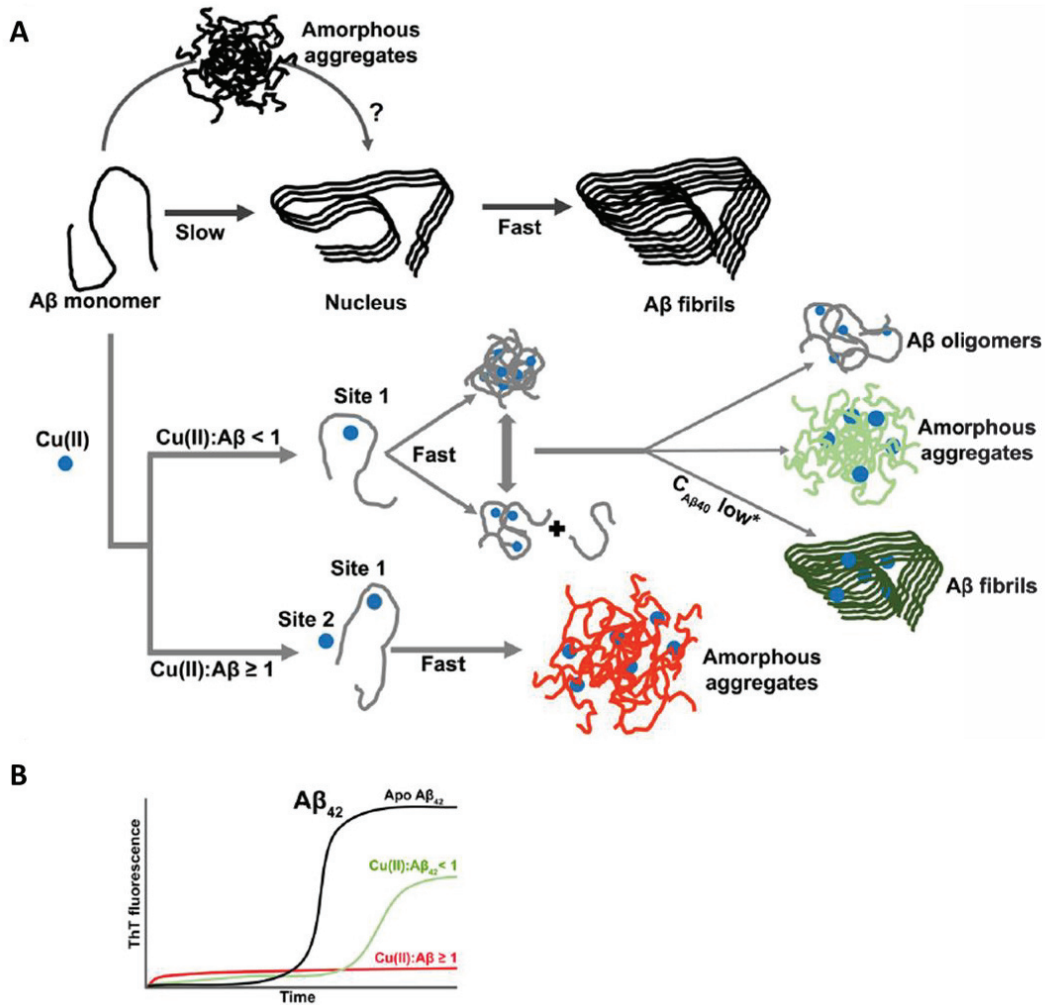


Figure I-11 - Influence du cuivre et de sa stœchiométrie sur l'agrégation d'Aβ1-42. (A) Mécanismes potentiels aboutissant à la formation de formes agrégées différentes en fonction des rapports molaires en Cu(II). (B) Intensités de fluorescence de la ThT en fonction du temps d'incubation attendues en l'absence ou en présence de Cu(II). (Adapté de Weibull et al.⁸⁵)

D'un point de vue cinétique, peu de données sont disponibles mais la présence de métaux semble augmenter la cinétique d'agrégation avec un impact principalement ciblé sur la phase de nucléation.^{82,96} L'augmentation de la cinétique pourrait expliquer les différences de morphologie des formes agrégées obtenues sans cuivre ou en présence de cuivre. En effet, plus l'agrégation est rapide, moins les espèces ont de temps pour se structurer.

Même si la complémentarité des méthodes permettant d'étudier l'influence du cuivre sur l'agrégation a abouti à un consensus, il n'y a toujours pas de preuve directe de cet effet dans les milieux biologiques. Les résultats restent basés sur des observations différentielles (variation de taille ou présence de feuillet β) et les études *in vivo* de la population oligomérique, pourtant jugée comme neurotoxique, sont manquantes. L'étude des oligomères est entravée par les défis associés à leur isolement et à leur détection, notamment en raison de la nature dynamique et de l'hétérogénéité des formes agrégées formées au cours du processus d'agrégation.

3.4. Détection simultanée du peptide amyloïde β et du cuivre

Compte tenu de son importance, différentes études se sont attachées à mettre en évidence la présence du complexe $A\beta$ -Cu(II) dans les échantillons réels.

3.4.1. Dans le cerveau post-mortem

De nombreuses approches ont été développées pour étudier la distribution spatiale du cuivre et sa co-localisation éventuelle avec le biomarqueur amyloïde. Principalement basée sur des méthodes d'imagerie, la stratégie repose sur la superposition d'images obtenues par des techniques permettant d'une part de détecter les dépôts de type amyloïde et d'autre part, le cuivre.

Une des méthodes les plus courantes pour localiser les plaques amyloïdes dans les tissus consiste à les colorer avec des composés tels que le rouge Congo, la thioflavine S (ThS) ou T (ThT). Ces colorants se lient aux fibrilles amyloïdes grâce aux canaux formés par la présence de feuilletts β .^{97,98} La microscopie à épifluorescence permet ainsi de localiser les plaques amyloïdes avec une résolution entre 5 et 10 μm .^{99,100} Les dépôts amyloïdes peuvent également être observés par coloration immunohistochimique.¹⁰¹⁻¹⁰³ Celle-ci consiste à colorer les plaques amyloïdes via un marquage avec un anticorps reconnaissant spécifiquement le peptide $A\beta$ (anticorps 1E8). Le peroxyde d'hydrogène-diaminobenzidine (DAB) est souvent utilisé pour améliorer la coloration de cet anticorps. Ces deux types de marquage, fluorescent et immunohistochimique, sont reconnus pour ne pas perturber la distribution des biométaux,¹⁰⁴ permettant d'étudier la répartition en peptide $A\beta$ et en cuivre sur le même échantillon.

Parallèlement, la localisation du cuivre dans le tissu cérébral peut être analysée par micro-PIXE (Proton-Induced X-ray Emission)¹⁰⁵ ou grâce aux microsondes à fluorescence à rayonnement synchrotron (SXRF).^{99,100,103} Avec une résolution similaire à la micro-PIXE (5-10 μm), l'SXRF a l'avantage d'être non-destructive. Plus récemment, le couplage entre l'ablation laser et l'ICP-MS (LA-ICP-MS) a été développé pour observer la co-localisation du cuivre et des dépôts amyloïdes dans des coupes du cerveau.^{101,106,102} Avec une résolution de l'ordre du micromètre, le couplage LA-ICP-MS a également un potentiel élevé pour obtenir des résultats quantitatifs en imagerie élémentaire.

La corrélation des images obtenues pour le cuivre et le peptide a montré que les plaques séniles contiennent des concentrations élevées de Cu(II). A titre d'exemple, les images issues de la détection des plaques amyloïdes par épifluorescence après coloration à la ThS et de celle du cuivre par SXRF dans le tissu cérébral humain chez un patient atteint de la MA sont présentées sur la **figure I-12**.⁹⁹ Ces images montrent une accumulation du cuivre dans des « points chauds » du tissu cérébral correspondant à la présence de plaques d'amyloïde β .

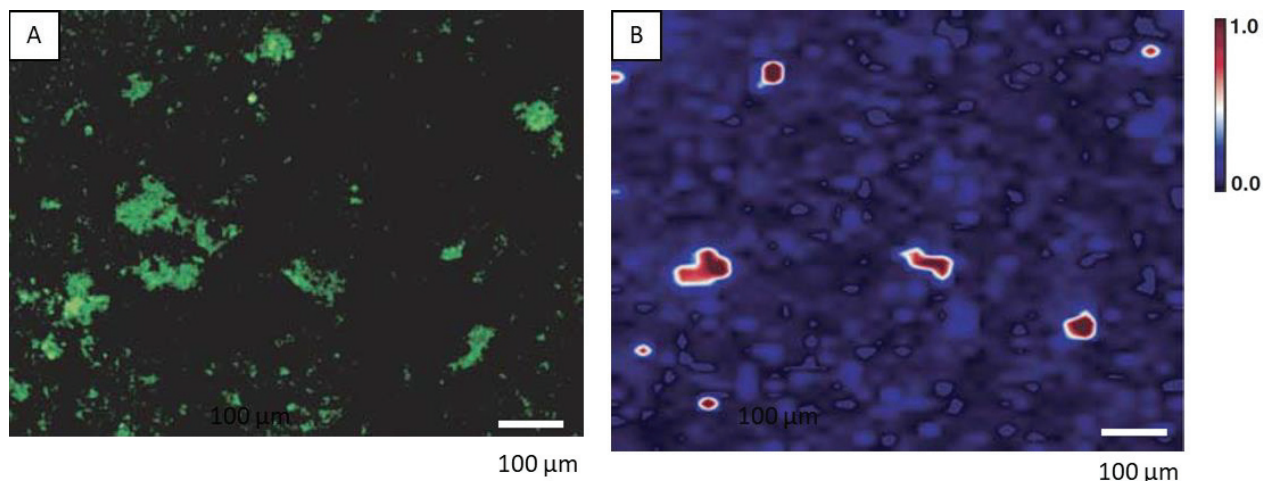


Figure I-12 - Corrélation de distribution entre le peptide A β et le cuivre par épifluorescence après coloration à la ThS (A) et par SXRf (B) respectivement dans le tissu cérébral humain atteint d'Alzheimer.⁹⁹

3.4.2. Dans les fluides biologiques

Même si les diverses études sur les tissus cérébraux semblent s'accorder sur une accumulation de métaux tels que le cuivre aux niveaux des plaques amyloïdes, ces analyses ne sont possibles que post-mortem et ne peuvent être utilisées pour prévenir l'apparition de la maladie. La preuve de l'existence du complexe de A β -Cu(II) dans les fluides biologiques pourrait constituer une possibilité de diagnostic beaucoup moins invasive. Dans ce contexte, la variation simultanée des niveaux de peptide A β et de cuivre dans les fluides biologiques a été étudiée. Ainsi, la coévolution des taux plasmatique de peptide A β et de cuivre par ELISA grâce à des anticorps dirigés contre le peptide A β et par ICP-MS respectivement a été étudiée.¹⁰⁷ Cependant, très peu d'études se sont attachées à l'analyse du complexe en lui-même. Des stratégies électrochimiques ont été développées en se basant sur la réduction de l'activité électrochimique du métal après complexation avec le peptide.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Cependant ces techniques se sont avérées ne convenir qu'à la surveillance de la forme monomérique d'A β et ne permettent pas de fournir des informations sur les espèces oligomériques.

4. Conclusion et objectifs

Considérée comme étant la maladie neurodégénérative la plus répandue dans le monde, la maladie d'Alzheimer a fait l'objet de nombreuses études qui ont permis de définir deux biomarqueurs principaux : la protéine Tau et le peptide amyloïde β . Les recherches montrent que l'agrégation du peptide amyloïde est un évènement clé dans le développement de la MA. Même si la forme monomérique du peptide est inoffensive, ce sont les espèces oligomériques formées lors de son agrégation qui sont actuellement considérées comme toxiques. Bien que le peptide soit capable de s'auto-agréger, il a été rapporté que les interactions d'ions métalliques tels que Cu(II) avec le peptide A β jouent un rôle important dans son agrégation et le développement de la MA.

Malgré le développement de méthodes analytiques variées, des controverses persistent en ce qui concerne la relation entre le cuivre et le peptide amyloïde. Alors que de nombreuses études ont été consacrées à ce problème, la plupart d'entre elles sont soit basées sur une détection simultanée du peptide et du métal, soit concentrées sur des variations de tailles ou de structures du peptide amyloïde- β lors de l'ajout de cuivre. Cependant le développement d'approches métallomiques permettant l'étude de l'association de ces métaux avec les oligomères de ces amyloïdes β sont rares. De plus, il n'y a à l'heure d'aujourd'hui, aucune donnée sur la répartition du cuivre au cours du processus d'agrégation.

L'électrophorèse capillaire est une méthode de référence pour la séparation de fragments du peptide A β avec différentes longueurs de chaîne¹¹¹ ou la séparation des formes oligomériques solubles du peptide à pH 7,4.¹¹²⁻¹¹⁶ De plus, elle s'est avérée efficace pour surveiller l'agrégation du peptide jusqu'à la précipitation (**figure I-13**).¹¹⁶ Pourtant, cette méthode n'a pas été utilisée pour étudier l'affinité du cuivre pour les différentes formes d'agrégation. Le couplage de cette méthode séparative avec une détection spécifique du cuivre pourrait donc être un outil intéressant dans le but d'étudier *in vivo* la relation entre le cuivre et les oligomères du peptide A β .

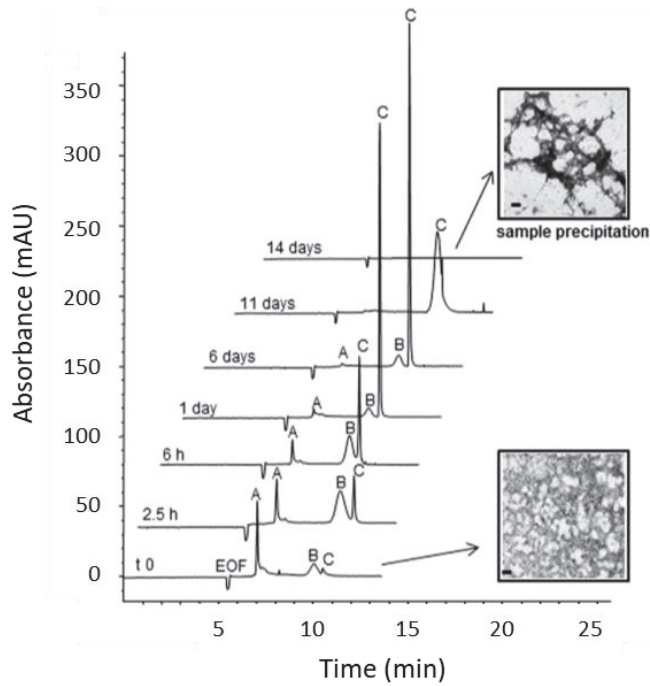


Figure I-13 - Profils électrophorétiques d' $A\beta_{1-42}$ à différents temps d'incubation jusqu'à la précipitation de l'échantillon
 Encarts : images MET représentatives des fibrilles amyloïdes à $t = 0$ et à la précipitation de l'échantillon.
 (Adapté de Bisceglia et al.¹¹⁶)

L'objectif de notre étude est donc de développer une méthode qui permette à la fois de suivre les formes agrégées du peptide et la présence éventuelle de cuivre dans ces dernières. Dans ce contexte, nous nous proposons de développer une méthode basée sur le couplage entre la CE et l'ICP-MS (CE-ICP-MS).

Dans le cadre de cette thèse, cette méthode sera appliquée à deux questionnements majeurs dans ce domaine :

- la détermination de la constante de complexation du peptide $A\beta_{1-16}$ -Cu(II) et sa pertinence dans les milieux biologiques,
- l'influence du cuivre sur l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ et l'évolution de sa distribution dans les différentes formes au cours de l'agrégation, en fonction de sa concentration.





CHAPITRE II : Etude d'A β -Cu(II) par CE-ICP-MS : une analyse complexe

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, il existe un large panel de méthodes analytiques permettant d'étudier la constante de complexation entre le peptide A β et Cu(II) et de localiser / quantifier simultanément le peptide et le cuivre dans différentes régions du cerveau ou dans les fluides biologiques. Bien qu'une forte affinité et une colocalisation de ce peptide avec le cuivre aient été démontrées, aucune étude ne montre la formation non ambiguë de complexes A β -Cu(II) dans des échantillons réels.

Dans le but de suivre la répartition du cuivre dans les différentes formes du peptide, la combinaison d'une méthode qui permet de séparer les états d'agrégation d'A β ₁₋₄₂ et d'une méthode offrant une détection spécifique du métal semble intéressante. Dans ce contexte, nous avons choisi de développer une méthode basée sur le couplage CE-ICP-MS. D'une part, le choix de la CE a été encouragé par sa capacité de séparation et sa faible consommation d'échantillon, adaptée à l'étude d'échantillons biologiques disponibles en faible quantité. D'autre part, l'ICP-MS s'avère être une technique sensible pour détecter spécifiquement le cuivre à l'état de traces. Le couplage CE-ICP-MS apparaît donc comme un outil de choix pour apporter des informations complémentaires par rapport aux méthodes déjà existantes et ainsi contribuer à une meilleure compréhension de l'influence du cuivre sur l'agrégation du peptide A β .

Dans cette partie, nous nous proposons dans un premier temps de décrire brièvement le principe des techniques CE et ICP-MS. Les raisons qui ont guidé le choix de chaque technique seront étayés. Dans un second temps, les challenges associés à l'étude du cuivre à l'état de traces et d'un complexe labile seront développés. Les solutions apportées pour surmonter les difficultés analytiques rencontrées seront également détaillées.

1. Le couplage CE-ICP-MS : un outil de choix

1.1. La CE : une technique séparative adaptée

L'électrophorèse capillaire (CE) est une technique séparative en phase liquide où les composés sont séparés grâce à l'application d'un champ électrique dans un capillaire, généralement en silice, de faible diamètre interne (entre 50 et 100 μm) et rempli d'un électrolyte conducteur. Le principe de la CE est représenté schématiquement dans la **figure II-1**.

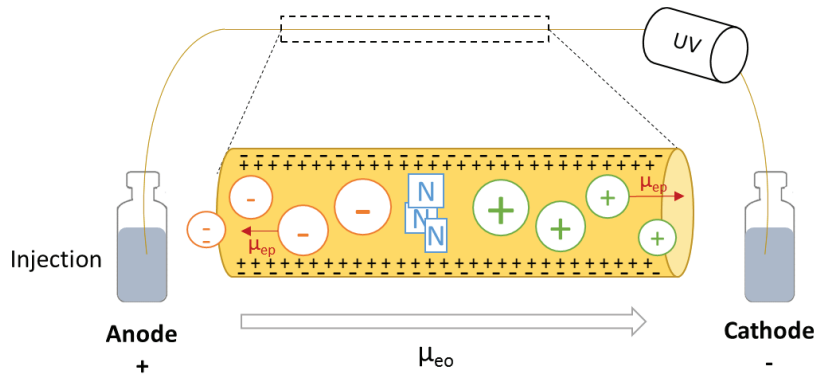


Figure II-1 - Représentation schématique du principe de la CE avec un capillaire de silice.

1.1.1. De la théorie...

Le mécanisme de séparation des composés présents dans un mélange repose sur leur différence de mobilité sous l'effet d'un champ électrique induit par l'application d'une tension (quelques kilovolts (kV)). Deux phénomènes sont à l'origine de la migration des composés à l'intérieur du capillaire : l'électromigration et l'électroosmose.

L'électromigration, définie par la vitesse électrophorétique (v_{ep}), est caractérisée par le déplacement d'une espèce chargée et est propre à chaque composé, dépendant de son rapport charge/taille. Les espèces sont alors soumises à deux forces : une force électrostatique due à l'application d'un champ électrique et une force de frottement due à la viscosité du milieu. La combinaison de ces deux forces établit un état d'équilibre caractérisé par l'**équation II-1**.

$$q \cdot E = 6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v_{ep} \quad (\text{II-1})$$

avec q la charge de l'ion et r le rayon de Stokes de l'espèce chargée assimilée à une sphère.

La vitesse électrophorétique (v_{ep}) est proportionnelle au champ électrique via un coefficient appelé mobilité électrophorétique (μ_{ep}) :

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E \quad (\text{II-2})$$

En combinant les **équations II-1 et II-2**, la μ_{ep} peut être exprimée selon la relation suivante :

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi.\eta.r} \quad (II-3)$$

μ_{ep} dépend alors de la densité de charge surfacique de l'espèce et des différentes propriétés de l'électrolyte (viscosité, pH...).

Le phénomène d'électroosmose engendre un écoulement, caractérisé par la mobilité électroosmotique (μ_{eo}), qui entraîne l'ensemble des espèces présentes dans le capillaire. Ce phénomène est régi par la présence d'une double couche à la surface du capillaire, schématisée dans la **figure II-2**, dans le cas d'un capillaire de silice avec une charge de surface négative. Les cations impliqués dans la couche diffuse seront mis en mouvement lors de l'application du champ électrique parallèle à l'interface capillaire/électrolyte lors des séparations et entraîneront l'ensemble de l'électrolyte avec un écoulement de vitesse linéaire (v_{eo}) de l'anode vers la cathode.

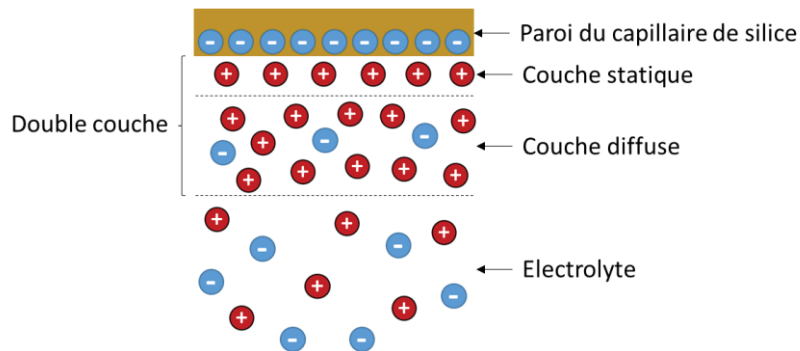


Figure II-2 - Représentation schématique de la double couche régissant l'électroosmose en CE.

v_{eo} , proportionnelle au champ électrique appliqué, peut être exprimée suivant l'**équation II-4** :

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E \quad (II-4)$$

$$\text{Où } \mu_{eo} = \frac{\epsilon.\zeta}{\eta} = \frac{\sigma\delta}{\eta} \quad (II-5)$$

avec μ_{eo} : la mobilité électroosmotique, E : le champ électrique appliqué, ϵ la constante diélectrique du milieu, ζ : le potentiel zéta, η la viscosité de la solution, σ : la densité de charge par unité de surface du capillaire et δ : l'épaisseur de la double couche.

μ_{eo} dépend alors de la composition de l'électrolyte (pH, nature et concentration, présence de modificateur), de la nature de la surface du capillaire et de la température. Elle n'est donc pas dépendante des composés à analyser. Contrairement aux profils paraboliques classiquement rencontrés dans un écoulement de Poiseuille en chromatographie liquide, l'écoulement électroosmotique présente un profil plat de vitesse. Ce type de profil engendre une plus faible dispersion longitudinale des analytes et par conséquent une meilleure efficacité lors des séparations.

Ainsi, la mobilité apparente (μ_{app}) d'une espèce est la combinaison de ces deux mobilités :

$$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{eo} \quad (II-6)$$

1.1.2. ... à la pratique

En pratique, l'échantillon est injecté à l'une des extrémités du capillaire de manière hydrodynamique ou électrocinétique. L'injection hydrodynamique se fait par application d'une pression. La quantité injectée peut être modulée grâce à la variation de la valeur de la pression et/ou du temps d'injection. Cette méthode permet d'injecter des faibles volumes et ainsi minimiser la dispersion externe due à l'injection. L'injection électrocinétique se fait via l'application d'une tension. La quantité injectée sera alors fonction des espèces et dépendra de leur mobilité apparente, aboutissant à une modification de la composition initiale de l'échantillon. Pour les deux modes d'injection, la consommation d'échantillon et d'électrolyte est extrêmement faible : de l'ordre du nanolitre et du microlitre respectivement. Ces exigences en terme de volume rendent la CE attrayante pour l'analyse d'échantillons précieux, tels que les échantillons biologiques disponibles en quantités limitées.

Une fois injectés, les composés sont séparés grâce à l'application d'une différence de potentiel aux extrémités du capillaire, via l'utilisation d'électrodes en platine plongeant dans des réservoirs d'électrolyte. Expérimentalement, la séparation CE donne accès à la mobilité apparente de chaque espèce, par l'intermédiaire de son temps de migration (t_m) :

$$\mu_{app} = \frac{L_d \cdot L_t}{V \cdot t_m} \quad (II-7)$$

où L_t et L_d sont respectivement la longueur totale du capillaire et sa longueur jusqu'à la détection, et V la différence de potentiel appliquée.

La mobilité électroosmotique peut quant à elle être mesurée par injection d'une espèce neutre :

$$\mu_{eo} = \frac{L_d \cdot L_t}{V \cdot t_{eo}} \quad (II-8)$$

La μ_{ep} des composés peut alors être déterminée grâce à la **relation II-9** :

$$\mu_{ep} = \frac{L_d \cdot L_t}{E} * \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eo}} \right) \quad (II-9)$$

En ce qui concerne la détection, elle est classiquement réalisée *in line* au sein du capillaire, au moyen d'une fenêtre de détection, par spectrophotométrie d'absorbance UV. Le principal inconvénient d'une telle détection est le manque de sensibilité causé par le faible trajet optique. D'autres modes de détection *in line* sont possibles tels que la fluorescence induite par laser (LIF)^{117,118} ou la conductimétrie.¹¹⁹ Des détections on-line peuvent également être réalisées grâce à l'élaboration de couplages tels que les couplages CE-MS et CE-ICP-MS.⁵⁻⁹ L'ICP-MS, adapté à la détection des métaux, sera brièvement présenté dans la suite de ce manuscrit.

1.2. L'ICP-MS : une détection multi-élémentaire puissante

Le plasma à couplage inductif couplé à la spectrométrie de masse (ICP-MS) est une technique de détection et de quantification élémentaire dont les performances ne font aujourd'hui plus aucun doute. Les différentes étapes subies par l'échantillon sont schématisées dans la **figure II-4**.

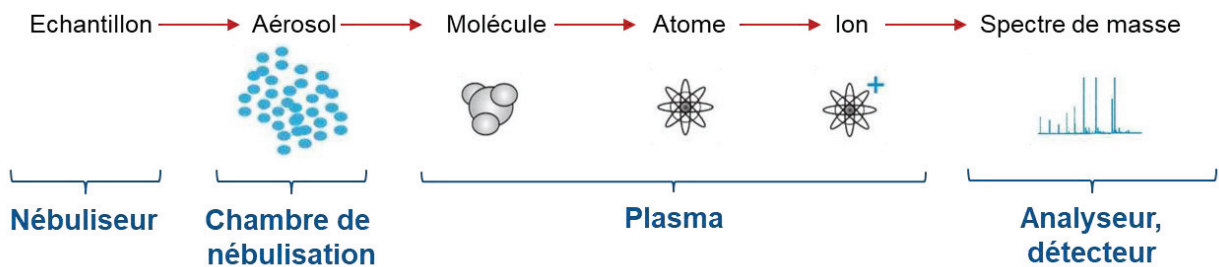


Figure II-3 - Représentation schématique des différentes étapes subies par l'échantillon en ICP-MS

Lors de son introduction, l'échantillon liquide est transformé en aérosol grâce à un nébuliseur. Après leur passage dans la chambre de nébulisation, seules les plus fines gouttelettes vont entrer dans le plasma où elles vont être vaporisées, atomisées puis ionisées. Le plasma, composé en général d'Argon, est induit par haute fréquence et génère des températures élevées, entre 5 000 - 10 000 K. Les ions ainsi formés sont focalisés par un système de lentilles puis introduits dans le spectromètre de masse pour être analysés et détectés en fonction de leur rapport masse/charge.

L'ICP-MS permet une quantification rapide d'une grande partie des éléments compris entre le lithium ($Z = 7$) et le plutonium ($Z = 239$) à l'état de traces avec des limites de détection de l'ordre du ng/L. La haute efficacité d'ionisation induite par le plasma, associée à la capacité de détection multi-élémentaire, spécifique et sensible offerte par la spectrométrie de masse en font un système de détection particulièrement adapté à notre étude.

1.3. Etude de complexes peptide-métal ou protéine-métal en CE

1.3.1. Les avantages

L'étude des complexes métalliques nécessite de maintenir le ligand dans une configuration appropriée à la complexation et le métal dans le site de complexation et leur stabilité dépend souvent des conditions du milieu de séparation. Par exemple, un mauvais contrôle du pH pourrait modifier la charge et la structure du ligand et donc affecter sa complexation avec le métal. Dans ce contexte, le large choix d'électrolytes possible en CE est un atout pour se rapprocher des conditions physiologiques (pH, force ionique...), compatibles avec le maintien des complexes métalliques.¹²⁵ De plus, l'absence de phase stationnaire et donc d'interaction entre celle-ci et les ions métalliques notamment devrait favoriser le maintien des complexes liés de façon non-covalente lors de la séparation.

La CE est aussi compatible avec l'utilisation de phases aqueuses, contrairement aux méthodes chromatographiques (RPLC et HILIC) qui nécessitent l'utilisation de solvants pouvant dénaturer les protéines (stabilité et capacité de liaison avec les métaux par exemple).

1.3.2. Le phénomène de dissociation

Pour l'étude de complexes métalliques non-covalents, le processus de déséquilibre apparait comme l'un des phénomènes les plus importants, occasionnant des modifications de l'état d'équilibre initial de l'échantillon.^{126,127} Par exemple, dans le cas d'un complexe métallique, le métal sera fortement attiré par la cathode car très petit et doublement chargé positivement et le ligand sera quant à lui généralement attiré vers l'anode en fonction de sa charge et de sa taille. Ainsi, l'application d'une tension induit la migration du métal (M) et du ligand (L) dans des zones distinctes de celle du complexe (ML), pouvant provoquer un déséquilibre chimique des espèces et modifier la composition à l'équilibre dans l'échantillon. La répartition du métal observée au niveau de la détection ne reflètera donc pas la spéciation initiale de l'échantillon. Le phénomène de déséquilibre sera moins important si les mobilités des ligands libres ou liés sont peu différentes (cas des complexes protéine / métal). Bien que difficile à appréhender, il est pourtant indispensable d'avoir pleinement connaissance de ce phénomène dynamique pour fournir une analyse fiable. Ce phénomène peut être limité en adaptant les conditions de séparation.

Dans ce contexte, les travaux réalisés par Sonke *et al.* ont permis d'éclaircir ce phénomène notamment en se basant sur de la simulation d'expériences, et leur comparaison à des résultats expérimentaux.¹²⁰ Le phénomène de dissociation est illustré dans la **figure II-3**.

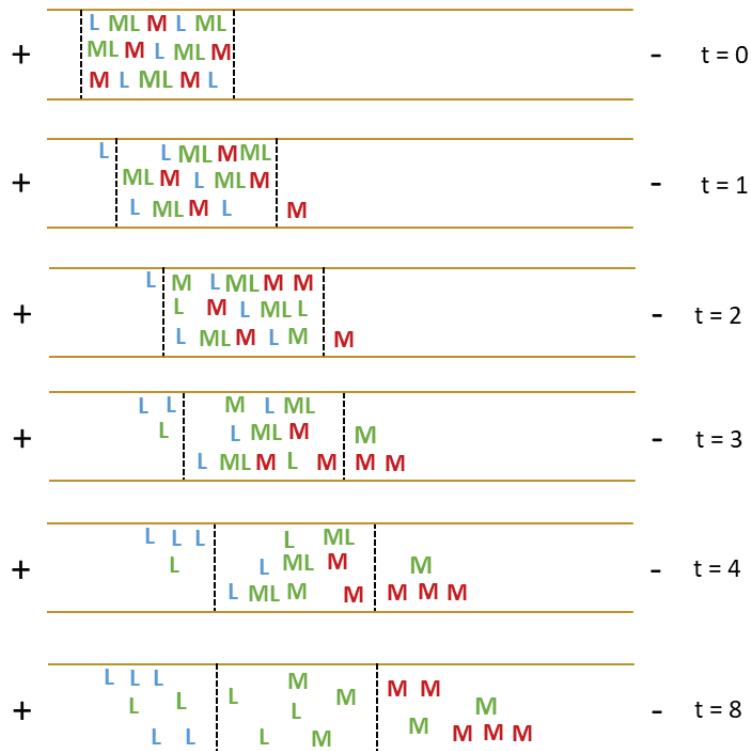
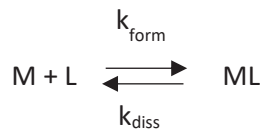


Figure II-4 - Illustration des phénomènes de dissociation pouvant avoir lieu lors d'une séparation en CE.¹²⁰

A $t = 0$, la zone d'échantillon reflète la composition de l'échantillon avant séparation, définie par l'équilibre ci-dessous :



Avec une constante d'équilibre K_{ML} définie comme le rapport des constantes de vitesse de formation (k_{form}) et de dissociation (k_{diss}) du complexe :

$$K_{ML} = \frac{k_{form}}{k_{diss}} \quad (II-10)$$

Les autres indicateurs de temps ne reflètent pas le temps absolu de la séparation, mais caractérisent des états successifs, aboutissant finalement à la dissociation complète du complexe.

La stabilité des complexes pendant la séparation peut être estimée à partir de leur temps de demi-vie ($t_{1/2}$). Dans le cas d'un système enclin à la dissociation, le temps de demi-vie apparent peut être défini par la **relation II-11**.

$$t_{1/2}^* = \frac{-\ln 0,5}{\left(|\mu_{ep}^L - \mu_{ep}^{ML}| \frac{V}{L_{cap}} \right) \left(\frac{1}{W} \right)} \quad (II-11)$$

L'importance du phénomène de dissociation dépend alors de trois paramètres principaux :

- la différence entre les mobilités du complexe et du constituant du complexe ayant la μ_{ep} la plus proche de celle du complexe, généralement le ligand ($\mu_{ep}^L - \mu_{ep}^{ML}$),
- le champ électrique appliqué (V/L_{cap}),
- la largeur de la zone d'analyte (W).

Puisque la différence des mobilités est dépendante du système, il est possible de jouer sur V/L_{cap} et W et il sera possible de limiter la dissociation du complexe en diminuant le voltage ou en augmentant la largeur de la zone d'analyte, au détriment de la résolution.

2. Mise en place du couplage CE-ICP-MS

Les avantages combinés de la CE et de l'ICP-MS font du couplage CE-ICP-MS un outil de choix pour l'étude des complexes métalliques, grâce à l'efficacité de séparation de la CE d'une part et à la sensibilité et spécificité de la détection multi-élémentaire en ICP-MS d'autre part.

2.1. Conception expérimentale et interface : les points clés

L'utilisation du couplage CE-ICP-MS reste encore limitée, notamment par l'interface entre les deux appareillages. La contrainte principale est l'incompatibilité des débits entre la CE et l'ICP-MS. Alors que le débit généré par l'électrophorèse capillaire est de l'ordre de la centaine de nL/min, les nébuliseurs classiquement utilisés en ICP-MS nécessitent des débits compris entre 100 et 500 μ L/min, fonction du type de nébuliseur, pour garantir une bonne efficacité de nébulisation. Il est donc important de se prémunir des effets de succion liés à la différence de débit pour préserver la séparation. D'autre part, la génération d'un champ électrique pour la séparation en CE nécessite la fermeture du circuit électrique entre les deux extrémités du capillaire. Ainsi, l'interface entre les deux appareils représente le point-clé de la performance du système de couplage.

Il existe deux types d'interface : une interface avec ajout d'un liquide additionnel et une autre sans ajout de liquide additionnel. La première interface utilisée pour le couplage CE-ICP-MS, décrite par Olesik *et al.*,¹²⁸ était une interface sans ajout de liquide additionnel afin d'éviter la dilution. L'apparition d'un flux laminaire dans le capillaire à cause d'une auto-aspiration du nébuliseur et le contact électrique difficile à assurer ont contribué à limiter son utilisation. Pour pallier les difficultés rencontrées avec l'interface précédente, l'ajout d'un liquide additionnel a été envisagé. L'avantage principal de ce type d'interface est la reproductibilité des analyses.

Bien qu'il existe des interfaces commerciales, les couplages entre la CE et l'ICP-MS sont généralement réalisés avec une interface développée directement en laboratoire. Le liquide additionnel peut alors être délivré, par l'intermédiaire d'un raccord en forme de croix, via l'utilisation d'une pompe ou par l'auto-aspiration provoquée par le nébuleur. L'avantage de la deuxième option est que le débit du liquide additionnel sera automatiquement modulé, ce qui permettra de compenser les légères variations de débit de nébulisation.

Pour notre étude, nous avons fait le choix d'utiliser une interface délivrant le liquide additionnel par l'auto-aspiration du nébuleur. Le couplage réalisé entre l'électrophorèse Beckman P/ACE MDQ et l'ICP-MS Agilent 7700 équipé d'un analyseur quadripolaire est schématiquement représenté dans la **figure II-5**.

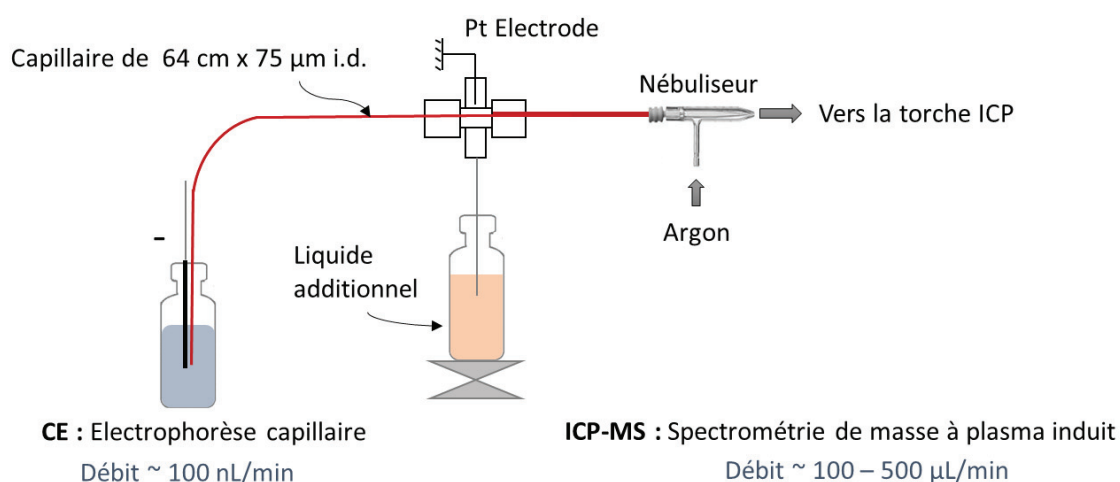


Figure II-5 - Schématisation du couplage CE-ICP-MS utilisé.

Pour que l'apport du liquide additionnel permette de contrebalancer efficacement le phénomène de succion, il est nécessaire d'optimiser la hauteur de ce dernier. Celle-ci a été réglée en utilisant la méthode mise en point par Chamoun *et al.*¹²⁹

2.2. Performances du couplage

L'étude des performances du couplage CE-ICP-MS a été réalisée sur le complexe fétuine-uranium (FET-U). Le choix de ce complexe a été guidé par deux arguments principaux :

- FET-U est un complexe stable, avec une forte constante de complexation ($\log K_{\text{FET-Cu(II)}} = 11,4$) et une μ_{ep} très proche de celle de la fétuine libre. De ce fait, il est non enclin à la dissociation.¹³⁰
- l'uranium est facilement analysable par ICP-MS grâce à l'absence de contamination (bruit de fond = 50 CPS) et une sensibilité excellente pour ^{238}U , principal isotope.

2.2.1. Vérification de la dispersion externe due à l'interface

Afin de s'assurer que l'interface n'introduise pas de dispersion externe significative, une double détection a été mise en place : une détection UV à 11 cm et une détection ICP-MS à 64 cm. Une solution contenant 10 μM de FET et 1 μM d'U a été injectée en CE sur un capillaire de 64 cm * 75 μm recouvert thermiquement avec HPC et du Tris 10 mM NaCl 15 mM pH 7,4 comme électrolyte. L'échantillon a été détecté à la fois en UV à 200 nm (avant l'interface) et en ICP-MS à $m/z = 238$ (après l'interface). La **figure II-6** regroupe les électrophérogrammes obtenus. Les temps de migration et les largeurs à mi-hauteur ($w_{1/2}$) sont résumés dans le **tableau II-1**.

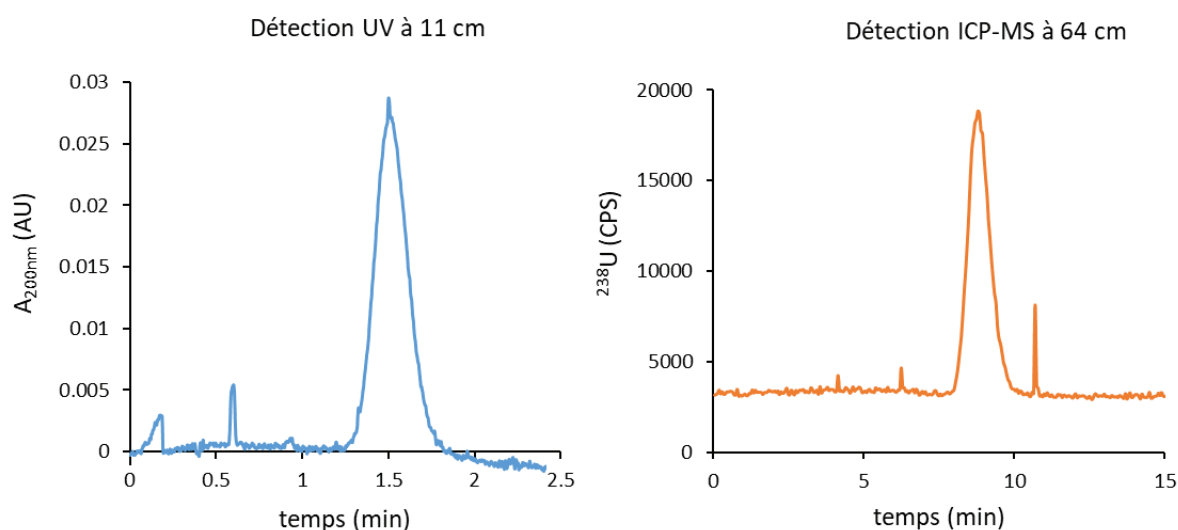


Figure II-6 - Électrophérogrammes obtenus avec une détection UV de la fétuine et une détection ICP-MS du complexe fétuine/uranium.

Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -25 kV avec une pression assistée de 0,3 psi, 25°C, détection UV 200 nm à 11 cm et détection ICP-MS à $m/z = 238$ à 64 cm.

Tableau II-1 - Temps de migration et largeurs de pic à mi-hauteur obtenus pour la séparation de FET-U avec détection UV et ICP-MS.

	Détection	t_m (min)	$w_{1/2}$ (min)	$w_{1/2} / t_m$
UV $\lambda = 200$ nm	In situ à 11 cm	1,52	0,2 min	0,13
ICP-MS $m/z = 238$	A la fin du capillaire (64 cm)	8,8	0,8 min	0,09

Les données montrent une bonne correspondance des temps de migration, avec $t_m(\text{ICP-MS}) = 5,8 * t_m(\text{UV})$, correspondant à l'écart entre les deux détections. Il est à noter un élargissement de pic en UV à cause d'une dispersion due à l'injection (volume injecté largement supérieur à 2% du volume du capillaire jusqu'à la détection). En revanche, la conception expérimentale au niveau de l'interface n'introduit pas de dispersion comme en témoigne l'absence d'élargissement de pic en ICP-MS.

2.2.2. Répétabilité

Pour étudier la répétabilité du couplage, un échantillon contenant 10 μM de FET et 1 μM d'U a été analysé en triplicat en CE en présence ou en absence de voltage, sur un capillaire avec un revêtement HPC et du Tris 10 mM NaCl 15 mM pH 7,4 comme électrolyte. Les électrophérogrammes obtenus, avec une détection de ^{238}U en ICP-MS, sont présentés dans la **figure II-7**. Les répétabilités obtenues pour les temps de migration, les aires et les hauteurs sont résumées dans le **tableau II-2**.

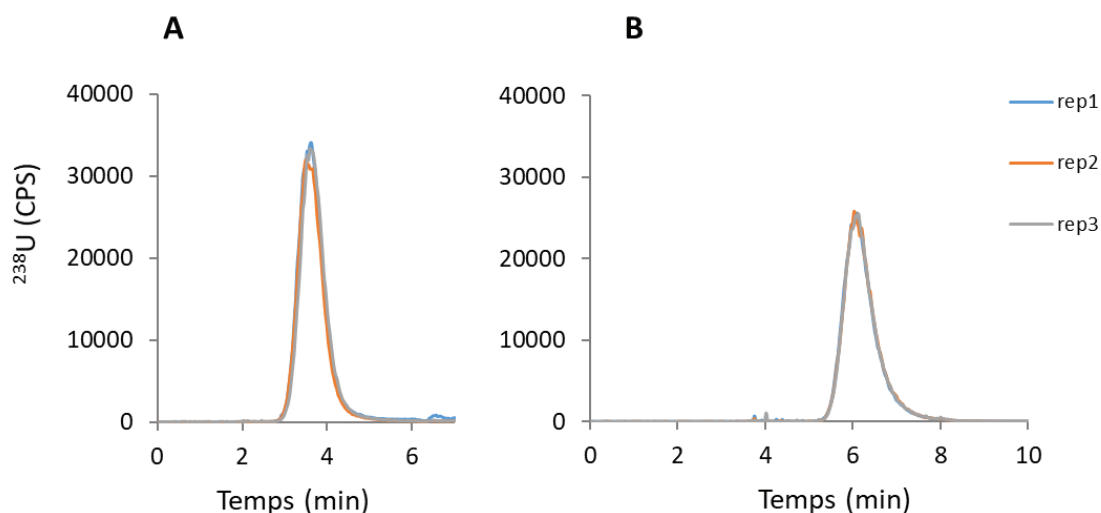


Figure II-7 - Electrophérogrammes du complexe FET-U en CE-ICP-MS.

Conditions : capillaire (75 μm d.i. x 64 cm) avec revêtement HPC, tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : 1,5 psi (A) ou -20 kV avec une pression assistée de 0,6 psi (B), 25°C, détection : ICP-MS à $m/z = 238$ à 64 cm.

Tableau II-2 - Temps de migration, aires et hauteurs mesurés lors de la séparation du complexe FET-U en CE-ICP-MS.

Conditions de séparation	t_m (min)	Aires ^{238}U (coups)	Hauteur (CPS)
1,5 psi	$3,56 \pm 0,05$	$(138 \pm 3) \times 10^4$	$(380 \pm 8) \times 10^2$
-20 kV + 0.6 psi	$6,08 \pm 0,03$	$(132 \pm 2) \times 10^4$	$(255 \pm 2) \times 10^2$

Les résultats confirment que le couplage CE-ICP-MS ainsi mis au point offre une répétabilité excellente en terme de temps de migration (écart-type relatif < 1%), d'aires (écart-type relatif < 2%) et de hauteurs (écart-type relatif < 3%) pour l'analyse de l'uranium à $m/z = 238$.

3. Les difficultés analytiques liées à l'étude du complexe A β -Cu(II) par CE-ICP-MS

Cette partie est dédiée à l'étude des difficultés liées à l'analyse du cuivre à l'état de traces et à la labilité du complexe A β -Cu(II) pour obtenir une méthode permettant la quantification du cuivre complexé aux différentes formes du peptide A β à l'échelle du micromolaire.

3.1. Le cuivre : un élément difficile à analyser à l'état de traces

Bien que le cuivre soit injecté à une concentration de l'ordre d'une dizaine de micromolaires, il subit deux phénomènes de dilution lors de son analyse. La dilution la plus importante que subit l'échantillon se trouve au niveau de l'interface du couplage causée par l'apport d'un solvant additionnel. Ce premier facteur de dilution est d'environ 1000. La deuxième dilution, négligeable devant celle générée par l'interface, est liée à la diffusion de l'échantillon tout au long de son séjour dans le capillaire et est fonction des espèces et des conditions opératoires. Le cuivre arrive donc au niveau du détecteur avec une concentration de l'ordre de quelques nanomolaires. Cette faible concentration engendre des défis analytiques supplémentaires.

La présence de cuivre contaminant dans les systèmes analytiques est source de complications, encore accentuées en analyse de traces. La présence indésirable de ces ions contaminants pourrait conduire à une surestimation du signal voire, à la détection de pics fantômes. En effet, une protéine libre pourrait être détectée comme une holoprotéine si elle se lie aux contaminants présents dans le système analytique. La contamination en ions métalliques pose également de sérieux problèmes en terme de répétabilité affectant significativement les analyses quantitatives. Les principales difficultés énoncées peuvent être limitées en prenant garde aux contaminations dans les contenants ou produits chimiques et à la sorption du cuivre sur les différents éléments du système analytique (capillaire, éléments en verre, électrode).

3.1.1. Etude de la contamination en cuivre

L'ensemble du système analytique lui-même est une source importante de contamination et la présence de cuivre contaminant se traduit par une ligne de base du signal ^{65}Cu élevée (jusqu'à 10 000 CPS). L'ensemble du système analytique a été nettoyé à l'acide HNO_3 5% pendant plusieurs jours (interface entre la CE et l'ICP-MS, nébuliseur, chambre de nébulisation, ligne de transfert, cônes, bouteille du liquide additionnel, électrodes). Le nettoyage a été estimé suffisant lorsque le signal de base du ^{65}Cu , mesuré par ICP-MS en auto-aspiration, ne présentait plus aucune variation avec une valeur constante dans HNO_3 1% comprise entre 800 et 850 CPS.

Le matériel de laboratoire et les divers produits chimiques utilisés lors de notre étude sont également une source importante de contamination. Ainsi, l'absence de cuivre contaminant dans les contenants et les produits chimiques a été vérifiée. En ce qui concerne les contenants (flacons contenant les électrolytes en CE, bouteilles en verre, tubes en plastique...), ils ont été lavés 3 fois avec HNO₃ 1% et les acides des lavages initiaux et finaux ont été analysés par ICP-MS pour quantifier le cuivre présent avant et après les lavages. Les solutions de produits chimiques ont quant à elles été préparées dans des contenants préalablement lavés 3 fois à l'acide et l'éventuelle présence de contamination en cuivre a été déterminée par ICP-MS. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau II-3**. Il est à noter que le signal de fond dû à l'instrumentation est légèrement plus faible dans l'eau (600 CPS) par rapport à l'acide nitrique (800 CPS) car l'adsorption du cuivre sur les parois en verre est favorisée à pH neutre.

Cette étude montre une contamination importante en cuivre dans les divers contenants, que ce soit en verre ou en plastique, de l'ordre du ppb. Ainsi, la réalisation préalable de 3 lavages à l'acide nitrique 1% de ces contenants semble nécessaire pour diminuer considérablement la présence de cuivre contaminant dans ces derniers et retrouver le fond dû à l'instrumentation, de l'ordre de la dizaine de ppt. Les résultats n'ont révélé aucune contamination dans les produits chimiques susceptibles d'être utilisés dans cette étude à l'exception du tampon Mops (acide 3-morpholino-1-propanesulfonique) qui présente une contamination estimée à 1 ppb. Ce tampon, qui présente pourtant des avantages pour notre étude (faible pouvoir de complexation du cuivre), ne sera pas utilisé dans la suite de nos études. Les tampons Tris et Hepes ne présentent quant à eux aucune contamination et pourront être utilisés.

Tableau II-3 - Etude de contamination du cuivre dans le matériel de laboratoire et les produits chimiques par ICP-MS.

Valeur de référence	Signal ⁶⁵ Cu dans HNO ₃ 1% (CPS)*	Concentration en cuivre (ppb)
Standard de cuivre dans HNO ₃ 1%	140 000	5
Matériel de laboratoire	Signaux ⁶⁵Cu dans HNO₃ 1% (CPS)*	Contamination en cuivre estimée (ppb)
Flacon CE (1500 µL) avant lavage	100 000	3,6
Flacon CE après lavage avec HNO ₃ 1%	800	< 0,03
Bouteille en verre pour électrolytes et acide (1L) avant lavage	45 000	1,6
Bouteille en verre pour électrolytes et acide après lavage avec HNO ₃ 1%	800	< 0,03
Bouteille solvant additionnel (0,5L) avant lavage	35 000	1,25
Bouteille solvant additionnel après lavage avec HNO ₃ 1%	800	< 0,03
Tube plastique pour échantillons (15 mL) avant lavage	75 000	2,7
Tube plastique pour échantillons après lavage avec HNO ₃ 1%	800	< 0,03
Produits chimiques	Signaux ⁶⁵Cu (CPS)*	Contamination en cuivre estimée (ppb)
H ₂ O	600	< 0,03
NaCl 15 mM	750	< 0,03
Tris 10 mM	650	< 0,03
Mops 10 mM	25 000	0,9
Hepes 10 mM	650	< 0,03
EDTA / NTA / IDA 2,5 mM	850 / 700 / 750	< 0,03

* mesures réalisées pendant 2 minutes en analyse résolue en temps avec un RSD < 8%

3.1.2. Etude de la sorption du cuivre

3.1.2.a) Choix du capillaire

Le capillaire de silice fondue, classiquement utilisé en CE, est caractérisé par une charge de surface négative due à la présence de groupements silanols déprotonés à pH supérieur à 2. Les métaux, généralement des cations divalents ou trivalents, vont avoir tendance à interagir avec ces sites de charge opposée par interactions électrostatiques. La sorption du cuivre peut être minimisée en supprimant ou en modifiant la charge de surface du capillaire. Pour ce faire, deux approches peuvent être envisagées : le revêtement neutre ou positif.¹³¹

(i) Revêtement permanent avec HPC

Le revêtement permanent consiste à immobiliser thermiquement un polymère sur la paroi du capillaire. Par exemple, l'immobilisation thermique d'un polymère neutre tel que le HPC permet de neutraliser la surface du capillaire et limite ainsi l'adsorption du cuivre sur la paroi. Bien que le HPC ait été reconnu comme pouvant interagir avec le cuivre,¹³² ces interactions sont largement limitées par rapport aux interactions avec les groupements silanols. Le protocole d'immobilisation adapté de celui proposé par Shen *et al.*¹³³ est décrit dans la partie expérimentale de ce manuscrit (**annexe 1**). L'avantage principal de ce type de capillaire est qu'il ne nécessite pas d'étape de régénération entre les séparations.

L'efficacité de l'immobilisation thermique avec HPC a été étudiée en réalisant une succession de mesures de μ_{eo} par la méthode de Vigh en utilisant l'acétone comme marqueur et le Tris 10 mM NaCl 15 mM à pH 7,4 comme électrolyte. En effet, la μ_{eo} est fortement influencée par la charge de surface du capillaire (**équation II-5**). La résistance du revêtement aux lavages à pH neutre et à pH acide a été étudiée en réalisant des lavages pendant 10 min à 5 psi entre chaque mesure de μ_{eo} , soit avec l'électrolyte, soit avec de l'acide nitrique 1%. Les mobilités déterminées ont alors été comparées à celles obtenues sur un capillaire de silice vierge (**figure II-8**).

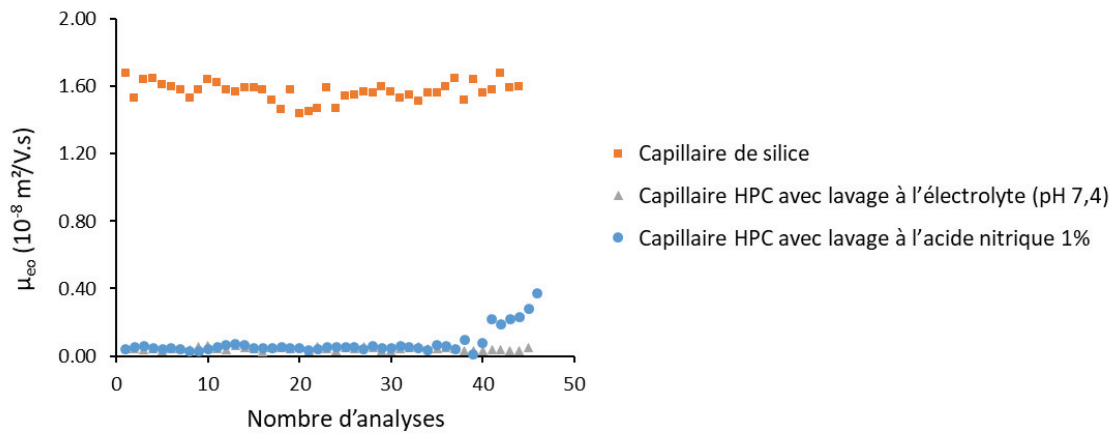


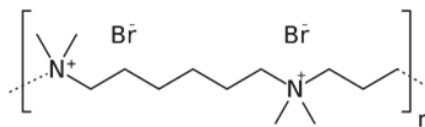
Figure II-8 - Etude de l'efficacité de l'immobilisation thermique avec HPC et de sa stabilité après lavages à l'électrolyte (pH neutre) ou à l'HNO₃ 1% (pH acide). Les μ_{eo} ont été déterminées par la méthode de Vigh.

Les données montrent l'efficacité de la neutralisation de la surface du capillaire après revêtement avec HPC. En effet, la μ_{eo}, initialement égale à 1,5x10⁻⁸ m².V⁻¹.s⁻¹ sur capillaire de silice vierge, a bien été supprimée (μ_{eo} = 0,05x10⁻⁸ m².V⁻¹.s⁻¹). De plus, l'immobilisation est stable au moins jusqu'à la réalisation de 45 analyses pour des lavages intermédiaires à l'électrolyte à pH neutre. En ce qui concerne les lavages à pH acide, le revêtement reste stable jusqu'à 40 analyses successives.

Puisque la présence d'HPC à la surface du capillaire annule la μ_{eo}, l'application d'une pression en complément du voltage sera nécessaire pour permettre une séparation en un temps raisonnable. Ce type de capillaire sera nommé capillaire HPC dans la suite de ce rapport.

(ii) Revêtement dynamique positif avec le polybrène

Le revêtement dynamique consiste quant à lui à immobiliser un composé (polymère, tensioactif...) sur la surface du capillaire par des interactions non-covalentes (électrostatiques, hydrophobes ou liaisons hydrogène), entre les groupements silanols et le composé. L'équilibre qui s'établit à la surface est alors réversible et la présence du modificateur de flux dans l'électrolyte est souvent indispensable. Le polybrène (**figure II-9**) est largement utilisé pour inverser la charge de surface des capillaires classiques.



Polybrène

Figure II-9 - Formule semi-développée du polybrène.

En effet, l'atout principal du polybrène est qu'il s'agit d'un composé organique polycationique, permettant un recouvrement dynamique efficace, grâce à la présence de différents sites d'interaction. Ainsi, la stabilité de ce revêtement peut être conservée sur des temps compatibles avec la durée d'une analyse, hors état d'équilibre. Le revêtement positif du capillaire avec le polybrène est alors réalisé en amont de la séparation par lavage du capillaire avec une solution de polybrène à 0,1% et ne nécessite pas sa présence dans l'électrolyte de séparation. La μ_{eo} résultante a été déterminée par injection d'acétone (marqueur neutre) dans du Tris 10 mM NaCl 15 mM à pH 7,4, avec l'application d'un voltage de -20 kV. La μ_{eo} , égale à $-4,7 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ montre que cette dernière est bien inversée par rapport au capillaire de silice. Les études sur la résistance du revêtement polybrène aux lavages à pH neutre ou à pH acide ont montré que 5 minutes suffisent pour régénérer le revêtement après lavage à l'électrolyte et que 30 minutes sont nécessaires en ce qui concerne les lavages à l'acide.

3.1.2.b) Sorption sur les parois en verre : influence du liquide additionnel

La paroi des parties en verre de l'appareillage (chambre de nébulisation, nébuliseur...) sont des parties sensibles car les groupements SiO^- ont une forte tendance à adsorber le cuivre, pouvant conduire à la dissociation du complexe $\text{A}\beta\text{-Cu(II)}$. Pour limiter ce phénomène, l'influence du liquide additionnel a été étudiée en se basant sur la répétabilité des aires obtenues pour la quantification du cuivre en CE-ICP-MS.

Pour ce faire, une solution contenant 100 μM d'EDTA et 10 μM de Cu(II) a été injectée en CE en triplicat et entraînée jusqu'à l'ICP-MS par application d'une pression de 1,5 psi dans un capillaire HPC avec du Tris 10 mM NaCl 15 mM à pH 7,4 comme électrolyte. Le complexe EDTA-Cu(II) a été détecté en ICP-MS à $m/z = 65$ avec différents solvants additionnels : le Tris 5 mM, l'acide HNO_3 1% et le Tris 10 mM en présence de 10 μM d'EDTA. L'acide nitrique et l'ajout d'EDTA ont été choisis dans le but de limiter la sorption du cuivre sur les parois en verre, soit via la protonation des groupements silanols, soit par effet chélate. Le **tableau II-4** regroupe les résultats obtenus.

Tableau II-4 - Evolution de la répétabilité de l'analyse d'EDTA-Cu(II) par couplage CE-ICP-MS pour en fonction de la nature du solvant additionnel.

Conditions : capillaire (75 μm d.i. x 64 cm) avec revêtement HPC, tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : 1,5 psi, 25°C, détection : ICP-MS à $m/z = 65$ à 64 cm.

Nature du solvant additionnel	t_m (min)	Aires ^{65}Cu (coups)	Hauteur (CPS)
Tris 5 mM	$2,58 \pm 0,02$	$100\ 000 \pm 20\ 000$	$11\ 000 \pm 2\ 000$
HNO_3 1%	$2,59 \pm 0,01$	$72\ 000 \pm 2\ 000$	$8\ 500 \pm 500$
Tris 5 mM + EDTA 10 μM	$2,60 \pm 0,01$	$70\ 000 \pm 1\ 000$	$8\ 200 \pm 400$

On remarque une répétabilité excellente pour les temps de migration, avec des écarts-types relatifs inférieurs à 1% et ce, quel que soit le liquide additionnel. En revanche, la répétabilité des aires et des hauteurs est dépendante de la nature du liquide additionnel utilisé. En ce qui concerne le Tris 5 mM, la répétabilité est très mauvaise, avec des écarts-types relatifs d'environ 20%. En plus d'être très peu répétables, les aires obtenues dans ces conditions sont surestimées, avec une augmentation d'environ 30% par rapport aux deux autres solvants. A contrario, les données montrent une bonne répétabilité avec l'acide ou le Tris contenant de l'EDTA comme solvant de compensation, avec des écarts-types relatifs d'environ 3% pour les aires et 5% pour les hauteurs. Ces résultats témoignent en faveur de l'efficacité de l'acide et de l'EDTA pour limiter la sorption du cuivre sur les parois en verre.

Bien que l'acide nitrique soit adapté pour limiter la sorption du cuivre sur les parois en verre, il ne pourra pas être utilisé pour notre étude. En effet, la séparation de peptides, chargés négativement, implique l'application d'un champ électrique localisant la cathode à l'entrée du capillaire. L'application du champ électrique va alors entraîner les protons vers l'entrée du capillaire et conduire à un gradient de pH dans le capillaire au cours de la séparation.

En revanche, l'ajout d'un chélatant de Cu(II) tel que l'EDTA dans le solvant additionnel est une très bonne option. Ce ligand permet de piéger le cuivre libre et d'éviter la sorption du cuivre sur les pièces en verre de l'ICP-MS. Une solution de Tris 5 mM à pH 7,4 avec 10 μ M d'EDTA a donc été sélectionnée comme liquide additionnel.

3.1.2.c) Sorption sur les électrodes

Les électrodes sont elles aussi une source importante de sorption du cuivre. En effet, l'électrodépôt de cuivre pouvant avoir lieu lors de l'application de la tension engendre l'accumulation de Cu(II) à leur surface. Le cuivre ainsi déposé peut être relargué et causer des difficultés lors de la quantification. Pour limiter ce phénomène, il est important que l'électrode ne trempe pas dans l'échantillon lors de l'injection mais qu'elle assure l'application de la tension lors de la séparation. Ainsi, nous avons alors envisagé l'utilisation d'une électrode courte ainsi que l'adaptation des volumes d'électrolyte et d'échantillon (1500 μ L pour l'électrolyte de séparation, 900 μ L pour l'électrolyte de lavage et 40 μ L pour l'échantillon).

De la même façon que pour le choix du solvant additionnel, la répétabilité en présence d'une électrode courte a été vérifiée avec le complexe EDTA-Cu(II), en le mobilisant grâce à une pression de 2 psi dans un capillaire HPC avec Tris 5 mM EDTA 10 μ M comme solvant additionnel. La répétabilité a été comparée à celle obtenue sans électrode ou avec une électrode normale, en réalisant 3 répétitions dans chaque cas (**tableau II-5**).

Tableau II-5 - Etude de la répétabilité pour l'analyse d'EDTA-Cu(II) en CE-ICP-MS en fonction de la taille de l'électrode. Conditions : capillaire (75 μm d.i. x 64 cm) avec revêtement HPC, tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : 2 psi, 25°C, détection : ICP-MS à $m/z = 65$ à 64 cm.

	tm (min)	Aires ^{65}Cu (coups)	Hauteur (CPS)
Sans électrode	2,60 \pm 0,01	70 000 \pm 1 000	8 200 \pm 400
Électrode normale	2,62 \pm 0,01	110 000 \pm 10 000	12 000 \pm 2 000
Électrode courte	2,64 \pm 0,01	68 000 \pm 1 000	8 000 \pm 400

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation d'une électrode courte offre une répétabilité des aires identique à celle obtenue sans électrode (écart-type relatif < 2%). On remarque que l'utilisation d'une telle électrode permet d'améliorer de façon significative la répétabilité par rapport à l'utilisation d'une électrode de taille normale (écart-type relatif \sim 10%), qui aura tendance à adsorber le cuivre lors de l'injection.

Enfin, l'effet de l'application du voltage sur la répétabilité des aires a été étudié. Pour ce faire, une solution composée de 100 μM d'EDTA et 10 μM de Cu(II) a été séparée à -20kV + 0,6 psi ou à -20kV + 0,2 psi en triplicat sur un capillaire HPC avec du Tris 10 mM NaCl 15 mM à pH 7,4 comme électrolyte. Les électrophérogrammes sont représentés dans la **figure II-10** et les répétabilités obtenues sont regroupées dans le **tableau II-6** et comparées avec celles obtenues sans l'application de voltage.

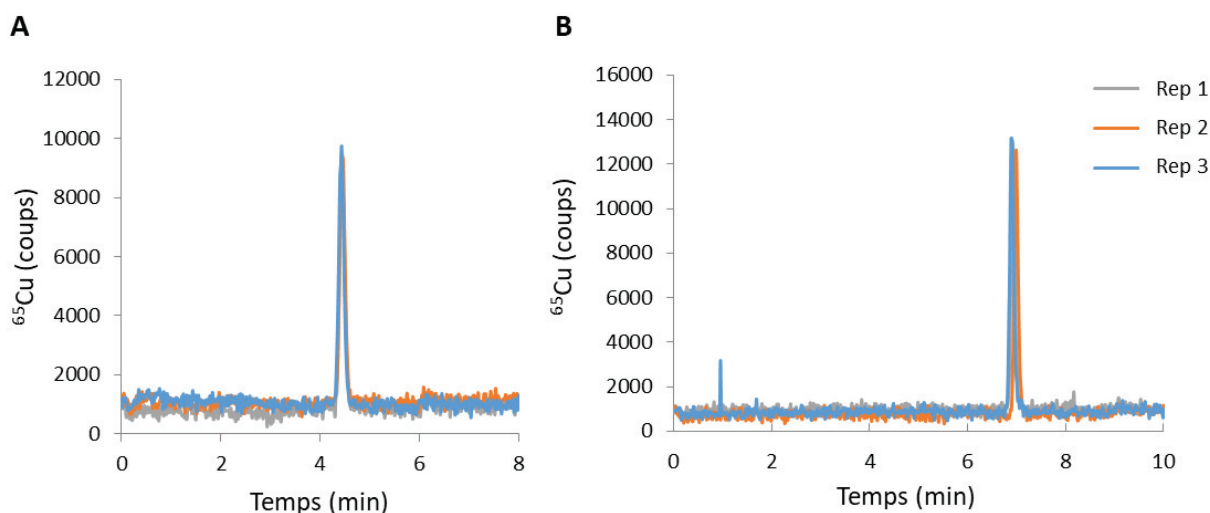


Figure II-10 - Electrophérogramme pour la séparation d'EDTA-Cu(II) en CE-ICP-MS à -20kV + 0,6 psi (A) et -20 kV + 0,2 psi (B), avec une électrode courte et du Tris 10 mM + EDTA 10 μM comme solvant additionnel. Conditions : capillaire (75 μm d.i. x 64 cm) avec revêtement HPC, tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, 25°C, détection : ICP-MS à $m/z = 65$ à 64 cm.

Tableau II-6 - Etude de la répétabilité pour l'analyse d'EDTA-Cu(II) en CE-ICP-MS en présence ou non de voltage, avec l'utilisation d'une électrode courte et du Tris 10 mM + EDTA 10 μ M comme solvant additionnel.

	tm (min)	Aires ⁶⁵Cu (coups)	Hauteur (CPS)
2 psi	2,64 \pm 0,01	68 000 \pm 1 000	8 000 \pm 400
-20 kV + 0,6 psi	4,44 \pm 0,01	72 000 \pm 2 000	9 100 \pm 500
-20 kV + 0,2 psi	6,92 \pm 0,04	74 000 \pm 2000	12 900 \pm 600

Les données montrent aucune dégradation de la répétabilité pour EDTA-Cu(II) et cette dernière reste excellente avec des écarts-types relatifs inférieurs à 1% sur les temps de migration et inférieurs à 3% pour les aires.

En résumé, l'ajout d'EDTA dans le liquide additionnel et l'utilisation d'une électrode courte ont permis d'améliorer considérablement la répétabilité du couplage sur le plan quantitatif passant de 20 à moins de 3% en écart-type relatif sur les aires obtenues pour ⁶⁵Cu avec l'analyse du complexe EDTA-Cu(II).

3.2. L'étude d'un complexe labile : un enjeu en science séparative

Afin de limiter la dissociation des complexes liés de façon non covalente lors de la séparation, les effets du voltage en fonction (1) de la nature des complexes, (2) de la surface du capillaire et (3) de l'électrolyte ont été étudiés dans le but de déterminer les conditions électrophorétiques les plus adaptées.

3.2.1. Influence du complexe étudié

Le cuivre est l'un des métaux les plus difficiles à analyser en science séparative car il présente des cinétiques rapides et aura tendance à former des complexes labiles, enclins à la dissociation.¹²⁰ Ces cinétiques peuvent toutefois être ralenties dans le cas de complexes stabilisés par effet chélate, comme dans le cas des complexes avec l'EDTA, ou en présence de larges ligands polydentates tels que les protéines.

L'effet du voltage sur des complexes enclins à la dissociation ($A\beta_{1-16}$ -Cu(II) et NTA-Cu(II)) a été comparé à l'influence qu'il peut avoir sur le complexe EDTA-Cu(II). Des solutions contenant 100 μ M de ligand et 10 μ M de Cu(II) ont été introduites dans un capillaire avec un revêtement HPC et différents voltages ont été appliqués en présence de Tris 10 mM NaCl 15 mM à pH 7,4 comme électrolyte. Une pression de 0,3 psi a été appliquée en complément du voltage pour pallier l'absence de μ_{eo} . Afin de comparer l'effet des voltages, les aires ont été normalisées en divisant les aires obtenues par une valeur de référence déterminée par l'application d'une pression de 1,5 psi sans voltage. La valeur de référence utilisée est propre à chaque complexe et permet de négliger les variations dues à la préparation de l'échantillon. Les taux de recouvrement obtenus sont représentés dans la **figure II-11** pour les complexes EDTA-Cu(II) (A), $A\beta_{1-16}$ -Cu(II) (B) et NTA-Cu(II) (C).

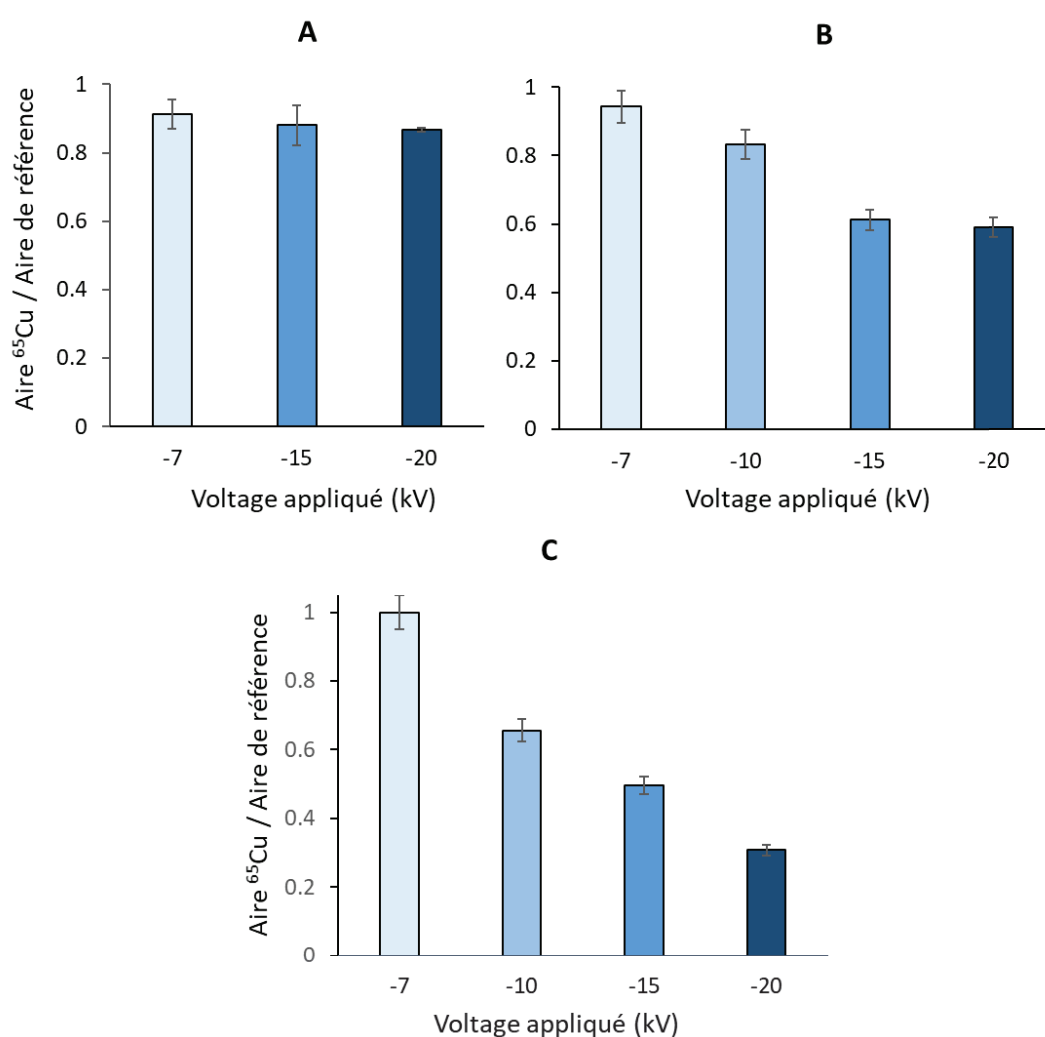


Figure II-11 : influence du voltage sur les taux de recouvrement du cuivre pour la séparation des complexes EDTA-Cu(II) (A), $A\beta_{1-16}$ -Cu(II) (B) et NTA-Cu(II) (C) en CE-ICP-MS.

Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μ m d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 μ l pendant 5 sec, séparation : différents voltages avec une pression assistée de 0,3 psi, 25°C, détection ICP-MS à m/z = 65 à 64 cm.

En ce qui concerne le complexe EDTA-Cu(II), les résultats montrent un effet négligeable du voltage appliqué sur le recouvrement des aires, avec des taux de recouvrement proche de 1, quel que soit le voltage appliqué, avec un écart-type relatif entre les taux de recouvrement obtenus pour les divers voltages de 2%. Un tel résultat était attendu pour ce complexe qui n'est pas enclin à la dissociation, grâce au fort effet chélate de l'EDTA.

En revanche, il est à noter un effet significatif du voltage appliqué sur les taux de recouvrement du cuivre pour la séparation des complexes $A\beta_{1-16}$ -Cu(II) et NTA-Cu(II). La diminution des taux de recouvrement lors de l'augmentation du voltage montre la dissociation de ces complexes, due à leur labilité. Cet effet est plus important sur le complexe NTA-Cu(II), avec un taux de recouvrement de 30% à -20kV alors qu'il est de 60% pour $A\beta_{1-16}$ -Cu(II). La différence observée entre ces deux complexes peut notamment être expliquée par la différence de μ_{ep} des ligands libres et complexés. Les μ_{ep} , déterminées par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) en utilisant un large excès de cuivre sont regroupées dans le **tableau II-7**. La détermination de ces mobilités sera détaillée dans le chapitre 3 de ce manuscrit pour le peptide $A\beta$ et dans l'annexe 3 pour le NTA.

Tableau II-7 - Mobilités électrophorétiques des ligands $A\beta_{1-16}$ et NTA libres ou complexés au cuivre, déterminées par ACE.

Ligand	Métal	μ_{ep} ligand ($10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	μ_{ep} complexe ($10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
$A\beta_{1-16}$	Cuivre	$-1,1 \pm 0,1$	$-0,82 \pm 0,01$
NTA	Cuivre	$-4,96 \pm 0,01$	$-2,43 \pm 0,01$

Il est à noter une différence significative entre $\mu_{ep}(\text{NTA})$ et $\mu_{ep}(\text{NTA-Cu(II)})$ alors que $\mu_{ep}(A\beta_{1-16})$ et $\mu_{ep}(A\beta_{1-16}\text{-Cu(II)})$ sont très proches. La différence de mobilités entre le ligand libre et le ligand complexé est 10 fois plus grande pour NTA que pour le peptide $A\beta_{1-16}$. Cette différence significative conduirait à une fuite du cuivre hors de la zone de migration du complexe plus rapide, diminuant ainsi la capacité de réassociation après dissociation. Pour limiter le phénomène de dissociation, il est donc nécessaire d'adapter le voltage appliqué lors de la séparation par rapport au complexe étudié.

3.2.2. Influence du tampon de séparation

Un large panel de tampons est disponible pour les études à pH physiologique. Parmi eux, on retrouve en général le Tris, le phosphate, l'Hepes et le Mops. Le tampon phosphate, bien que classiquement utilisé pour les études en CE à pH 7,4,^{112,113,115} ne pourra être utilisé dans cette étude du fait de sa forte tendance à former des complexes insolubles avec le cuivre : $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ avec un produit de solubilité de $1,4 \times 10^{-37}$.⁵⁰ En ce qui concerne le Mops, nous avons vu précédemment qu'il ne pourra être utilisé à cause de sa contamination en cuivre (cf. partie II-3.1.1). Notre choix s'est donc porté sur le Tris et l'Hepes, qui ne conduisent pas à la formation d'espèces insolubles en présence de cuivre et ne présentent pas de contamination en cuivre.

L'effet du tampon de séparation (Tris ou Hepes) sur la dissociation d' $\text{A}\beta_{1-16}\text{-Cu(II)}$ et de NTA-Cu(II) a donc été étudié. De la même façon que précédemment, des solutions contenant 100 μM de ligand et 10 μM de Cu(II) ont été injectées et séparées en CE-ICP-MS dans un capillaire HPC avec de l'Hepes 10 mM NaCl 15 mM à pH 7,4 comme électrolyte. Les résultats obtenus, regroupés avec ceux obtenus précédemment dans le Tris, sont représentés dans la **figure II-12**.

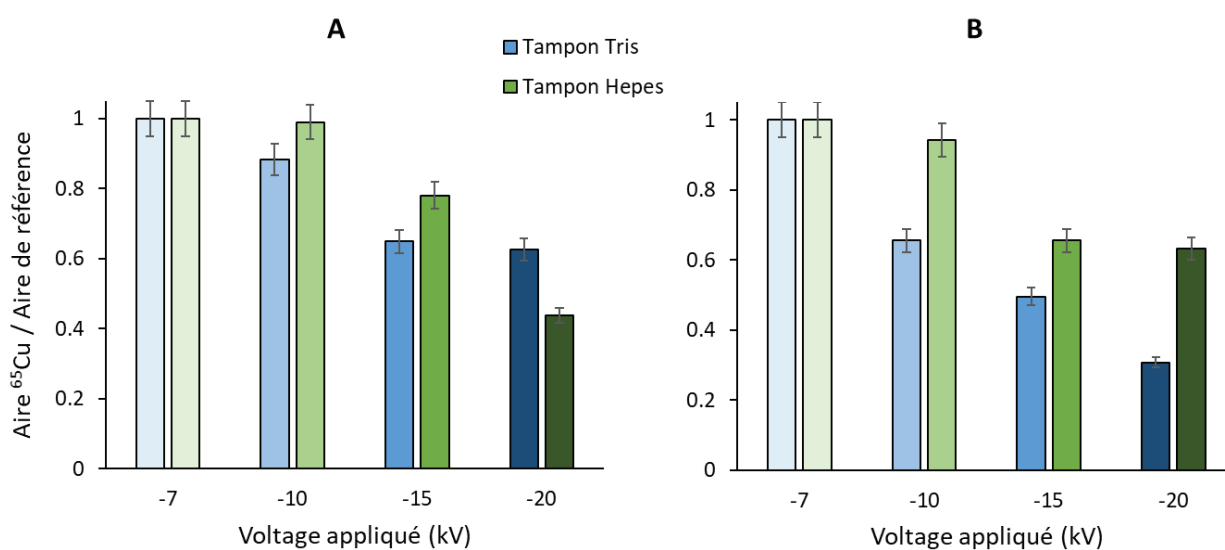


Figure II-12 - Influence du tampon sur les taux de recouvrement du cuivre pour la séparation des complexes $\text{A}\beta_{1-16}\text{-Cu(II)}$ (A) et NTA-Cu(II) (B) en CE-ICP-MS à différents voltages.

Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4 (bleu) ou 10 mM Hepes, 15 mM NaCl à pH 7,4 (vert), injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : différents voltages avec une pression assistée de 0,3 psi, 25°C, détection ICP-MS à $m/z = 65$ à 64 cm.

L'analyse des résultats obtenus dans les deux tampons montre que les taux de recouvrement dans l'Hepes sont supérieurs à ceux obtenus dans le Tris, quels que soient les complexes et les voltages appliqués, à l'exception de la séparation réalisée à -20 kV pour le complexe $A\beta_{1-16}$ -Cu(II). Ces données indiquent clairement que la nature de l'électrolyte influence la dissociation et que la présence d'Hepes semble avoir un effet moindre sur la dissociation. En ce qui concerne le complexe $A\beta_{1-16}$ -Cu(II), les taux de recouvrement ont augmenté de 10% dans l'Hepes à -10 et -15 kV. De plus, il est à noter que la dissociation du complexe NTA-Cu(II) est particulièrement moins importante dans l'Hepes, avec un taux de recouvrement de 60% à -20kV alors qu'il est de seulement 30% dans le Tris. Ces différences pourraient être expliquées par :

- la présence d'interactions compétitives, plus importantes avec le Tris qu'avec l'Hepes. En effet, le Tris est largement connu pour interagir avec Cu(II) en formant des complexes Tris : Cu(II) de stœchiométries 1 : 1 et 2 : 1 avec des constantes d'affinité de $5,78 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ et $4,46 \times 10^6 \text{ M}^{-2}$ respectivement.¹³⁴ L'Hepes est également capable de s'associer avec le cuivre mais avec une constante plus faible, estimée à $1,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.¹³⁵
- la formation d'un complexe ternaire NTA-Cu(II)-Hepes plus stable.¹³⁶

Un effet combiné de ces deux phénomènes est également envisageable.

3.2.3. Influence du capillaire

L'influence de la nature du capillaire sur la dissociation de NTA-Cu(II) et $A\beta_{1-16}$ -Cu(II) a également été étudiée. Pour ce faire, une solution contenant 100 μM de ligand et 10 μM de Cu(II) a été injectée et séparée en CE-ICP-MS dans les capillaires HPC ou polybrène avec du Tris 10 mM NaCl 15 mM à pH 7,4 comme électrolyte. Les résultats obtenus sont représentés dans la **figure II-13**.

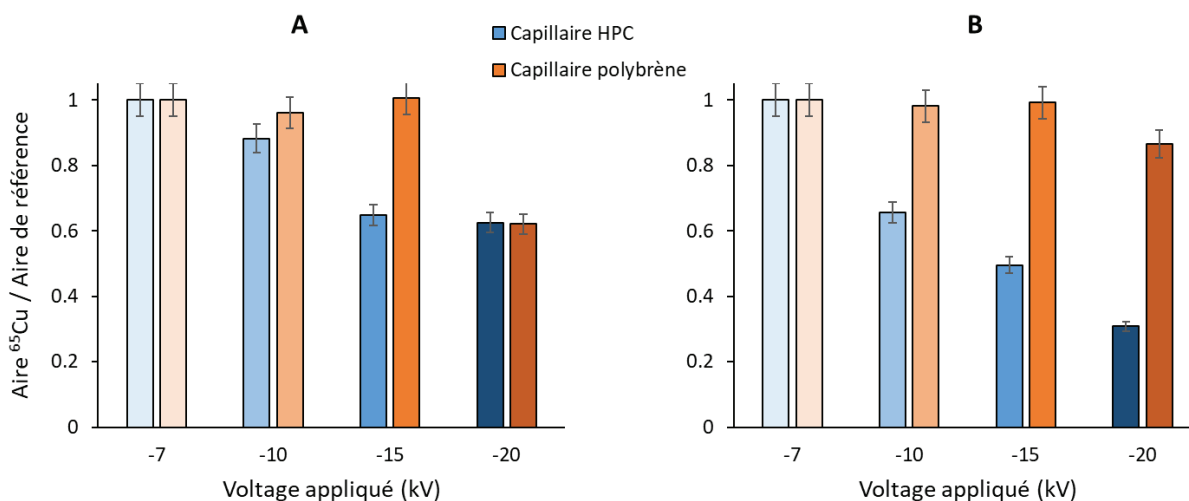


Figure II-13 - Influence de la surface du capillaire sur les taux de recouvrement du cuivre pour la séparation des complexes $A\beta_{1-16}$ -Cu(II) (A) et NTA-Cu(II) (B) à différents voltages.

Conditions : capillaire (75 μm d.i. x 64 cm) avec revêtement HPC (bleu) ou polybrène (orange), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : différents voltages avec une pression assistée de 0,3 psi dans HPC et sans pression dans polybrène, 25°C, détection ICP-MS à $m/z = 65$ à 64 cm.

Les données montrent que les taux de recouvrement sont largement supérieurs pour les séparations réalisées dans le capillaire polybrène par rapport à celles réalisées dans le capillaire HPC, quels que soient les complexes et les voltages appliqués. Les taux de recouvrement ont diminué de manière significative dès l'application de -10 kV dans un capillaire HPC. Dans un capillaire polybrène en revanche, seule la séparation du complexe $A\beta_{1-16}$ -Cu(II) à -20 kV a montré une diminution significative du taux de recouvrement (environ égal à 60%).

Alors que la dissociation des deux complexes semble inévitable lors de l'application d'un voltage supérieur à 7kV dans un capillaire revêtu par HPC, les données suggèrent qu'il est possible d'appliquer un voltage inférieur ou égal à -15 kV sans craindre la dissociation de ces complexes dans un capillaire polybrène. Ces observations témoignent en faveur d'une adsorption du cuivre sur la surface du capillaire HPC. La surface positive du polybrène aura quant à elle tendance à limiter la sorption du cuivre et donc la dissociation des complexes.

En prenant en compte les effets de dissociation, les séparations en CE-ICP-MS seront réalisées à -15 kV dans les capillaires revêtus de manière dynamique avec le polybrène et à -7 kV assisté par une pression de 0,3 psi dans les capillaires recouverts de HPC immobilisé thermiquement.

4. Performances du couplage CE-ICP-MS pour l'analyse de complexe de cuivre

Les performances du couplage CE-ICP-MS pour l'analyse de complexe de cuivre (répétabilité, linéarité et limite de quantification) ont été évaluées en utilisant un capillaire revêtu de façon permanente avec le HPC. L'avantage de ce revêtement par rapport au revêtement dynamique avec le polybrène est qu'il ne nécessite pas d'étape de régénération entre les analyses.

4.1. Répétabilité

La répétabilité des temps de migration, des aires et des hauteurs en CE-ICP-MS a été évaluée à partir d'une solution contenant 100 μ M de peptide $A\beta_{1-16}$ en présence de 10 μ M de Cu(II). Trois séparations successives ont été réalisées à -7 kV + 0,3 psi dans un capillaire HPC avec 10 mM de Tris et 15 mM de NaCl à pH 7,4 comme électrolyte. Les résultats obtenus pour la détection de ^{65}Cu sont résumés dans le **tableau II-8**.

Tableau II-8 - Temps, aire et hauteur pour la séparation d'une solution de 100 μM de peptide $\text{A}\beta_{1-16}$ et 10 μM de Cu(II) en CE-ICP-MS.

Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -7 kV avec une pression assistée de 0,3 psi, 25°C, détection : ICP-MS à $m/z=65$.

	tm (min)	Aires ^{65}Cu (coups)	Hauteur (CPS)
Moyenne	13,7 \pm 0,6	230 000 \pm 10 000	3 200 \pm 200

Il est à noter une bonne répétabilité de la séparation du complexe $\text{A}\beta_{1-16}\text{-Cu(II)}$, avec des écarts-types relatifs inférieurs à 4% pour les temps de migration et les aires et à 6% pour les hauteurs.

4.2. Linéarité

La linéarité de la détection de ^{65}Cu par CE-ICP-MS a été évaluée sur les complexes EDTA-Cu(II) et $\text{A}\beta_{1-16}\text{-Cu(II)}$. Pour cela, diverses solutions ont été préparées pour les deux complexes, avec différentes concentrations en ligand et avec différents rapports ligand : Cu(II). Ces solutions ont été injectées et séparées dans un capillaire HPC avec du Tris 10 mM NaCl 15 mM à pH 7,4 comme électrolyte. Les résultats obtenus pour la détection de ^{65}Cu sont regroupés dans les **tableaux II-9 et II-10** pour EDTA-Cu(II) et $\text{A}\beta_{1-16}\text{-Cu(II)}$ respectivement et les courbes de calibration sont représentées dans la **figure II-14**.

Tableau II-9 - Temps de migration, aires et hauteurs de pic pour la séparation d'EDTA-Cu(II) en CE-ICP-MS avec différentes concentrations et différents rapports en cuivre.

Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -7 kV avec une pression assistée de 0,3 psi, 25°C, détection : ICP-MS à $m/z=65$

[EDTA] μM	[Cu(II)] μM	Aire ^{65}Cu (coups)	Hauteur (CPS)
25	12,5	104 000 \pm 5 000	16 500 \pm 500
50	25	193 000 \pm 8 000	30 000 \pm 1 000
100	50	320 000 \pm 12 000	55 000 \pm 1 000
100	20	140 000 \pm 8 000	22 000 \pm 500
100	10	65 700 \pm 4 000	11 000 \pm 300
100	5	37 000 \pm 3 000	5 800 \pm 200

Tableau II-10 - Temps de migration, aires et hauteurs de pic pour la séparation d'Aβ₁₋₁₆-Cu(II) en CE-ICP-MS avec différentes concentrations et différents rapports en cuivre.

Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -7 kV avec une pression assistée de 0,3 psi, 25°C, détection : ICP-MS à m/z=65.

[Aβ ₁₋₁₆] μM	[Cu(II)] μM	Aire ⁶⁵ Cu (coups)	Hauteur (CPS)
25	1,25	38 800	690
25	12,5	330 000	4 500
50	2,5	86 000	1 300
50	25	607 000	12 500
100	5	130 000 ± 4 000	2 000 ± 300
100	10	230 000 ± 10 000	3 200 ± 200
100	20	465 000 ± 2 000	7 000 ± 400
100	50	980 000 ± 40 000	15 000 ± 3 000

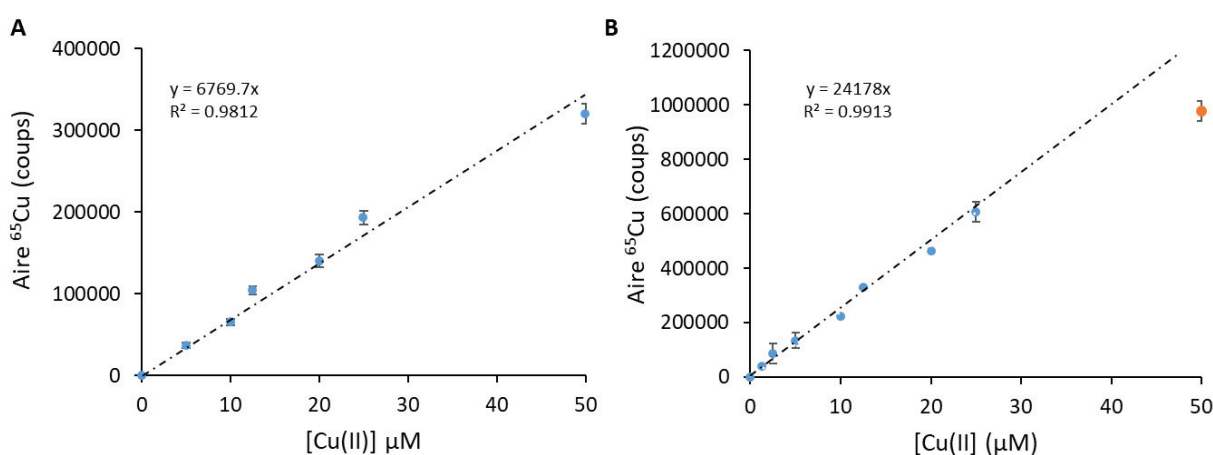


Figure II-14 - Courbes de calibration réalisées en CE-ICP-MS pour les complexes EDTA-Cu(II) (A) et Aβ₁₋₁₆-Cu(II) (B).

Les résultats montrent des régressions linéaires présentant une bonne corrélation : $R^2 = 0,981$ pour EDTA-Cu(II) et $R^2 = 0,991$ pour Aβ₁₋₁₆-Cu(II). Seul le point à 50 μM de cuivre pour le complexe avec le peptide Aβ₁₋₁₆ est un peu en dessous de la droite de calibration. Il est à noter que les coefficients directeurs différent pour les deux complexes en raison d'un changement de sensibilité du détecteur.

4.3. Limite de quantification

La limite de quantification de Cu(II) en CE-ICP-MS a été déterminée en utilisant les hauteurs obtenues pour le complexe Aβ₁₋₁₆-Cu(II) et l'équation II-12.

$$LOQ = \mu_{\text{bruit de fond}} + k\sigma_{\text{bruit de fond}}, \text{ avec } k = 10 \quad (\text{II-12})$$

avec $\mu_{\text{bruit de fond}}$ la valeur moyenne et $\sigma_{\text{bruit de fond}}$ l'écart-type du bruit de fond.

Dans ces conditions, avec un niveau de fond de 800 ± 30 coups, la limite de quantification pour Cu(II) est de 0,8 μM.

5. Conclusion du chapitre

Bien que le couplage CE-ICP-MS soit considéré comme un outil de choix grâce à la combinaison des avantages de la CE et de l'ICP-MS, ce chapitre a mis en lumière les difficultés analytiques rencontrées dans le cadre de notre étude, liées à l'analyse du cuivre à l'état de traces et à la séparation d'un complexe labile enclin à la dissociation.

Pour limiter les difficultés liées à l'analyse du cuivre, des études sur la contamination et la sorption de ce dernier ont été réalisées. Le cuivre s'est avéré être un contaminant fréquent dans les matériels de laboratoire (flacon, bouteille...) mais aussi dans certains produits chimiques comme le tampon Mops, avec des concentrations de l'ordre du ppb. Un lavage drastique à l'acide nitrique des contenants doit alors être réalisé avant les analyses pour garantir un système analytique propre. De plus, les études ont montré que le cuivre a une forte tendance à s'adsorber à la surface des capillaires, sur les parois en verre du système analytique et sur les électrodes. En ce qui concerne les capillaires, le capillaire de silice, avec une surface négative, a été proscrit à cause d'interactions importantes avec les ions Cu(II). Ces capillaires ont donc été revêtus de façon permanente avec HPC ou de façon dynamique avec le polybrène pour limiter ce phénomène. De plus, l'ajout d'EDTA dans le liquide additionnel de l'interface s'est montré efficace pour empêcher la sorption du cuivre sur la paroi des parties en verre de l'ICP-MS. Pour écarter tout problème lié à la sorption du cuivre sur les électrodes, une électrode courte a été utilisée au niveau de la cathode.

Les séparations électrophorétiques posent des difficultés pour l'analyse de complexes de cuivre labiles. Dans le but de garantir le maintien de ces complexes, les conditions opératoires ont été optimisées. L'influence du voltage appliqué sur la dissociation a été étudiée en fonction de la nature du complexe, de la surface du capillaire et du tampon de séparation. Alors que les taux de recouvrement obtenus en fonction de voltage n'ont montré aucun effet sur le complexe EDTA-Cu(II), les complexes plus labiles tels que $A\beta_{1-16}$ -Cu(II) et NTA-Cu(II) se sont montrés plus affectés par le phénomène de dissociation. Ce phénomène s'est avéré plus important dans le capillaire HPC que dans le capillaire polybrène, nécessitant l'application d'un faible voltage avec les capillaires HPC pour éviter la dissociation des complexes. Il est important d'avoir à l'esprit que les conditions choisies pour limiter la dissociation des complexes ne seront pas sans conséquence sur la résolution des séparations. En ce qui concerne les tampons, l'Hepes s'est avéré limiter la dissociation par rapport au Tris qui a un effet compétitif plus significatif.

Cette étude chronophage a permis de développer une méthode analytique robuste pour l'analyse du complexe $A\beta$ -Cu(II) et qui peut être étendue à l'étude d'autres complexes métalliques.





CHAPITRE III : Détermination de la constante de complexation d'A β -Cu(II)

De nombreuses études ont été consacrées à la détermination de la constante de complexation d'A β -Cu(II) pour :

- déterminer les origines de l'interaction du cuivre avec le peptide A β et comprendre les mécanismes liés à la formation d'espèces agrégées,
- développer des ligands capables de diminuer la toxicité associées à A β -Cu(II) en dissociant le complexe.

Cependant, la constante de complexation entre le peptide A β et Cu(II) ($K_{A\beta-Cu(II)}$) ne fait pas encore l'objet d'un consensus malgré les nombreuses études dans le domaine et les valeurs rapportées varient entre de $10^7 M^{-1}$ et $10^{11} M^{-1}$. Cette variation peut être due à la variété des techniques utilisées et encore plus significativement aux conditions expérimentales (nature du tampon notamment).^{137,138}

Dans ce contexte, nous nous proposons d'utiliser des méthodes alternatives basées sur l'électrophorèse capillaire afin de déterminer la constante de complexation de Cu(II) par le peptide A β . Dans un premier temps, l'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) a été utilisée, étant l'une des méthodes de référence pour la détermination des constantes. Dans un second temps, le couplage CE-ICP-MS mis en place précédemment a été sollicité pour déterminer la constante de complexation par compétition afin de fournir des informations complémentaires en étudiant la distribution du métal. Pour ce faire, le peptide A β_{1-16} a été utilisé comme modèle, car il contient le site de liaison de haute affinité du peptide mais n'est pas enclin à l'agrégation.

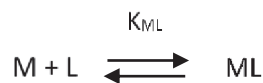
1. Etude de complexes métalliques par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE)

1.1. Principe de l'ACE

L'ACE est une technique électrophorétique largement utilisée pour mesurer les constantes d'affinité.^{139,140} Dans le cas des complexes métalliques, le ligand (L) (ou le métal M) est injecté en petite quantité et séparé dans un capillaire préalablement conditionné avec un électrolyte contenant une quantité croissante de métal (ou de ligand). Dans notre cas, c'est le ligand qui sera injecté, étant disponible en faible quantité. Basée sur l'étude de la variation des mobilités, l'ACE nécessite :

- que la complexation entre L et M, qui aura lieu lors de l'analyse, entraîne une modification du rapport charge/taille du ligand et donc une variation de sa mobilité,
- l'existence d'un équilibre dynamique au sein du capillaire lors de la séparation et donc des systèmes présentant des cinétiques d'association / dissociation rapides (ie. complexes labiles).¹⁴¹

Dans le cas d'une interaction 1:1, l'équilibre de complexation entre le métal (M) et le ligand (L) peut alors être défini par :



La constante (K_{ML}) relative à cet équilibre est décrite par la **relation III-1**, en assimilant activité et concentration :

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[L][M]} \quad (\text{III-1})$$

avec [L], [M] et [ML] les concentrations à l'équilibre en ligand libre, en métal libre et en complexe respectivement.

Le principe de l'ACE est schématisé dans la **figure III-1**.

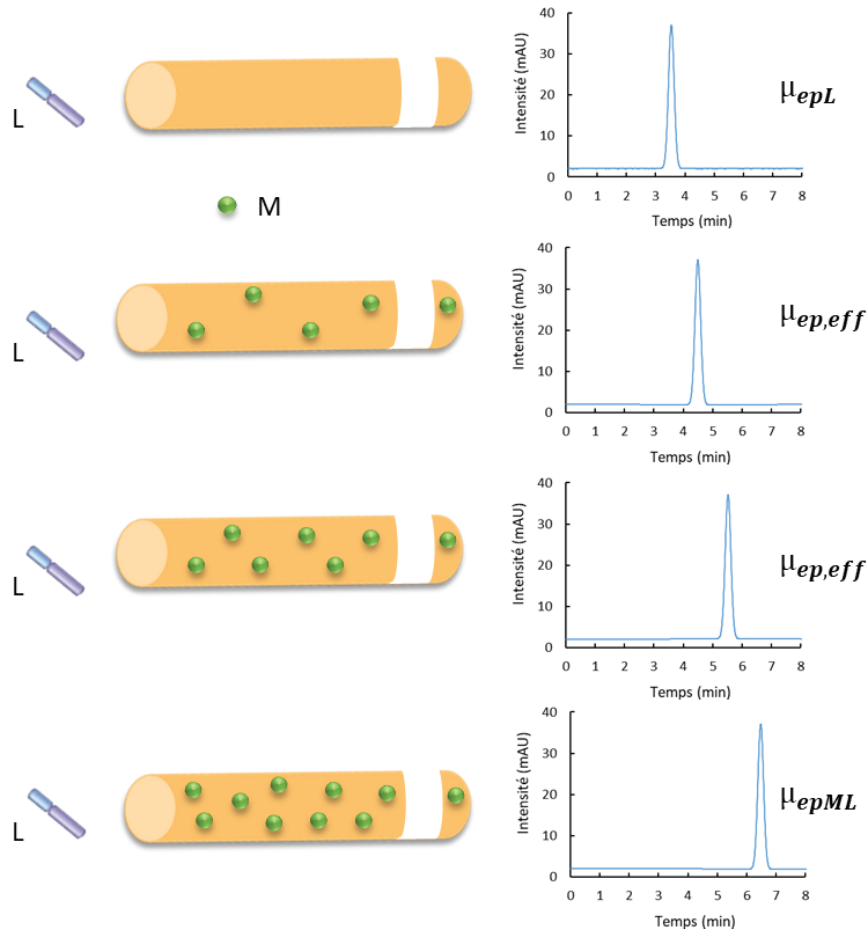


Figure III-1 - Schématisation du principe de l'électrophorèse capillaire d'affinité.

Lorsque le ligand est injecté dans un électrolyte contenant le métal, la mobilité effective résultante (μ_{eff}) du ligand en équilibre avec le métal est la moyenne des mobilités absolues des formes libre (μ_{epL}) et complexée (μ_{epML}), pondérées par leur fraction molaire respective :

$$\mu_{eff} = \frac{[L]}{[L]+[ML]} \mu_{epL} + \frac{[ML]}{[L]+[ML]} \mu_{epML} \quad (III-2)$$

Lorsque la concentration en métal augmente, la mobilité effective se déplace progressivement jusqu'à tendre vers la mobilité du complexe. La combinaison des **équations III-1** et **III-2** permet de définir la mobilité effective en fonction de K_{ML} (**équation III-3**) :

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_{epL} + \mu_{epML} * K_{ML} * [M]}{1 + K_{ML} * [M]} \quad (III-3)$$

Le tracé de la variation de la μ_{eff} du ligand en fonction de la concentration en métal présent dans l'électrolyte de séparation permet de déterminer :

- la μ_{ep} du ligand lié au métal (μ_{epML}) comme étant la valeur de μ_{eff} au plateau,
- la constante thermodynamique (K_{ML}) par régression non-linéaire ou linéaire.

L'isotherme d'association (équation III-3) peut directement être utilisée pour déterminer la constante de complexation par régression non-linéaire ou être transformée dans le but de réaliser un ajustement linéaire.^{140,142} Ces méthodes imposent la connaissance de la concentration en métal libre présent à l'équilibre. Il est possible d'assimiler la concentration en métal libre à l'équilibre à sa concentration initiale dans l'électrolyte de séparation si le métal est présent en large excès par rapport au ligand ou si la constante d'interaction est faible (du mM au μM).¹⁴³ Si ce n'est pas le cas, la détermination de la concentration en métal libre est nécessaire.

1.2. Détermination des mobilités électrophorétiques

L'ACE a été utilisée pour étudier la complexation des peptides $A\beta_{1-16}$ et $A\beta_{1-42}$ avec Cu(II) et Zn(II) . Pour ce faire, une solution contenant $100 \mu\text{M}$ de peptide a été injectée et séparée à $-20\text{kV} + 0,1 \text{ psi}$ dans un capillaire HPC ($64 \text{ cm} * 75 \mu\text{m}$) dans du Tris 10 mM NaCl 15 mM contenant une quantité croissante de métal. Une injection d'acétone a été réalisée simultanément afin de déterminer les mobilités effectives. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque concentration. L'évolution des temps de migration a été observée au moyen d'une détection UV à 200 nm à 11 cm et les électrophérogrammes obtenus ont été transformés en mobilogrammes grâce à la **relation II-9**.

Quelques mobilogrammes obtenus pour l'étude du peptide $A\beta_{1-16}$ à $100 \mu\text{M}$ en présence de cuivre sont représentés dans la **figure III-2**.

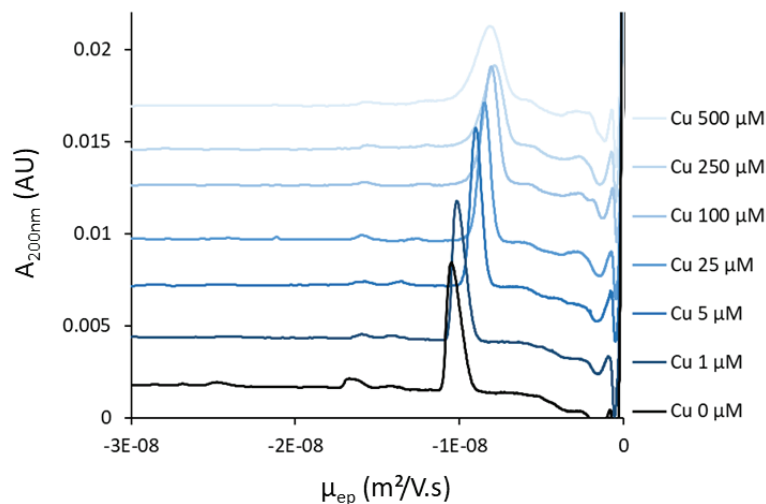


Figure III-2 - Mobilogrammes obtenus pour l'étude ACE du peptide $A\beta_{1-16}$ en présence de cuivre. Conditions : capillaire avec revêtement HPC ($75 \mu\text{m}$ d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : $0,5 \text{ psi}$ pendant 5 sec , séparation : -20 kV avec une pression assistée de $0,1 \text{ psi}$, 25°C , détection : UV 200 nm à 11 cm .

Dans le cas du peptide $A\beta_{1-42}$, on observe la présence de deux pics, caractéristiques des formes monomérique et oligomériques (cf. chapitre 4), dont la μ_{eff} varie en fonction de la concentration en métal dans l'électrolyte. La **figure III-3** et le **tableau III-1** regroupent les résultats obtenus pour le peptide $A\beta_{1-16}$ en présence de cuivre ou de zinc et pour les formes monomérique et oligomériques du peptide $A\beta_{1-42}$ en présence de cuivre. La présentation et la séparation des deux formes d'agrégation d' $A\beta_{1-42}$ seront développées dans le chapitre 4.

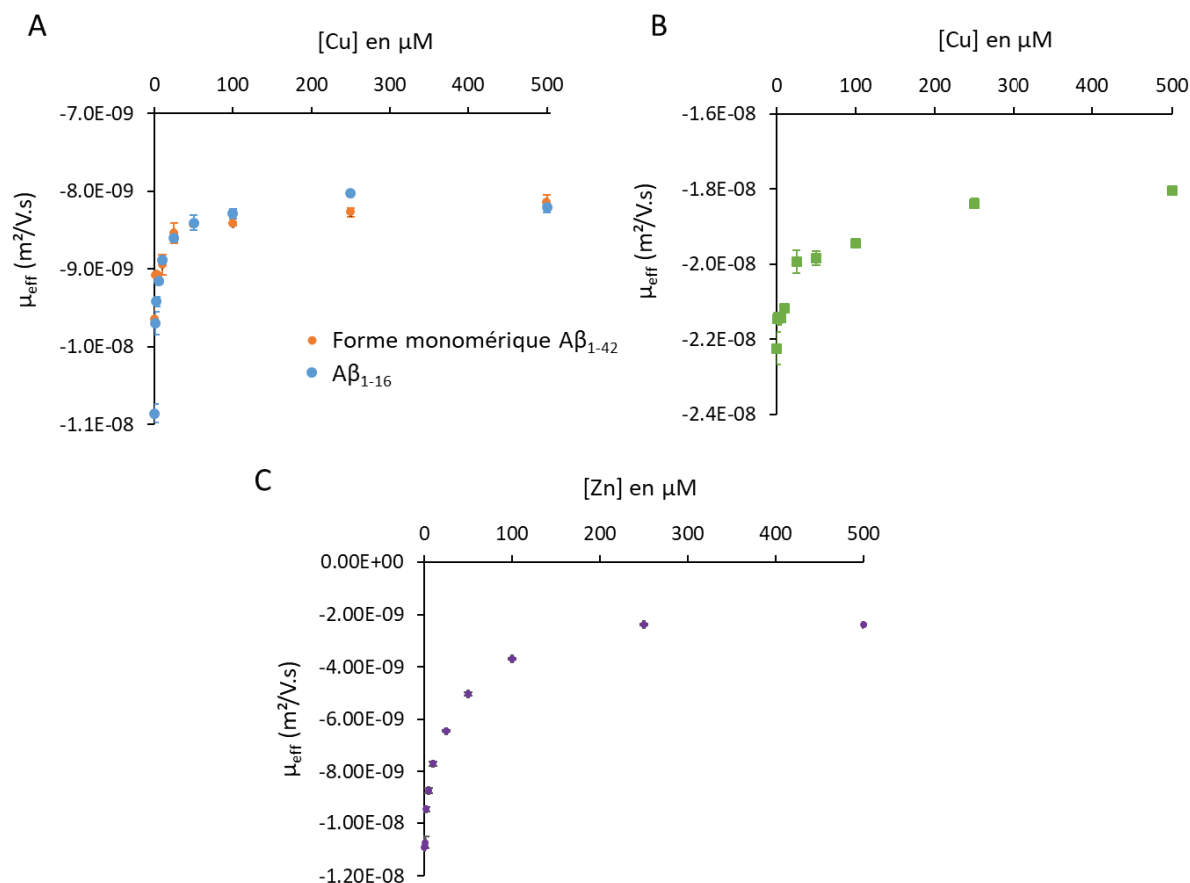


Figure III-3 - Variation de la mobilité électrophorétique effective : (A) du peptide $A\beta_{1-16}$ (●) et de la forme monomérique du peptide $A\beta_{1-42}$ (●) en présence de cuivre, (B) des formes oligomériques du peptide $A\beta_{1-42}$ en présence de cuivre (■) et (C) du peptide $A\beta_{1-16}$ en présence de zinc (◆).

Tableau III-1 - Mobilités électrophorétiques des peptides $A\beta_{1-16}$ et $A\beta_{1-42}$ libres ou complexés avec le cuivre ou le zinc déterminées par ACE.

Ligand	Métal	μ_{ep} ligand ($10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	μ_{ep} complexe ($10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
$A\beta_{1-16}$ monomère	Cuivre	$-1,1 \pm 0,1$	$-0,82 \pm 0,01$
$A\beta_{1-42}$ monomère	Cuivre	$-0,98 \pm 0,02$	$-0,83 \pm 0,01$
$A\beta_{1-42}$ oligomère	Cuivre	$-2,2 \pm 0,1$	$-1,84 \pm 0,01$
$A\beta_{1-16}$ monomère	Zinc	$-1,09 \pm 0,01$	$-0,24 \pm 0,01$

Les mobilités obtenues, toutes négatives, indiquent que les ligands libres ou complexés sont de charge négative. La **figure III-3.A** montre la superposition des courbes obtenues en ACE pour le peptide $A\beta_{1-16}$ et la forme monomérique du peptide $A\beta_{1-42}$ en présence de cuivre. Ces résultats sont en accord avec la localisation du site de complexation de Cu(II) dans la séquence impliquant les 16 premiers acides aminés du peptide $A\beta$ à pH 7,4 (**figure I-8**). La seule différence observée entre les peptides $A\beta_{1-16}$ et $A\beta_{1-42}$ est la mobilité du ligand libre. En effet, la μ_{ep} du peptide $A\beta_{1-16}$ en valeur absolue est légèrement supérieure à celle du peptide $A\beta_{1-42}$, en raison d'une taille plus faible.

Il est également à noter que les mobilités des monomères libres et complexés avec Cu(II) ne sont pas très différentes avec $\mu_{ep}(A\beta_{monomère}) \sim 1,3 \times \mu_{ep}(A\beta_{monomère-Cu(II)})$. Cela suggère un rapport charge / taille quasiment similaire entre le peptide $A\beta$ et le complexe $A\beta-Cu(II)$. Ces observations sont les mêmes pour les mobilités des formes oligomériques du peptide $A\beta_{1-42}$ complexées ou non. La comparaison avec le zinc montre une différence plus significative entre les mobilités du monomère sous forme libre et complexée ($\mu_{ep}(A\beta_{monomère}) = 4,6 \times \mu_{ep}(A\beta_{monomère-Zn(II)})$). Une tendance similaire a été observée pour les complexes avec NTA et EDTA avec $|\mu_{epL}| > |\mu_{epCuL}| > |\mu_{epZnL}|$.¹⁴⁴

Il est important de noter que l'étude ACE avec Zn n'a été interprétée que sur le peptide $A\beta_{1-16}$ car la présence de zinc provoque l'agrégation rapide du peptide et l'apparition importante de fibrilles pour la séparation du peptide $A\beta_{1-42}$ dès la présence d'une concentration supérieure ou égale à 20 μM de zinc dans l'électrolyte.

1.3. Détermination de la constante de complexation par ACE

Les résultats obtenus en ACE ont été exploités pour déterminer les constantes d'interaction K_{ML} du ligand $A\beta_{1-16}$ avec le cuivre et le zinc. Pour les deux métaux, la concentration initiale en métal (M_0) n'est pas en excès par rapport à celle du ligand (L_0) ($[M_0] \leq 10 [L_0]$), indiquant une constante forte. Les méthodes de régression linéaire de l'isotherme d'association ne pourront être appliquées. De ce fait, un modèle de complexation (**équation III-4**) a été utilisé et la constante K_{ML} a été déterminée par ajustement des courbes théoriques et expérimentales.

$$K_{ML} [M]^2 + (1 - K_{ML}[M_0] - K_{ML} [L_0]) [M] - [M_0] = 0 \quad (\text{III-4})$$

avec M la concentration en métal libre à l'équilibre et M_0 et L_0 les concentrations initiales en métal et en ligand respectivement.

La **figure III-4** représente la superposition des données expérimentales obtenues en ACE sur un capillaire HPC avec Tris 10 mM NaCl 15 mM à pH 7,4 comme électrolyte et les données théoriques pour différents $\log K_{ML}$ pour les complexes $A\beta_{1-16}-Zn(II)$ et $A\beta_{1-16}-Cu(II)$.

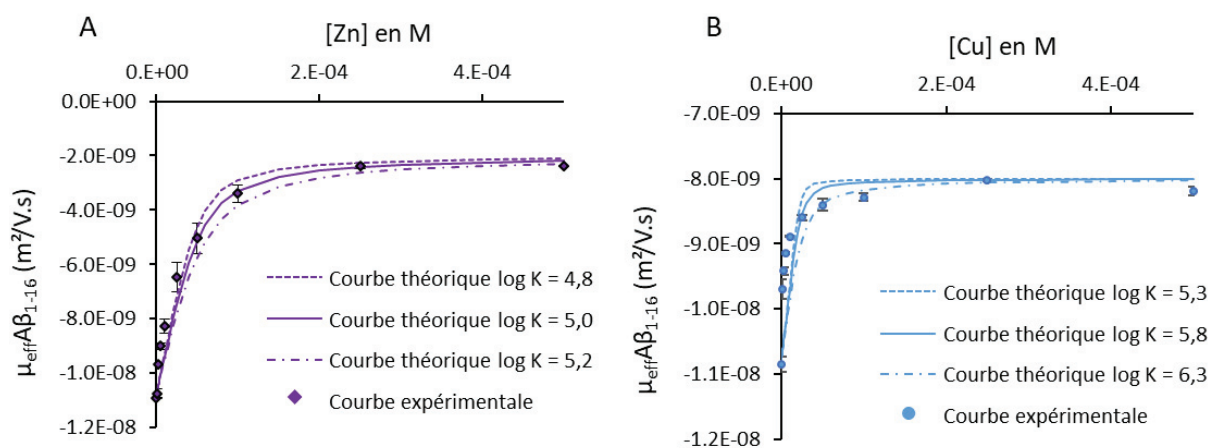


Figure III-4 - Comparaison des données expérimentales obtenues par ACE et des modèles obtenus avec différentes constantes d'affinité pour les complexes $A\beta_{1-16}\text{-Zn(II)}$ (A) et $A\beta_{1-16}\text{-Cu(II)}$ (B)
 Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 μl pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

Dans le cas du zinc, les données expérimentales ont été ajustées avec succès avec le modèle de complexation (équation III-4) pour $\log K_{A\beta_{1-16}\text{-Zn(II)}} = 5,0 \pm 0,2$ soit $K_{A\beta_{1-16}\text{-Zn(II)}} = 10 \pm 5 \mu\text{M}$. Cette valeur est en accord avec la bibliographie, qui recense des valeurs de $K_{A\beta_{1-16}\text{-Zn(II)}}$ comprise entre 1 et 300 μM .⁴⁹ En revanche, les tentatives pour ajuster les points expérimentaux obtenus pour le cuivre ont été infructueuses. Cela peut être expliqué par une méthode peu adaptée au vu des faibles concentrations nécessaires pour atteindre le plateau ($[\text{Cu(II)}] < 50 \mu\text{M}$) et la valeur de constante de complexation élevée (entre 10^7 et 10^{11} M^{-1}), conduisant à une forte contribution de :

- l'adsorption du cuivre sur la paroi du capillaire,
- les interactions compétitives avec le tampon Tris, Cu(II) étant connu pour interagir de façon significative avec le Tris ($\log K_{\text{Tris-Cu(II)}} = 4,05 \pm 0,002$) alors que Zn(II) n'interagit que très faiblement ($\log K_{\text{Tris-Zn(II)}} = 1,94 \pm 0,03$).¹⁴⁵

Puisque l'ACE n'est pas adaptée à la détermination de la constante de complexation entre le peptide $A\beta_{1-16}$ et Cu(II), il est nécessaire d'envisager l'utilisation d'une autre méthode. Dans ce contexte, nous avons utilisé le couplage CE-ICP-MS précédemment décrit dans le but de déterminer la constante de complexation $K_{A\beta_{1-16}\text{-Cu(II)}}$ par compétition.

2. Article 1: Détermination de la constante d'affinité d'A β -Cu(II) par CE-ICP-MS

Le couplage CE-ICP-MS permet d'étudier le complexe dans son intégralité et fournit une détection élémentaire permettant d'observer les changements liés à la répartition du métal. Une étude par compétition en présence de NTA a été menée sur le peptide A β_{1-16} , qui contient le site de complexation du cuivre de haute affinité.

Cet article démontre :

- l'importance du choix du voltage, du tampon et de la surface du capillaire pour éviter la dissociation des complexes de cuivre, en particulier celle de NTA-Cu(II),
- que la constante apparente du complexe A β -Cu(II), avec une stœchiométrie 1:1, est de $\log K_{A\beta-Cu(II)} = 9,9 \pm 0,2$,
- une répartition identique de Cu(II) entre NTA-Cu(II) et A β_{1-16} -Cu(II) en présence ou non de bicarbonate avec une concentration proche de celle du sérum, qui semble indiquer :
 - o l'absence de formation d'un complexe ternaire impliquant le métal, le ligand et les carbonates pour les deux complexes,
 - o que le complexe A β -Cu(II) peut exister à des concentrations en bicarbonate similaires à celles du sérum (~ 30 mM).

Interactions between copper (II) and β -amyloid peptide using capillary electrophoresis-ICP-MS: K_d measurements at the nanogram scale

C. Duroux, A. Hagege

Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 69100 Villeurbanne, France, e-mail : agnes.hagege@isa-lyon.fr

Anal. Bioanal. Chem, publié en ligne en 2021

Abstract: Although the interaction between the β -amyloid peptide and copper (II) appears to play an important role in Alzheimer's disease, the affinity constant is still controversial and values are ranging from 10^7 M^{-1} to 10^{11} M^{-1} . With the aim of clarifying this point, a complementary method, based on the capillary electrophoresis-ICP-MS hyphenation, was developed and competitive binding experiments were conducted in the presence of nitrilotriacetic acid. The effect of the capillary surface (neutral or positively charged) and nature of the buffer (Tris or Hepes) have been studied. Tris buffer was found to be inappropriate for such determination as it enhances copper (II) complexes dissociation, already occurring in the presence of an electric field in capillary electrophoresis. Using Hepes, a value of 10^{10} M^{-1} was found for the affinity of the small β -amyloid peptide 1-16 for copper (II), which is in agreement with the values obtained for other proteins involved in neurodegenerative diseases. These constants were also determined in conditions closer to those of biological media (higher ionic strength, presence of carbonates).

Keyword: capillary electrophoresis / inductively coupled plasma mass spectrometry / binding constant / amyloid interaction / copper (II) complexes

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease, mainly characterized by a progressive loss of memory and certain cognitive functions. Neuronal degeneration, initially located in the hippocampus, slowly spreads throughout the patient's brain. Although very widespread throughout the world, there is as yet no curative treatment for this disease. Thanks to numerous studies on the subject, the main markers of the disease are now well known.¹⁴⁶ Among them, the amyloid- β peptide ($A\beta$) is strongly involved in the development of AD and particularly $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ fragments. $A\beta_{1-42}$, in its monomeric form is considered as nontoxic. However it is very prone to aggregation, forming oligomers, soluble protofibrils, and eventually fibrillar aggregates that deposit as amyloid plaques in the brain. Even if fibrillary aggregates have long been considered as the toxic species [2], evidences that soluble oligomeric species [3-6], including dimers and trimers [7], are key intermediates for toxicity, are now reported.

There is now a consensus about the neuronal toxicity of $A\beta$ oligomers, and the important role of metal ions dyshomeostasis in AD, especially copper (Cu),^{39,85} and $A\beta$ - Cu(II) complexes seem to play a crucial role in $A\beta$ peptides' aggregation and toxicity.^{82,86,87,147} In this context, intensive research effort have focused on the study of $A\beta$ - Cu(II) complex, as reported by Faller *et al.*⁴⁹ Owing to the propensity of the peptides $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ to self-aggregate, most studies have focused on the short peptide $A\beta_{1-16}$, which was proved to contain the high affinity site for copper complexation.¹⁴⁸ Even if the structure of the complex at pH 7.4 is well defined, there is much controversy regarding the affinity of Cu(II) for $A\beta_{1-16}$ and the reported constant values for the $A\beta_{1-16}$ - Cu(II) complex vary significantly.^{59,65,137,149}

I. Zawisza *et al.*¹³⁷ discussed the influence of the concentration ranges used with the classical biophysical techniques on the affinity constant $K_{A\beta_{1-16} - Cu(II)}$. Values compiled by these authors were found to be around 10^7 M^{-1} using tyrosine fluorescence, $10^9 - 10^{11} \text{ M}^{-1}$ depending on the competitor using isothermal titration calorimetry and $5 - 8 \times 10^{10}$ using potentiometry. They proposed the formation of either dimeric complexes at high concentration or ternary complexes with competitors to explain the highest values. Alies *et al.* evoked an underestimated contribution of the inner-filter effect using tyrosine fluorescence quenching and recalculated a Cu(II) affinity for $A\beta_{1-16}$ in the 10^{10} M^{-1} range.⁶⁵

The situation becomes even more intricate considering the influence of buffers on the determination of the affinity constant. The nature and concentration of the buffer used seems to have an important impact on the determination of $K_{A\beta_{1-16} - Cu(II)}$. In fact, the competitive interactions, which may occur between the metal and some buffers, i.e. Tris and Hepes, seem to influence the value of the constant, determined with the conventional methods cited above. In order to take into account competitive interactions with the buffer, apparent constants are commonly converted into conditional constants using the affinity constants of Cu(II) - buffer complexes.¹³⁸



Moreover, a $A\beta$ - Cu(II) - Tris ternary complex was identified by TEM and ESI-MS. Therefore, the decrease of Cu(II) affinity for $A\beta_{1-16}$ and $A\beta_{1-42}$, observed by comparison with other buffers was not attributed to a competition with Tris but to the formation of these complexes.¹⁵⁰ The formation of ternary complexes involving Cu(II), $A\beta$ and buffers/competing ligands was also highlighted by Rózga *et al.*¹⁵¹.

Given these conflicting results regarding the affinity of Cu(II) for the $A\beta_{1-16}$ peptide, it seems important to provide additional experimental data in this area. The determination of the constant is of the utmost importance, not only to help deciphering the mechanisms related to AD that occur in the synapses, but also for the design of new copper (II) chelators for therapy. In this context, we propose to use a new analytical technique in this field, i.e. capillary electrophoresis hyphenated to ICP-MS, an elementary detection allowing to observe changes linked to the metal. This method will be applied to the determination of the affinity constant of $A\beta_{1-16}$ for Cu(II) in Tris and Hepes buffers, which represent the most studied buffers. Since these buffers are complexing ligands, competitive experiments will be performed using nitrilotriacetic acid (NTA) as competitor.

2. Materials and methods

2.1. Products and stock solutions

All product were used without further purification.

Tris (Trizma® base), Hepes, NaCl, NaHCO₃ and hydrochloric acid 37% from Sigma-Aldrich were used for buffer preparation. Four different buffers (10 mM Tris or Hepes containing 15 mM NaCl,, 10mM Hepes containing 100 mM NaCl in the presence or not of 30 mM sodium bicarbonate) were all adjusted at pH 7.4 by HCl addition.

NaOH 1M (Agilent), used for the capillary conditioning, and hydroxypropylcellulose (HPC) and hexadimethrine bromide (polybrene) used for capillary surface modification were also purchased from Sigma. Nitric acid 1% obtained by dilution in ultrapure water of HNO₃ 65% (Merck, Suprapur® quality) was used for rinsing the capillary.

Acetone, 0.1% in water, and tributylphosphine (TBP), 0.03% in DMSO 2%, used as electroosmotic flow markers in CE_UV and CE-ICP-MS experiments respectively, and EDTA diluted in the sheath liquid buffer, were purchased from Sigma.

Lyophilized powder $A\beta_{1-16}$ (purity \geq 95%) was purchased from GeneCust (Boynes, France).

Stock solutions of $A\beta_{1-16}$ ca 250 μ M were prepared in the different buffers The exact concentration of $A\beta_{1-16}$ was determined by using UV measurements (Thermo Scientific™ NanoDrop™ UV-Vis Spectrophotometer) at 280 nm ($\epsilon = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, from UniProtKB/Swiss-Prot Database).

Stock solutions of CuCl_2 at 50 μM both buffers were obtained by dissolution of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ purchased from Merck.

Stock solution of nitrilotriacetic acid (NTA) at 2.5 mM in both buffers obtained by dissolution of NTA purchased from Merck.

Samples were freshly prepared just before use from copper (II), NTA and $\text{A}\beta_{1-16}$ stock solutions diluted in the appropriate buffer in order to obtain final mixtures with the desired concentrations ($[\text{A}\beta_{1-16}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{Cu(II)}] = 10 \mu\text{M}$ and $5 \mu\text{M} < [\text{NTA}] < 1500 \mu\text{M}$).

2.2. CE-ICP-MS conditions

A Beckman P/ACE MDQ instrument was used for CE separations using 32 Karat Software for both control and UV data acquisition. The background electrolyte was either 10 mM Tris, 15 mM NaCl or in 10 mM Hepes, 15 mM NaCl, both at pH 7.4.

For the separation, fused silica capillaries (64 cm x 75 μm i.d., 375 μm o.d., Polymicro Technologies) have been pre-treated either with HPC to obtain a neutral surface or with polybrene to obtain a positively charged surface.

In the case of HPC, a thermal coating protocol, already described elsewhere¹⁵², was applied using a HPC solution, 0.05 g/mL in water. HPC capillaries were then rinsed twice with HNO_3 1% at 10 psi during 5 min and then conditioned with background electrolyte at 10 psi during 5 min before each separation. Separations were performed at 25°C at -7 kV assisted by a pressure of 0.3 psi.

Dynamic coating was performed by flushing the fused silica capillary with a polybrene solution at 0.1% m/m in the desired buffer for 30 min at 5 psi before the first separation and for 10 min at 5 psi between runs.

Separations were performed at 25°C at -15 kV. Before each separation, the capillary was conditioned with background electrolyte at 5 psi during 2 min.

In both cases, samples were introduced into the capillary by hydrodynamic injection under 0.5 psi during 5 sec (around 25 nL) and all experiments were performed in triplicate. At the end of the separation, a pressure rinse (5 psi) with HNO_3 1% was performed for 5 min to release the Cu(II) sorbed onto the capillary walls.

An Agilent 7700 ICP-MS equipped with a MicroMist nebulizer was used as detector and controlled by the MassHunter software. Copper was detected at $m/z = 65$ at the end of the capillary (64 cm). Operating conditions were: plasma gas flow rate: 15 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, carrier gas flow rate: 1 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, auxiliary gas flow rate: 0.9 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, makeup gas flow rate: 0.1 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, radiofrequency power 1550 W for the plasma. Other parameters were tuned in order to maximize the signal.

The CE-ICP-MS hyphenation was achieved via a home-made sheath-flow interface described elsewhere.¹⁵³ Electrical connection was achieved thanks to a platinum ground electrode positioned in one of its inlets. The sheath liquid was a 5 mM Tris solution adjusted at pH 7.4 and containing 10 μM EDTA, and was introduced by self-aspiration to another inlet of the interface.

2.3. Determination of the binding constants

Samples were freshly prepared from copper (II), NTA and $\text{A}\beta_{1-16}$ stock solutions diluted in the appropriate buffer in order to obtain final mixtures with the desired concentrations ($[\text{A}\beta_{1-16}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{Cu(II)}] = 10 \mu\text{M}$ and $5 \mu\text{M} < [\text{NTA}] < 1500 \mu\text{M}$). After incubation at room temperature for 2h, samples were analyzed in triplicate by CE-ICP-MS and copper percentage was calculated for each species. Since an experiment lasts around 30 min in HPC capillaries and 45 min in polybrene capillaries, the whole set of experiments, necessary to determine the complexation constant, requires at least 9 levels of NTA concentrations and was then realized over 2-3 days. In addition, two control experiments, using 100 μM and 250 μM NTA as competitor, were performed each day.

Complexation constants were then determined by fitting the experimental data with the theoretical curves by unweighted nonlinear least squares using the Origin 8.5 software, assuming the absence of free copper in the solution.

3. Results and discussion

3.1. Selection of a suitable copper (II) competitor

The determination of the affinity constant of $A\beta_{1-16}$ for Cu(II) was performed by competition assays. The selection of NTA as suitable competitive chelator was based on the following conditions (i) affinity constants of the two ligands must be of the same order of magnitude, (ii) the electrophoretic mobilities (μ_{ep}) of the copper (II) complexes must be different to achieve a good separation between the two complexes in CE-ICP-MS.

$\log K_{NTA-Cu(II)}$ (pH 7.4) was calculated from the $\log \beta_{NTA-Cu(II)}$ value of 12.94 recommended by the IUPAC and recalculated as an apparent value at pH 7.4 thanks to the pKa value of the tertiary amine of NTA equal to 9.66.¹⁵⁴ On the basis of the apparent affinity constants reported in literature at pH 7.4 for the $A\beta_{1-16} - Cu(II)$ complex ($7 < \log K_{A\beta_{1-16}-Cu(II)} \text{ (pH 7.4)} < 12$), $\log K_{NTA-Cu(II)}$ (pH 7.4) = 10.68 appears to be in the appropriate range of affinity.

Mobilities of both complexes were determined thanks to affinity capillary electrophoresis (ACE) experiments, using acetone as electroosmotic flow marker. For that purpose, experiments were carried out by injecting $A\beta_{1-16}$ and NTA individually and separating them in Tris 10 mM electrolytes containing increasing amounts of copper (II). Mobilities of free ligands were measured in the absence of copper and mobilities of the copper (II) complexes were measured in the presence of a high excess of copper (II), so that the ligands were saturated (see SI). Table 1 listed the obtained electrophoretic mobilities of both ligands either free or complexed and showed that the mobilities of the two complexes were quite different.

Table 1 Electrophoretic mobilities of free and complexed ligands determined by affinity capillary electrophoresis

Compounds	$A\beta_{1-16}$	$A\beta_{1-16} - Cu(II)$	NTA	NTA - Cu(II)
$\mu_{ep} \text{ (m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$	-8×10^{-9}	-1×10^{-8}	-5×10^{-8}	-2.5×10^{-8}

3.2. Determination of suitable conditions to limit dissociation

Complexes dissociation due to disequilibrium effects is one of the major issue when using capillary electrophoresis and it might affect the determination of affinity constants. Indeed, as separation occurs, ligands and metals are no longer in equilibrium and complexes may start to dissociate. Consequently, maintaining the integrity of metal-ligands complexes during the separation is an important factor.

If metal and ligand dissociated from the metallic complex when separation occurs and may rebind only as long as they are not removed from the interaction zone. The deleterious effect is not only related to the difference in mobilities but also to the electric field strength and this should be kept as low as possible. Therefore, CE separation conditions were investigated to avoid any modification of the equilibrium by the application of the voltage.

Dissociation of the complexes was investigated by comparing the separations performed for different conditions. 100 μM $\text{A}\beta_{1-16}$ and 100 μM NTA with 10 μM Cu(II) solutions were injected and separated in either Tris or Hepes electrolyte using different applied voltages (-7 to -20 kV). Additionally, capillary wall effects were examined by using either HPC or polybrene capillary.

Copper(II) areas of the remaining complexes were measured using ICP-MS. In order to overcome the small variations due to the use of solutions of copper (II) complexes from different batches, values were expressed as ^{65}Cu area/reference area, where ^{65}Cu area represents the area measured for a given voltage and the reference area, the mean area measured for -7 kV. The values obtained are presented in figure 1.

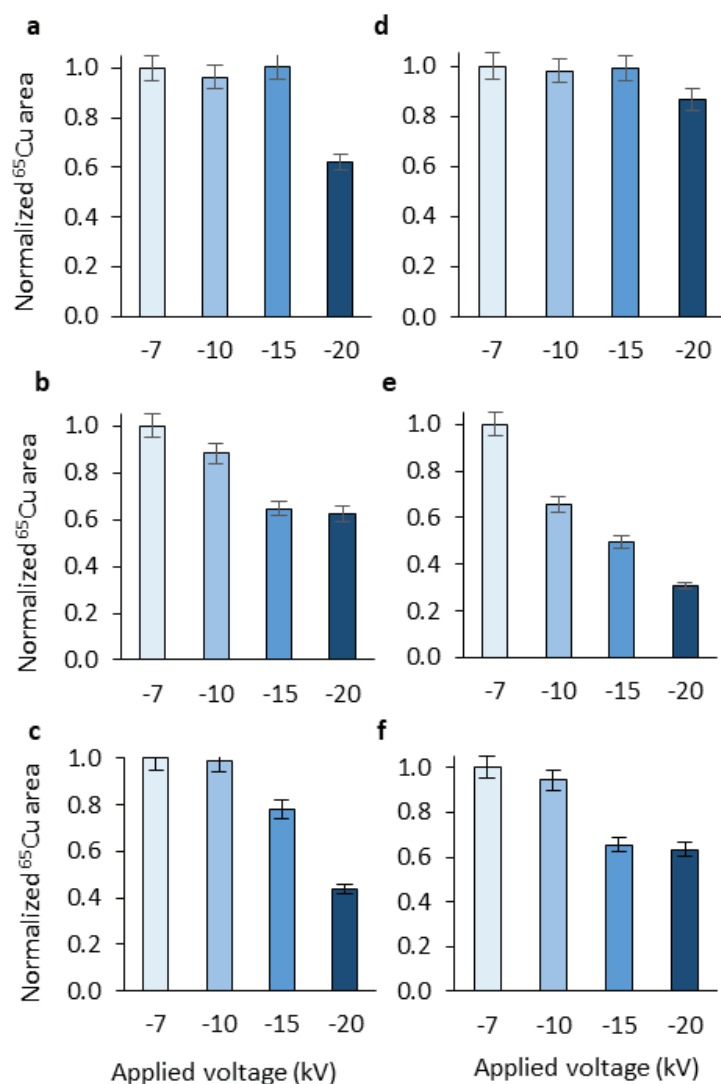


Fig. 1: Voltage effect on A β - Cu(II) (a,b,c) and on NTA - Cu(II) (d,e,f) recoveries with Tris buffer and polybrene capillary (a,d) or Tris buffer and HPC capillary (b,e) or Hepes buffer and HPC capillary (c,f)
 Experimental conditions: HPC or polybrene coated - capillary (75 μ m i.d. x 64 cm), 10 mM Tris or 10 mM Hepes buffer, 15 mM NaCl at pH 7.4, 25°C. Detection: ICP-MS at $m/z = 65$ at the end of the capillary
 Separations in HPC capillary were carried out with an assisted pressure of 0.3 psi

In the case of polybrene-coated capillary (fig. 1a and d), data showed a non significant effect of the voltage applied on the copper peak area for both complexes, except at -20 kV.

On HPC capillary (fig. 1b, c, e, and f), a clear decrease of copper area is observed as a function of the applied voltage, indicating an influence of the capillary inner surface. The occurrence of an adsorption of copper (II) onto HPC is then assumed, such a polysaccharide having already been reported in the literature as an efficient material for removing metals from aqueous solutions.¹³²

Moreover, this effect seems to be more pronounced for NTA - Cu(II) than for A β ₁₋₁₆ - Cu(II) complex, suggesting that NTA - Cu(II) is more prone to dissociation. This could be attributed to the significant difference in mobilities observed between free and complexed NTA (table 1), leading to a faster escape of this ligand from the complex zone hence decreasing the rebinding probability.

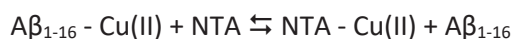
Finally, the comparison of the results obtained with HPC using Tris and Hepes electrolytes clearly indicates that the nature of the electrolyte influences the dissociation. Results clearly show that the presence of Tris seems to promote the dissociation of the NTA - Cu(II) complex in HPC capillary.

The difference observed between Tris and Hepes buffers could be explained by the presence of competitive interactions, greater with Tris than with Hepes. Tris is indeed known to interact with Cu(II), forming 1:1 and 2:1 complexes with affinity constants of $5.78 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ and $4.46 \times 10^6 \text{ M}^{-2}$ respectively.¹³⁴ Hepes buffer is a weaker competitor but also associates with Cu(II) forming a 1:1 complex with an affinity constant of the order of 10^3 M^{-1} .¹³⁵ These interactions may contribute to the NTA - Cu(II) dissociation provoked by field effect. However, the formation of a more stable ternary complex NTA - Cu(II) - Hepes cannot be excluded as reported by Haas *et al.*¹³⁶. The formation of such a complex could lead to the opposite effect, i.e. decreasing the dissociation of the NTA - Cu(II) in Hepes. However, a less pronounced but similar trend was observed for the $A\beta_{1-16}$ - Cu(II) complex, for which it was reported that Hepes is not involved in a ternary complex.¹³⁸

Consequently, the voltages applied during the competition separations described hereafter will be -7kV with assisted pressure of 0.3 psi to counterbalance the absence of electroosmotic mobility (μ_{eo}) in the HPC capillary and -15kV in the polybrene capillary.

3.3. Determination of $A\beta_{1-16}$ - Cu(II) affinity constant

A competitive study was then conducted in order to compare the affinity of $A\beta_{1-16}$ and NTA for Cu(II). For this purpose, various solutions containing 10 μM Cu(II), 100 μM $A\beta_{1-16}$ and increasing concentrations of NTA were analyzed using CE-ICP-MS after 2h of incubation at room temperature. Experiments were performed in both buffers (either Tris 10mM or Hepes 10 mM, NaCl 15 mM at pH 7.4) in different capillaries to investigate the influence of the buffer on the constant determination. For each series of experimental conditions, the distribution of Cu(II) between the two species was calculated. The high excess of ligands over copper (II) ensures the existence of the sole 1:1 complexes. Assuming a 1:1 stoichiometry for both copper (II) complexes, the competition can be described by the following simplified equilibrium:



where charges are voluntarily omitted.

Equation 1 defined the equilibrium constant K:

$$K = \frac{[\text{NTA} - \text{Cu(II)}][A\beta_{1-16}]}{[A\beta_{1-16} - \text{Cu(II)}][\text{NTA}]} = \frac{K_{\text{NTA} - \text{Cu(II)}}}{K_{A\beta_{1-16} - \text{Cu(II)}}} \quad (\text{equation 1})$$

$K_{\text{NTA} - \text{Cu(II)}}$ being the affinity constant of NTA for Cu(II) and $K_{A\beta_{1-16} - \text{Cu(II)}}$, the affinity constant of $A\beta_{1-16}$ for Cu(II).

From equation 1 and the different mass balance equations, it can be shown that the percentages of the two species can be related to the NTA concentration by a quadratic polynomial law.

Therefore, the affinity constant $K_{A\beta_{1-16} - Cu(II)}$ was obtained by adjustment of the curves by nonlinear least-squares analysis assuming the sole formation a 1:1 complex.

3.3.1. $A\beta_{1-16} - Cu(II)$ affinity constant in Tris

Experiments were first conducted in Tris buffer. The distribution of Cu(II) between the different species as a function of NTA concentration as well as a few representative mobilograms are shown in figure 2, for both capillaries. The electropherograms were converted into mobilograms by plotting the signal as a function of the electrophoretic mobility, instead of the recorded time. For that purpose, the electrophoretic mobilities were calculated by subtracting the migration contribution associated to neutral species to the apparent migration of the solutes. The μ_{ep} were determined using TBP as a neutral marker, thanks to equation 2:

$$\mu_{ep} = \frac{L_d L_t}{E} * \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{NM}} \right) \quad (\text{equation 2})$$

where L_d is the length of detection, L_t is the total length of the capillary, V is the applied voltage, t_m is the migration time of the analyte peak and t_{NM} is the migration time of the neutral marker peak.

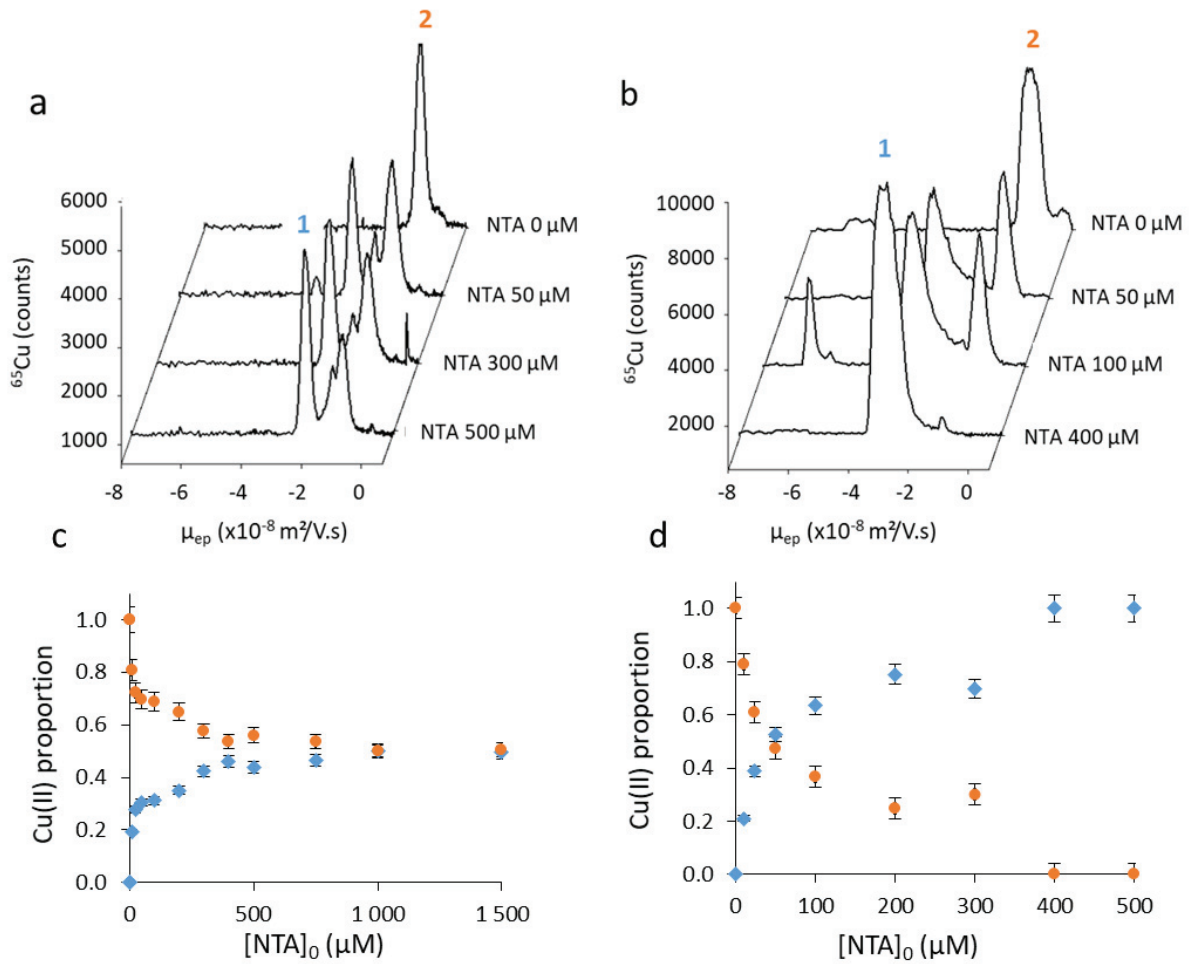


Fig. 2: Competition between Aβ₁₋₁₆ and NTA for Cu(II) binding in Tris buffer
Peaks 1 and 2 represent NTA - Cu(II) and Aβ₁₋₁₆ - Cu(II) complexes respectively

(a,b): Mobilograms obtained from CE-ICP-MS separations of 88 μM Aβ₁₋₁₆ and 10 μM Cu(II) with various concentrations of NTA in HPC or polybrene capillary respectively

(c,d): Cu(II) proportion in Aβ₁₋₁₆ - Cu(II) (●) or NTA - Cu(II) (◆) complexes in HPC or polybrene capillary respectively as a function of NTA concentration

Experimental conditions: HPC or polybrene coated - capillary (75 μm i.d. x 64 cm), 10 mM Tris buffer, 15 mM NaCl at pH 7.4, 25°C. Detection: ICP-MS at m/z = 65

Since the bound Cu(II) does not alter the migration order as shown by affinity capillary electrophoresis experiments, the first main copper (II) complex peak was assigned to NTA - Cu(II) and the second one to Aβ₁₋₁₆ - Cu(II). Cu(II) is mainly distributed between Aβ₁₋₁₆ and NTA, only a negligible fraction being eluted during the nitric acid washing step (data not shown). However, the presence of a tailing NTA - Cu(II) peak in the polybrene capillary (fig. 2b) or the appearance of a third peak in the HPC capillary (fig. 2a) can be observed. These observations may be explained by the dissociation of copper (II) from the NTA - Cu(II) complex, as already discussed in paragraph 3.2.

In the case of HPC, the dissociation is likely to be accompanied by an adsorption of copper (II) onto the HPC capillary. However, examination of the total copper areas, whatever the NTA concentration, led to the conclusion that this adsorption was reversible, if any, and that the free $A\beta_{1-16}$ was able to rebind this copper (II) released by NTA (fig. 2a and c). Such an assumption precludes the calculation of $K_{A\beta_{1-16} - Cu(II)}$ in such conditions. As can be seen in fig. 3, attempts to fit experimental points with a quadratic model of competitive equilibria were unsuccessful.

In the polybrene capillary, the free copper (II) removed from the complex zone starts its migration towards the cathode. Taking this dissociation during electromigration into account, $\log K_{A\beta_{1-16} - Cu(II)}$ was assumed to be estimated but will suffer from strong uncertainty. Using a quadratic model (fig. 3), a bad correlation between experimental values and fitted values was obtained. However, $\log K_{A\beta_{1-16} - Cu(II)}$ was estimated to about 10.

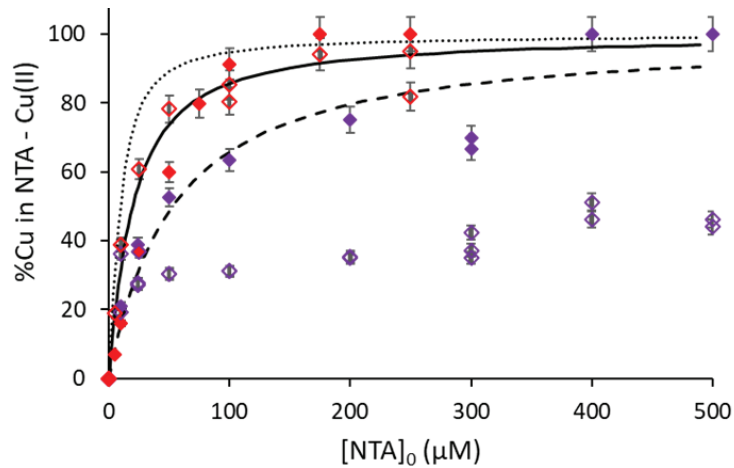


Fig.3: Experimental data for competition effect in HPC with Tris (\diamond), in HPC with Hepes (\diamond), in polybrene with Tris (\blacklozenge), or in polybrene with Hepes (\blacklozenge) and theoretical data for $\log K_{A\beta_{1-16} - Cu(II)} = 9.4$ (.....), $\log K_{A\beta_{1-16} - Cu(II)} = 9.9$ (—), and $\log K_{A\beta_{1-16} - Cu(II)} = 10.4$ (- -)

3.3.2 $A\beta_{1-16} - Cu(II)$ affinity constant in Hepes

Experiments were then conducted similarly in Hepes and led to the separation of two well-resolved peaks, whatever the NTA concentration. Representative electropherograms in Hepes, treated using equation 2, and percentages of the copper (II) complexes as a function of NTA concentration are presented in fig. 4.

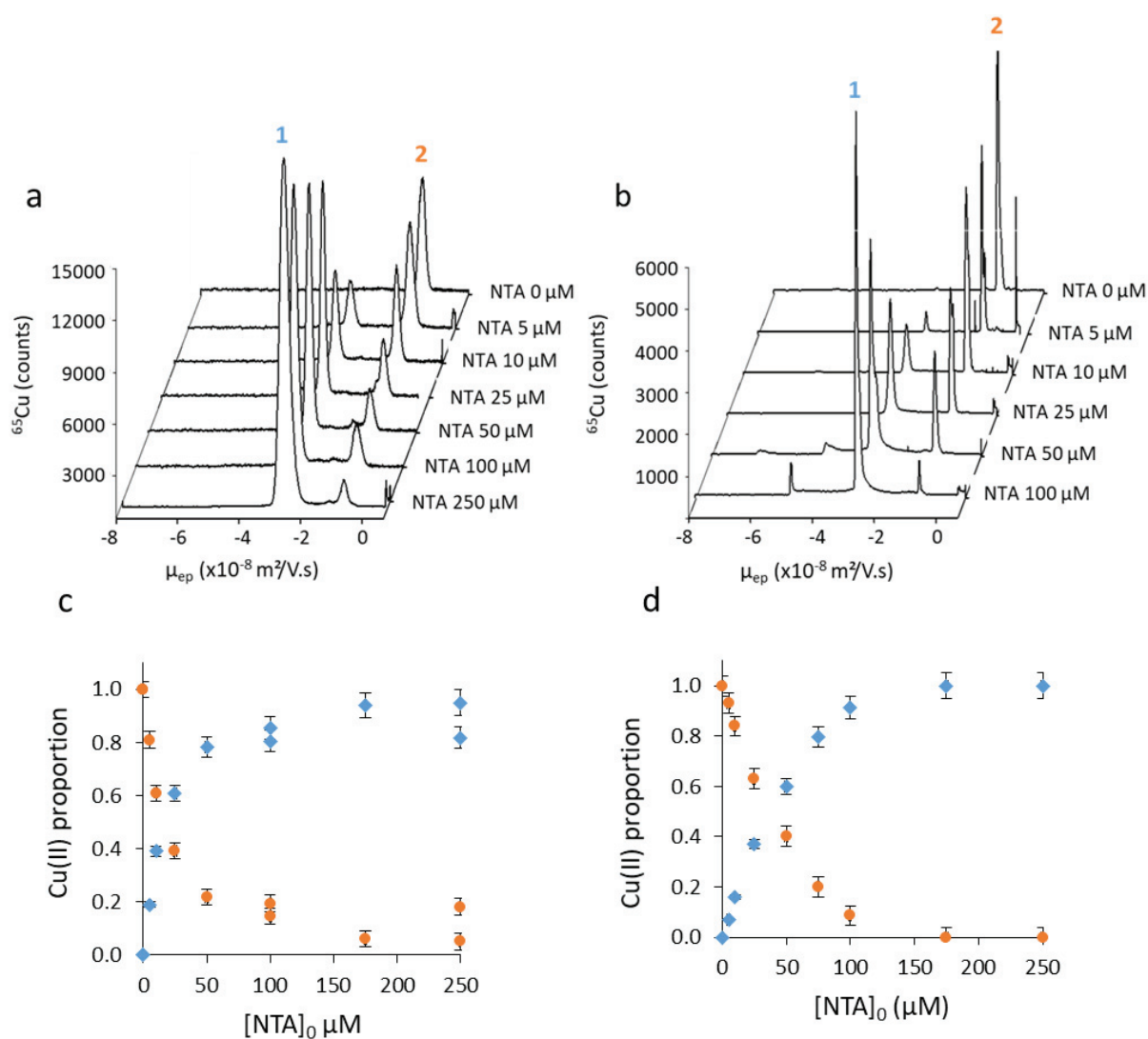


Fig.4: Competition between Aβ1-16 and NTA for Cu(II) binding in Hepes buffer
 Peaks 1 and 2 represent NTA - Cu(II) and Aβ1-16 - Cu(II) complexes respectively
 (a,b): Mobilograms obtained from CE-ICP-MS separations of 100 μM Aβ1-16 and 10 μM Cu(II) with various concentrations of NTA in HPC or polybrene capillary respectively
 (c,d): Cu(II) proportion in Aβ1-16 - Cu(II) (●) or NTA - Cu(II) (◆) complexes in HPC or polybrene capillary respectively as a function of NTA concentration
 Experimental conditions: HPC or polybrene coated - capillary (75 μm i.d. x 64 cm), 10 mM Hepes buffer, 15 mM NaCl at pH 7.4, 25°C. Detection: ICP-MS at $m/z = 65$

Using both capillaries, experimental data (fig. 4c and d) were successfully fitted with a quadratic model (fig. 3) and $\log K_{\text{A}\beta 1-16 - \text{Cu(II)}}$ was found to be (9.9 ± 0.2) and (9.85 ± 0.06) in polybrene and HPC capillary respectively.

However, using NTA as a competitive chelator in Hepes buffer, the formation of a ternary complex with NTA - Cu(II), i.e. NTA - Cu(II) - Hepes, cannot be excluded. These interactions should result in an apparent $K_{\text{A}\beta 1-16 - \text{Cu(II)}}$ affinity constant value that would appear weaker than the actual conditional constant value at pH 7.4. However, this ternary complex may not decrease the affinity constant by several orders of magnitudes. For instance, Rózga *et al.* reported an apparent constant lowered by a factor of 4 ($\log K = 0.6$), as a result of the competition from the ternary NTA - Cu(II) - Hepes complex.¹⁵⁴

Table 2 recapitulates the affinity constants obtained when fit was possible.

Table 2: Affinity constants of A β ₁₋₁₆ - Cu(II) complexes using various buffers and capillary surfaces

Capillary surface	Buffer	[A β ₁₋₁₆] ₀ (μ M)	[NTA] ₅₀ (μ M)	log K
Polybrene	10 mM Tris	88	35	ca 10
Polybrene	10 mM Hepes	100	16	9.9 \pm 0.2
HPC	10 mM Hepes	100	15	9.85 \pm 0.06

Under the three conditions (Polybrene / Tris, Polybrene / Hepes, and HPC / Hepes), log K_{A β ₁₋₁₆ - Cu(II)} was found to be around 10, similar to that of synuclein, involved in Parkinson disease, but lower than that of albumin by 2 orders of magnitude.

3.4. Influence of the incubation medium on A β ₁₋₁₆ - Cu(II) affinity constant

Since biological media often contain high concentrations of salts, experiments were then performed on samples containing either 10 mM Hepes, 100 mM NaCl or 10 mM Hepes, 100 mM NaCl and 30 mM sodium bicarbonate. However, these high concentrations of salts are not adapted to capillary electrophoresis analyses, as they generate high currents, which induce an increase of temperature in the capillary due to Joule effect. Consequently, the separations were performed in HPC capillaries using 10mM Hepes, 15 mM NaCl as electrolyte. These conditions were previously found to allow the determination of complexation constants in a faster way than using polybrene capillaries.

A comparison of the distribution of copper (II) between the two species (A β ₁₋₁₆ and NTA) in the different sample matrices is given in figure 5.

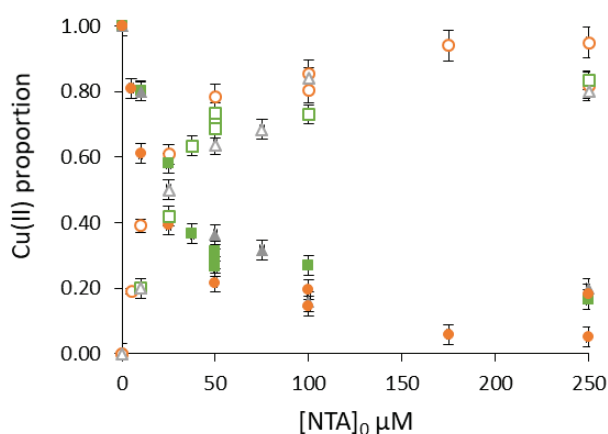


Fig.5: Cu(II) proportion in A β ₁₋₁₆ - Cu(II) (plain symbols) or NTA - Cu(II) complexes (empty symbols) in 10mM Hepes, 15 mM NaCl, (●), 10 mM Hepes, 100 mM NaCl (■) 10 mM Hepes, 100 mM NaCl, 30 mM NaHCO₃ (▲) as a function of NTA concentration

Experimental conditions: HPC coated - capillary (75 μ m i.d. x 64 cm), 10 mM Hepes buffer, 15 mM NaCl at pH 7.4, 25°C, separation at -7kV + 0.3 psi. Detection: ICP-MS at m/z = 65

Figure 5 does not exhibit any significant differences between the three samples. The calculation of $\log K_{A\beta_{1-16}-Cu(II)}$ gives values of (10.07 ± 0.03) and (10.13 ± 0.05) in 100 mM NaCl and 100 mM NaCl, 30 mM $NaHCO_3$ media, respectively.

This very slight increase, compared to the value obtained in a 10 mM NaCl medium, could be due to the neglected ion-pairing capacity of NTA with Na^+ in the calculation. Moreover, the similarity with the value obtained in the carbonated medium seems to indicate that none of the two complexes formed ternary complexes involving carbonates. Most important is the absence of formation of carbonato complexes at pH 7.4, as ascertained by the nearly perfect superposition of the electrophograms obtained in both media (see SI). This suggests that copper (II) is totally recovered in both NTA and $A\beta_{1-16}$ complexes and that the formation of very labile and dissociated Cu(II) complexes might be excluded. This was indeed expected, taking into account the reported complexation constants for these species: $\log K_{CuHCO_3} = 1.82$, $\log K_{CuCO_3} = 6.73$, and $\log K_{Cu(CO_3)_2} = 10.41$. [30] All together, the results seem to indicate that the formation of $A\beta - Cu(II)$ at high concentrations of carbonate is relevant and has to be considered in biological media.

4. Conclusion

As a conclusion, the affinity constant between copper and $A\beta_{1-16}$ was determined by competition experiments, and can be extended to other small ligands exhibiting very different electrophoretic mobilities from their complexes. Nevertheless, since the described method is a fit-to-purpose method, the conditions will have to be adapted as a function of the lability of the complexes. Owing to the small volumes required by CE-ICP-MS (around 25 nL per injection in this study), it offers the possibility to monitor copper distribution using less than 50 pmol of $A\beta_{1-16}$. Moreover, the concentrations in the 100 μ M range allow a direct comparison with fluorescence, regarding to this parameter. The value determined for the constant of $A\beta_{1-16} - Cu(II)$ at pH 7.4, in the 10^{-10} M range, is in agreement with previous determinations performed using ITC and potentiometry and validate a possible bias observed in fluorescence, as described by Allies *et al.*⁶⁵. However, experimental conditions should be carefully selected to avoid misinterpretation of the data. Although Tris was often recommended for classical biophysical studies at equilibrium, this buffer was found to enhance dissociation in capillary electrophoresis, presumably because of its higher competing power. As a consequence, affinity constants cannot be determined accurately in this buffer. HEPES was found to be more adequate and $\log K_{A\beta_{1-16} - Cu(II)}$, determined using both HPC and polybrene capillaries, were identical.

Moreover, in that range of concentrations, $A\beta-Cu(II)$ complex still exists at high concentrations of carbonates, close to those encountered in biological media and no formation of carbonato complexes was noticed at pH 7.4.

Acknowledgment: This work was supported by the Doctoral School of Chemistry, University of Lyon, France (grant to CD). The authors would like to thank Prof. M. Hébrant, University of Nancy, for fruitful discussions. The authors have declared no conflict of interest.

References

1. Goedert M, Spillantini MG A Century of Alzheimer's Disease. *Science* 2006; 314:777–781. <https://doi.org/10.1126/science.1132814>
2. Hardy JA, Higgins GA Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* 1992; 256:184–185.
3. Sakono M, Zako T, Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers *FEBS Journal* 2010, 277; 1348–1358. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x>
4. Bisceglia F, Natalello A, Serafini MM, Colombo R, Verga L, Lanni C, De Lorenzi E An integrated strategy to correlate aggregation state, structure and toxicity of A β 1–42 oligomers. *Talanta* 2018, 188:17–26. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.062>
5. Rosenblum WI Structure and location of amyloid beta peptide chains and arrays in Alzheimer's disease: new findings require reevaluation of the amyloid hypothesis and of tests of the hypothesis. *Neurobiology of Aging* 2002, 23:225–230. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00283-4](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00283-4)
6. Kaye R, Lasagna-Reeves CA, Molecular Mechanisms of Amyloid Oligomers Toxicity, *Journal of Alzheimer's Disease* 2013, 33; S67–S78. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129001>
7. Hung LW, Ciccotosto GD, Giannakis E, Tew DJ, Perez K, Masters CL, Cappai R, Wade JD, Barnham KJ Amyloid-beta Peptide (A beta) Neurotoxicity Is Modulated by the Rate of Peptide Aggregation: A beta Dimers and Trimers Correlate with Neurotoxicity. *Journal of Neuroscience* 2008, 28: 11950–11958 . <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3916-08.2008>
8. Weibull MGM, Simonsen S, Oksbjerg CR, Tiwari MK, Hemmingsen L Effects of Cu(II) on the aggregation of amyloid- β . *J Biol Inorg Chem*, 2019, 24: 1197–1215 . <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01727-5>
9. Kepp KP, Squitti R Copper imbalance in Alzheimer's disease: Convergence of the chemistry and the clinic. *Coord Chem Rev* , 2019, 397:168–187 . <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.06.018>
10. Atwood CS, Moir RD, Huang X, Scarpa RC, Bacarra NME, Romano DM, Hartshorn MA, Tanzi RE, Bush AI Dramatic Aggregation of Alzheimer A β by Cu(II) Is Induced by Conditions Representing Physiological Acidosis. *J Biol Chem* 1998, 273: 12817–12826 . <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.12817>
11. Sarell CJ, Wilkinson SR, Viles JH Substoichiometric Levels of Cu²⁺ Ions Accelerate the Kinetics of Fiber Formation and Promote Cell Toxicity of Amyloid- β from Alzheimer Disease. *J Biol Chem* 2010, 285: 41533–41540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.171355>
12. Pedersen JT, Østergaard J, Rozlosnik N, Gammelgaard B, Heegaard NHH Cu(II) Mediates Kinetically Distinct, Non-amyloidogenic Aggregation of Amyloid- β Peptides. *J Biol Chem* 2011, 286 :26952–26963 . <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.220863>
13. Stefaniak E, Atrian-Blasco E, Goch W, Sabater L, Hureau C, Bal W The Aggregation Pattern of A β 1–40 is Altered by the Presence of N -Truncated A β 4–40 and/or Cu II in a Similar Way through Ionic Interactions. *Chem Eur J* 2021, 27 :2798–2809 . <https://doi.org/10.1002/chem.202004484>
14. Faller P, Hureau C Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid- β peptide. *Dalton Trans*, 2009, 7: 1080–1094 . <https://doi.org/10.1039/B813398K>
15. Atrián-Blasco E, gonzalez paulina, Santoro A, Alies B, Faller P, Hureau C Cu and Zn coordination to amyloid peptides: From fascinating chemistry to debated pathological relevance. *Coord Chem Rev* 2018, 371: 38–55 . <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.04.007>
16. Hatcher LQ, Hong L, Bush WD, Carducci T, Simon JD Quantification of the Binding Constant of Copper(II) to the Amyloid-Beta Peptide. *J Phys Chem B* 2008, 112: 8160–8164 . <https://doi.org/10.1021/jp710806s>
17. Zawisza I, Rózga M, Bal W Affinity of copper and zinc ions to proteins and peptides related to neurodegenerative conditions (A β , APP, α -synuclein, PrP). *Coord Chem Rev* 2012, 256: 2297–2307 . <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.012>

18. Arena G, Pappalardo G, Sovago I, Rizzarelli E Copper(II) interaction with amyloid- β : Affinity and speciation. *Coord Chem Rev* 2012, 256: 3–12 . <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.07.012>
19. Alies B, Renaglia E, Rózga M, Bal W, Faller P, Hureau C Cu(II) Affinity for the Alzheimer's Peptide: Tyrosine Fluorescence Studies Revisited. *Anal Chem* 2013, 85: 1501–1508. <https://doi.org/10.1021/ac302629u>
20. Rózga M, Kłoniecki M, Dadlez M, Bal W A Direct Determination of the Dissociation Constant for the Cu(II) Complex of Amyloid β 1–40 Peptide. *Chem Res Toxicol* 2010, 23: 336–340. <https://doi.org/10.1021/tx900344n>
21. Bin Y, Jiang Z, Xiang J Side Effect of Tris on the Interaction of Amyloid β -peptide with Cu²⁺: Evidence for Tris–A β –Cu²⁺ Ternary Complex Formation. *Appl Biochem Biotechnol* 2015, 176: 56–65. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1512-7>
22. Rózga M, Protas AM, Jabłonowska A, Dadlez M, Bal W The Cu(ii) complex of A β 40 peptide in ammonium acetate solutions. Evidence for ternary species formation. *Chem Commun* 2009, 1374–1376. <https://doi.org/10.1039/b819616h>
23. Shen Y, Berger SJ, Anderson GA, Smith RD High-Efficiency Capillary Isoelectric Focusing of Peptides. *Anal Chem* 2000, 72:2 154–2159. <https://doi.org/10.1021/ac991367t>
24. Varenne F, Bourdillon M, Meyer M, Lin Y, Brellier M, Baati R, Charbonnière LJ, Wagner A, Doris E, Taran F, Hagège A Capillary electrophoresis–inductively coupled plasma-mass spectrometry hyphenation for the determination at the nanogram scale of metal affinities and binding constants of phosphorylated ligands. *J Chromatogr A* 2012, 1229: 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.066>
25. Rózga M, Sokołowska M, Protas AM, Bal W Human serum albumin coordinates Cu(II) at its N-terminal binding site with 1 pM affinity. *J Biol Inorg Chem* 2007, 12: 913–918. <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0244-8>
26. Wu R, Tian L, Wang W, Man X Bifunctional cellulose derivatives for the removal of heavy-metal ions and phenols: Synthesis and adsorption studies. *J Appl Polym Sci* 2015, 132: 1–9. <https://doi.org/10.1002/app.41830>
27. Takahashi M, Takano M, Asada K Tris-Induced Cross-Linking of Thylakoid Peptides; Thiol Oxidation Catalyzed by Tris–Cu²⁺ Complexes as a Possible Mechanism. *J Biochem* 1981, 90: 87–94. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133472>
28. Sokołowska M, Bal W Cu(II) complexation by “non-coordinating” N-2-hydroxyethylpiperazine-N0-2-ethanesulfonic acid (HEPES buffer). *J Inorg Biochem* 2005, 99: 1653–1660. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.05.007>
29. Haas KL, Putterman AB, White DR, Thiele DJ, Franz KJ Model Peptides Provide New Insights into the Role of Histidine Residues as Potential Ligands in Human Cellular Copper Acquisition via Ctr1. *J Am Chem Soc* 2011, 133: 4427–4437. <https://doi.org/10.1021/ja108890c>
30. Millero FJ, Hawke DJ Ionic interactions of divalent metals in natural waters. *Mar Chem* 1992, 40: 19–48. <https://doi.org/10.1007/s10953-010-9523-z>

Supporting information

1. Determination of the electrophoretic mobility of copper (II) complexes with both NTA and $A\beta_{1-16}$

NTA 1 mM and $A\beta_{1-16}$ 100 μM were injected in capillary electrophoresis. Separations were performed using a series of Tris/NaCl buffers with increasing concentrations of copper (II) chloride (from 0 to 1 mM). The electroosmotic mobility (μ_{eo}) was measured at 280 nm using acetone. Figure SI-1 represents the reported electrophoretic mobilities (arithmetic mean values) obtained for NTA (Fig.SI-1a) et $A\beta_{1-16}$ (Fig.SI-1b) and their uncertainties to the associated standard deviation.

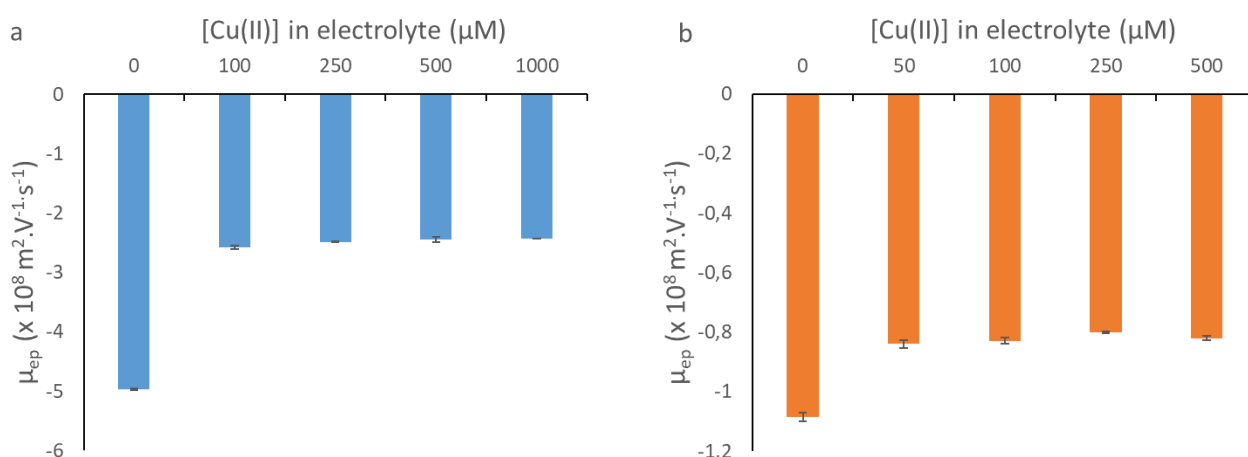


Figure SI-1. Effective electrophoretic mobility monitored by UV at 200 nm of both NTA (a) and $A\beta_{1-16}$ (b) ligands in the absence or presence of Cu^{2+} in the electrolyte. Electrolyte: 10 mM TRIS, 15 mM NaCl at pH 7.4 containing increasing concentrations of CuCl_2 ; capillary: HPC-coated capillary, 64 cm \times 75 μm i.d.; injection pressure: 0.5 psi; injection time: 5 s; migration conditions: -20 kV + 0.3 psi; detection UV at 200 nm (at 54 cm from the injection)

A significant change in effective μ_{ep} values was observed for both compounds in the presence of high copper (II) chloride concentrations, indicating the formation of complexes. Moreover, the effective mobilities were significantly lower (in absolute values) than those found for the ligands alone, but they did not become positive. This is in agreement with a reduction of the overall electrical charge of the ligand upon complexation and the formation of negatively charged complexes. When two consecutive concentrations of Cu(II) in the electrolyte no longer induced variations in electrophoretic mobility, this latter was considered as the electrophoretic mobility of the Cu(II) complex.

2. Competitive NTA/A β_{1-16} assays for Cu(II) performed in media with ionic strengths similar to that of biological media

Electropherograms followed by ICP-MS, for samples diluted in media containing or not 30mM NaHCO₃ did not reveal any significant differences. As an example, figure SI-2 presents the superposition of the electropherograms of two samples differing only by the presence of bicarbonate in their matrix.

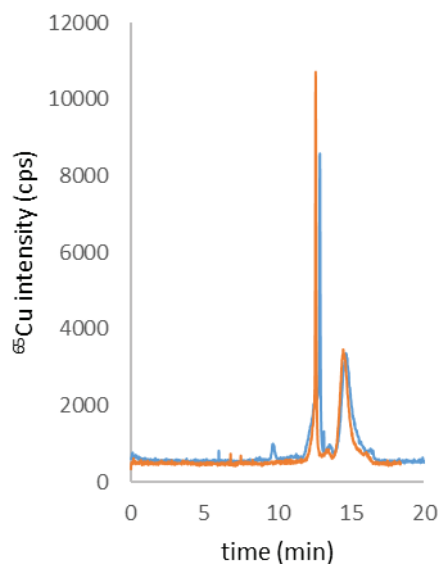


Figure SI-2. Electropherograms followed by CE-ICP-MS of samples containing 100 μ M A β_{1-16} , 25 μ M NTA and 10 μ M Cu(II) in two different sample matrices: 10 mM Tris, 100 mM NaCl (orange line) and 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 30 mM NaHCO₃ (blue line).

Electropherograms exhibit two peaks, the first one being attributed to NTA and the second one to A β_{1-16} . For both sample matrices, the average sum of the NTA-Cu(II) and A β -Cu(II) peak areas recorded by ICP-MS at $m/z = 65$, are reported in table SI-1, whatever their ratio, and seem to indicate that the presence of bicarbonate does not induce any change in Cu(II) speciation.

Table SI-1: Average sum of the peak areas recorded in ICP-MS at $m/z = 65$ for different mixtures of A β_{1-16} and NTA and 10 μ M Cu(II).

Sample matrix	Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4	Tris 10 mM, NaCl 100 mM, NaHCO ₃ 30 mM, pH 7.4
Sum of peak areas (in counts)	256 000 \pm 41 000	262 000 \pm 27 000

3. Conclusion du chapitre

Les études ACE ont permis de déterminer avec succès les mobilités associées aux complexes, paramètres importants pour étudier les complexes et les suivre en ICP-MS. L'exploitation des données ACE a permis de déterminer la constante de complexation entre le peptide A β ₁₋₁₆ et le zinc, avec $K_{A\beta_{1-16}-Zn(II)} = 10 \pm 5 \mu M$. Cependant, les tentatives pour ajuster les points expérimentaux obtenus pour le cuivre ont été infructueuses et n'ont pas permis de fournir une valeur de la constante d'affinité entre A β et Cu(II), potentiellement à cause d'une constante plus forte. Il s'est donc avéré nécessaire de développer une méthode alternative pour déterminer $K_{A\beta_{1-16}-Cu(II)}$.

Dans le but de contribuer à l'établissement d'un consensus autour de la constante de complexation entre le peptide A β et Cu(II), une méthode analytique par compétition a été développée en utilisant le couplage CE-ICP-MS. Cette étude a mis en lumière les difficultés liées à la détermination des constantes de complexes labiles. Bien que le Tris soit souvent recommandé pour les études à pH physiologique, celui-ci s'est avéré favoriser la dissociation des complexes lors des séparations en CE. L'Hepes s'est avéré plus adapté pour fournir une valeur de constante pour A β ₁₋₁₆-Cu(II), avec $\log K = 10$, par CE-ICP-MS via des expériences de compétition. Cette valeur, déterminée à pH 7,4 et identique dans les capillaires modifiés par HPC et le polybrène, est en accord avec les constantes obtenues par ITC et par potentiométrie par différents auteurs.^{59,66} Ces résultats semblent valider un éventuel biais observé en fluorescence et l'hypothèse de la sous-estimation de la réabsorption du rayonnement de fluorescence (effet de filtre interne), comme décrit par Alies *et al.*,⁶⁵ pouvant expliquer les écarts de valeur pour $K_{A\beta_{1-16}-Cu(II)}$.

Pour finir, l'influence du milieu d'incubation sur la détermination de la constante a été étudiée dans des conditions plus proches du milieu biologique (échantillons contenant 100 mM de NaCl et 30 mM de bicarbonate de sodium). Les données n'ont montré aucun effet de la présence de bicarbonate de sodium sur la détermination de $K_{A\beta_{1-16}-Cu(II)}$, indiquant que la formation de A β -Cu(II) est pertinente et doit être considérée dans les milieux biologiques.



CHAPITRE IV : Agrégation du peptide

A β ₁₋₄₂ : le rôle du cuivre

Ce quatrième chapitre est dédié à l'étude de l'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂ qui est un évènement clé dans le développement de la MA, de par la formation d'intermédiaires oligomériques considérés comme toxiques, contrairement au peptide A β ₁₋₄₀ qui ne semble pas conduire à la formation d'espèces toxiques. Certaines conditions, telles que la présence de cuivre, semblent jouer un rôle important sur la cinétique d'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂ et la forme des intermédiaires formés.¹⁵⁵ Bien que de nombreuses études portant sur les changements liés à la conformation et à la structure des agrégats soient disponibles, il manque considérablement de données de spéciation permettant d'étudier l'association du cuivre et des formes solubles du peptide A β ₁₋₄₂.

Le peptide A β ₁₋₄₂ possède une forte capacité à s'auto-agréger de par sa longue chaîne hydrophobe. Il en résulte une variabilité importante de l'état d'agrégation initial du peptide en fonction des fournisseurs, ainsi que des lots produits par un même fournisseur. Or il a été rapporté que la cinétique d'agrégation du peptide semble dépendre de la présence initiale ou non d'agrégats.¹⁴⁸ De ce fait, le développement de méthodes permettant de contrôler l'état d'agrégation du peptide est nécessaire. Dans ce contexte, nous avons développé une méthode permettant de séparer les différentes formes d'agrégation du peptide, basée sur la CE avec détection UV, dans le but d'étudier l'état d'agrégation initiale de différents lots ainsi que l'influence de sa mise en solution.

Dans un second temps, la complémentarité des méthodes CE-UV et CE-ICP-MS développées a été mise à profit pour étudier :

- l'impact de la présence de Cu(II) ou de Zn(II) ainsi que de la concentration en Cu(II) à des niveaux sous-stœchiométriques sur la cinétique d'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂,
- l'affinité du cuivre via l'observation de sa répartition dans les diverses formes d'agrégation.

1. Etude de l'état d'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂

1.1. Séparation des formes par électrophorèse capillaire

La CE a déjà fait ses preuves pour la séparation de fragments du peptide A β avec différentes longueurs de chaîne ¹¹¹ ou la séparation des formes oligomériques solubles du peptide. ¹¹²⁻¹¹⁶ Les différentes formes du peptide A β ₁₋₄₂ sont généralement séparées en CE à pH 7,4 dans un capillaire de silice vierge, en présence ou non d'un modificateur du flux tel que le diaminobutane (DAB), grâce à l'utilisation du tampon phosphate comme électrolyte. ^{112,113,115,116} Ces conditions doivent être adaptées à la présence de cuivre, avec des conséquences directes sur le choix du tampon et du capillaire. Le tampon Tris a été choisi comme électrolyte, améliorant la solubilité de Cu(II) ⁵⁰ et deux modes de revêtement de la surface des capillaires de silice ont été envisagés afin d'éviter la sorption du cuivre : permanent avec HPC et dynamique avec polybrène (cf. chapitre 2).

Pour choisir le capillaire le plus adapté pour la séparation des différentes formes, le peptide A β ₁₋₄₂ a été séparé dans un capillaire modifié par du HPC ou du polybrène avec du Tris 10 mM NaCl 15 mM pH7,4 comme électrolyte. La détection en UV à 200 nm a été réalisée à 54 cm. La séparation dans un capillaire avec un revêtement HPC a été réalisée à -20kV avec une pression assistée de 0,1 psi pour pallier l'absence de μ_{eo} . La séparation dans un capillaire modifié par du polybrène a quant à elle été réalisée à -20 kV sans pression supplémentaire.

Les électrophérogrammes obtenus pour la séparation de 100 μ M de peptide A β ₁₋₄₂ 72h après sa dilution dans l'électrolyte Tris 10 mM avec NH₄OH 0,02% et de l'acétone comme marqueur de migration des espèces neutres sont présentés dans la **figure IV-1**.

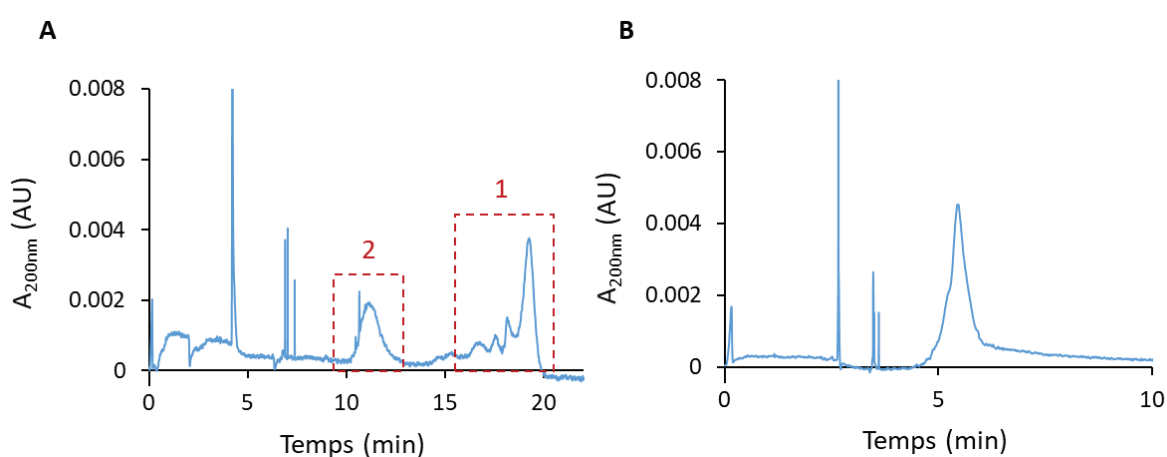


Figure IV-1 - Electrophérogrammes obtenus pour la séparation de 100 μ M du peptide A β ₁₋₄₂ à t = 72h après dilution dans Tris 10 mM NaCl 15 mM NH₄OH 0,02%.

Conditions : capillaire (75 μ m d.i. x 64 cm) avec revêtement HPC (A) ou polybrène (B), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi (A) ou -20kV (B), 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

Les électrophérogrammes montrent clairement un manque de résolution pour la séparation des différentes formes du peptide $A\beta_{1-42}$ lors de l'utilisation d'un capillaire modifié par le polybrène (**figure IV-1.B**), dû à la présence d'une mobilité électroosmotique élevée allant dans la même direction que la mobilité électrophorétique des composés. Le capillaire polybrène ne pourra donc pas être utilisé pour l'étude de l'évolution de l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$.

En revanche, la séparation réalisée dans un capillaire recouvert de HPC immobilisé thermiquement (**figure IV-1.A**) est beaucoup mieux résolue et l'électrophérogramme indique la présence de deux populations principales chargées négativement. Le capillaire de silice recouvert de HPC par immobilisation thermique a donc été choisi pour suivre l'évolution des formes agrégées du peptide $A\beta_{1-42}$ en électrophorèse capillaire.

Il est à noter la présence de spikes, caractéristiques des espèces insolubles principalement composées de fibrilles amyloïdes. Bien que principalement présents au début des mobilogrammes, ces spikes ne présentent pas de temps de migration définis et peuvent apparaître aléatoirement tout au long de la séparation.

1.1.1. Identification des différentes formes du peptide $A\beta_{1-42}$

Afin d'identifier les différentes espèces présentes dans les échantillons de peptide $A\beta_{1-42}$, les analyses par CE ont été complétées par des analyses par dispersion de Taylor (TDA) et les résultats obtenus ont été comparés.

La TDA avec détection UV (TDA-UV), dont le principe est détaillé dans l'annexe 2 de ce manuscrit, permet de déterminer le rayon hydrodynamique (R_h) d'un composé dont la taille peut être comprise entre quelques dixièmes et quelques centaines de nanomètres.^{156,157} Cette méthode, très largement réalisée sur un appareillage classique d'électrophorèse capillaire, ne consomme que quelques nL d'échantillon. Cette technique a récemment été utilisée pour déterminer la taille de divers états d'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$.¹⁵⁸

La TDA-UV a été choisie afin d'identifier les deux populations obtenues pour la séparation du peptide $A\beta_{1-42}$ dans un capillaire HPC (**figure IV-1.A**). Pour ce faire, deux états d'agrégation ont été étudiés simultanément en CE-UV et en TDA-UV grâce à des solutions contenant 100 μ M de peptide préparées :

- dans des conditions limitant l'agrégation (solution A), c'est-à-dire une solution fraîchement préparée dans NH_4OH 0,1% améliorant la solubilité du peptide et minimisant les interactions intramoléculaires,¹¹⁵
- dans des conditions favorisant l'auto-agrégation (solution B), c'est-à-dire une solution incubée pendant 48h à température ambiante dans l'électrolyte à pH 7,4 contenant 0,01% de NH_4OH .

Les deux solutions (A et B) ont été analysées parallèlement en CE-UV à -20 kV + 0,1 psi et en TDA-UV avec une pression de mobilisation de 0,7 psi en utilisant dans les deux cas un capillaire HPC et du Tris 10 mM NaCl 15 mM à pH 7,4 comme tampon. Les analyses ont été répétées 3 fois pour chaque solution. Les électrophérogrammes obtenus en CE-UV ainsi que les taylorgrammes obtenus en TDA-UV sont représentés dans les **figures IV-2 et IV-3** respectivement.

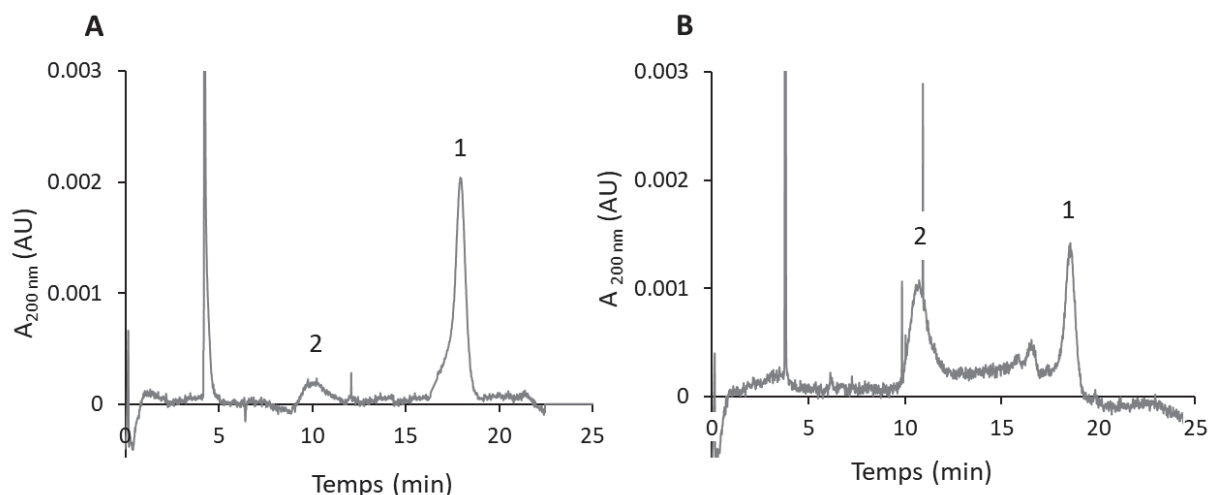


Figure IV-2 - Electrophérogrammes obtenus en CE-UV pour l'analyse de 100 μ M de peptide $A\beta_{1-42}$ préparé dans des conditions limitant l'agrégation (A) et dans les conditions favorisant l'auto-agrégation (B). Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μ m d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

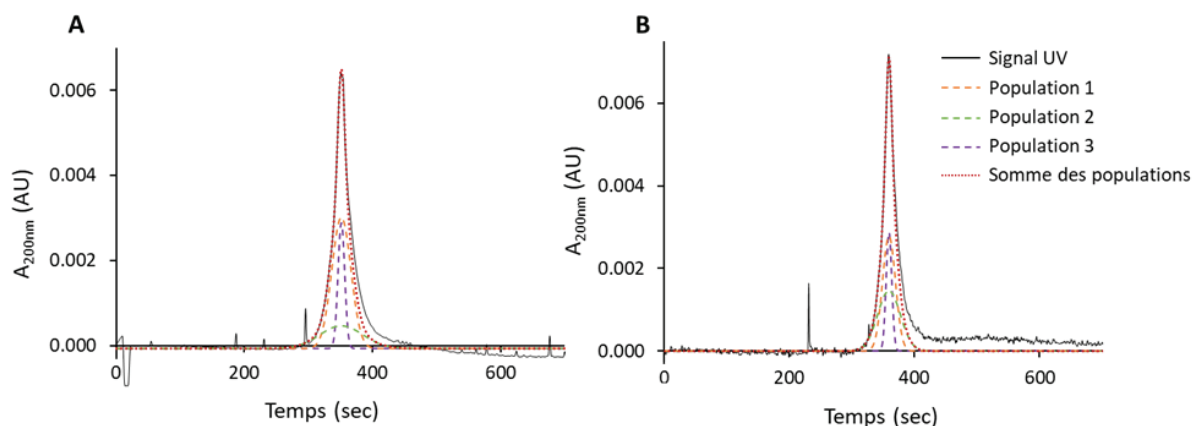


Figure IV-3 - Signaux UV et ajustements trimodaux obtenus en TDA-UV pour l'analyse de 100 μ M de peptide $A\beta_{1-42}$ préparé dans des conditions limitant l'agrégation (A) et dans les conditions favorisant l'auto-agrégation (B). Le signal de référence est représenté en trait plein noir. Les traits en pointillés représentent les ajustements des trois populations (violet, orange et vert) et la somme des populations (rouge).

Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μ m d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, pression de mobilisation : 0,7 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

Les deux électrophérogrammes (**figure IV-2**) présentent deux pics principaux, avec des mobilités électrophorétiques de $-1 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ et $-2 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ respectivement. Les aires obtenues pour ces 2 pics ont été mesurées et les pourcentages respectifs des deux espèces ont été calculés à partir des aires de pic corrigées (aire du pic / temps de migration). Il a été supposé que le coefficient d'extinction molaire à 200 nm est identique pour les monomères du peptide $A\beta_{1-42}$ libres ou impliqués dans les formes agrégées. Les résultats obtenus pour les échantillons A et B sont présentés dans les **tableaux VI-1 et VI-2** respectivement.

Les taylorgrammes sont déconvolués avec une bonne corrélation par un ensemble de trois Gaussiennes (**figure IV-3**), ce qui indique la présence de trois espèces de tailles différentes dans les deux échantillons. L'attribution du pic très fin (représenté en violet sur les taylorgrammes) à la présence de NH_4OH a été validée par injection directe de NH_4OH à 0,05% et grâce au coefficient de diffusion déterminé expérimentalement ($(1,3 \pm 0,3) \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), similaire à celui tabulé pour NH_4OH à 20°C ($1,6 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).¹⁵⁹ Les rayons hydrodynamiques et les proportions associés aux deux autres populations pour les échantillons A et B sont regroupés dans les **tableaux VI-1 et VI-2** respectivement.

Tableau IV-1 - Mobilités électrophorétiques, rayons hydrodynamiques et proportions des différentes espèces présentes dans l'échantillon du peptide $A\beta_{1-42}$ préparé dans des conditions limitant son auto-agrégation (solution A).

Population	CE-UV		TDA-UV	
	$\mu_{ep} (\times 10^8 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	Proportion (%)	Rh (nm)	Proportion (%)
1	$-0,98 \pm 0,02$	74 ± 4	$1,3 \pm 0,2$	72 ± 7
2	$-2,10 \pm 0,05$	26 ± 2	$6,6 \pm 0,9$	28 ± 3

Tableau IV-2 - Mobilités électrophorétiques, rayons hydrodynamiques et proportions des différentes espèces présentes dans l'échantillon du peptide $A\beta_{1-42}$ préparé dans des conditions favorisant son auto-agrégation (solution B).

Population	CE-UV		TDA-UV	
	$\mu_{ep} (\times 10^8 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	Proportion (%)	Rh (nm)	Proportion (%)
1	$-0,94 \pm 0,03$	53 ± 4	$1,3 \pm 0,2$	54 ± 6
2	$-2,13 \pm 0,07$	47 ± 4	$4,2 \pm 0,7$	46 ± 6

La comparaison des résultats obtenus en CE-UV et en TDA-UV montre la présence :

- d'une population migrant lentement ($\mu_{ep} = -1 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) avec un rayon hydrodynamique de l'ordre de 1 nm, attribué aux monomères et aux petits oligomères,
- d'une population migrant rapidement sous la forme d'un pic large ($\mu_{ep} = -2 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) avec un rayon hydrodynamique de quelques nanomètres attribuée aux gros oligomères de tailles variées, pouvant aller de 12-mère à 22-mère selon Bisceglia *et al.*¹¹⁶

Cette attribution est en accord avec les travaux de plusieurs groupes qui ont étudié la séparation du peptide A β_{1-42} à pH 7,4 et qui ont également rapporté que la mobilité des oligomères était deux fois plus grande que celle des monomères.¹¹²⁻¹¹⁴ Cette dernière est renforcée par l'étude réalisée par Deleanu *et al.*,¹⁵⁸ qui ont proposé des formes agrégées possibles du peptide A β_{1-42} en relation avec leur taille déterminée par TDA-UV. Ils ont trouvé une population de monomères / petits oligomères, avec un rayon hydrodynamique moyen d'environ 2 nm, et une population d'oligomères plus gros, avec un rayon moyen d'environ 5 nm.

1.1.2. Evaluation des performances de la méthode CE-UV

En raison de l'état évolutif du peptide A β_{1-42} dans le temps causé par son auto-agrégation, les performances de la méthode CE-UV ont été évaluées grâce au peptide A β_{1-16} qui n'est pas enclin à l'agrégation. Cette étude vient compléter celle réalisée en CE-ICP-MS (cf. chapitre 2).

1.1.2.a) Répétabilité

La répétabilité a été évaluée en analysant une solution contenant 100 μM de peptide A β_{1-16} en triplicat en CE-UV à -20 kV + 0,1 psi dans un capillaire avec un revêtement HPC et du Tris 10 mM NaCl 15 mM pH 7,4 comme électrolyte. Les résultats sont résumés dans le **tableau IV-3**.

Tableau IV-3 - Temps de migration, aire corrigée et hauteur de pic pour la séparation de 100 μM de peptide A β_{1-16} en CE-UV
Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

	Temps de migration (min)	Aire corrigée (AU)	Hauteur (mAU)
Moyenne	18,3 \pm 0,2	5 700 \pm 200	7,1 \pm 0,1

La répétabilité de la séparation du peptide A β_{1-16} est très bonne, avec des écart-types relatifs inférieurs à 1% pour les temps de migration et à 4% pour les aires et les hauteurs.

1.1.2.b) Linéarité

La linéarité a été évaluée avec des solutions contenant des concentrations croissantes en peptide $A\beta_{1-16}$. Ces solutions ont été injectées et analysées dans un capillaire avec un revêtement HPC avec du Tris 10 mM NaCl 15 mM à pH 7,4 comme électrolyte. Le peptide $A\beta_{1-16}$ a été détecté en UV à 200 nm. La courbe de calibration obtenue est représentée dans la **figure IV-4**.

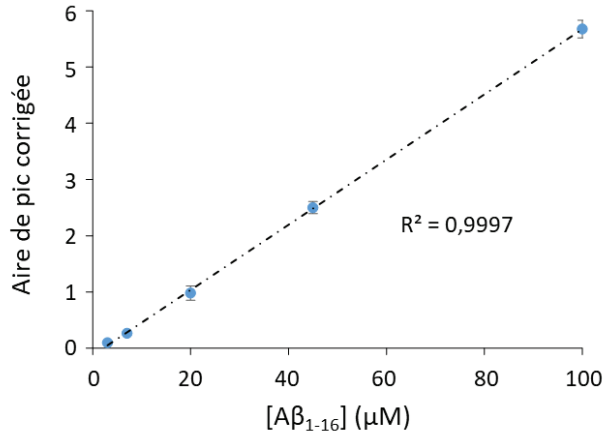


Figure IV-4 - Courbe de calibration obtenue en CE-UV pour le peptide $A\beta_{1-16}$.

Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

Une régression linéaire avec une bonne corrélation a été obtenue, avec $R^2 = 0,9997$.

1.1.2.c) Limite de quantification

La limite de quantification du peptide $A\beta_{1-16}$ en CE-UV a été déterminée en utilisant les hauteurs obtenues en UV et l'équation II-12. Dans ces conditions, la limite de quantification pour le peptide $A\beta_{1-16}$ a été calculée à 6,5 μM , avec $k = 10$. Il est à noter que cette limite de quantification sera plus élevée pour le peptide $A\beta_{1-42}$, car les pics sont significativement plus larges.

1.2. Mise en solution du peptide $A\beta_{1-42}$

1.2.1. Auto-agrégation et variabilité de l'état d'agrégation initiale du peptide $A\beta_{1-42}$

L'état évolutif du peptide causé par son auto-agrégation fait partie des difficultés principales rencontrées pour l'étude du peptide $A\beta_{1-42}$. Cependant, le contrôle de l'état d'agrégation du peptide est essentiel pour fournir des expériences reproductibles.¹⁶⁰ Des variations de l'état d'agrégation initial du peptide $A\beta_{1-42}$ ont déjà été rapportées dans la bibliographie et il a été démontré que son auto-agrégation dépend non seulement des conditions de solubilisation (pH, température, mélange, etc.), mais aussi de la méthode de synthèse du peptide.¹⁶¹ L'utilisation d'un panel de méthodes (spectroscopie de fluorescence, microscopie électronique, diffraction des RX et MS) a permis de montrer une variabilité significative de l'état d'agrégation du peptide en fonction des fournisseurs, ainsi que des variations lot à lot chez un même fournisseur.

Dans ce contexte, l'état d'agrégation initial du peptide issu de différents lots a été étudié par CE-UV. Pour cela, les peptides ont été dissous dans 0,1% d'ammoniaque à environ 2 mg/mL puis ils ont été dilués dans l'électrolyte afin d'obtenir une concentration de 100 μ M et analysés immédiatement. La **figure IV-5** compare l'état initial de 3 lots de peptide $A\beta_{1-42}$ avec le peptide $A\beta_{1-16}$.

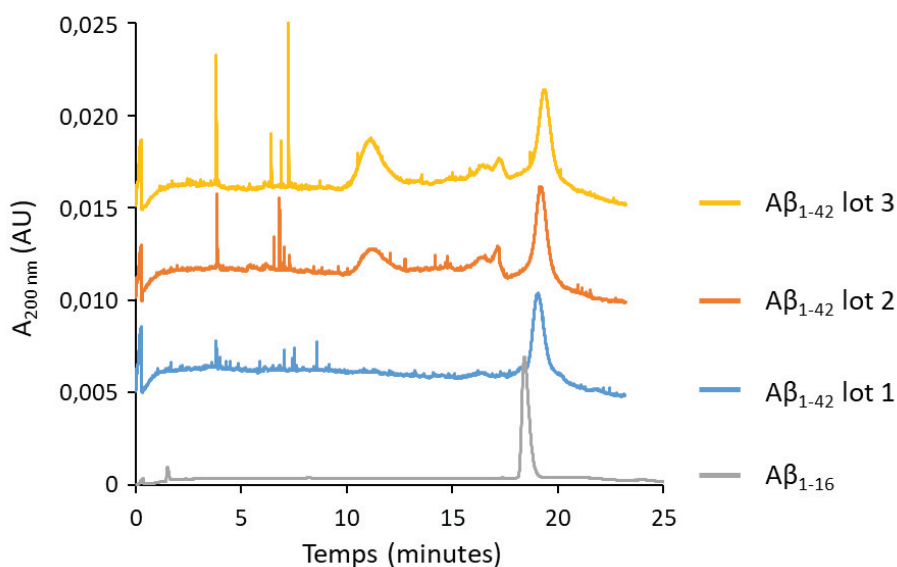


Figure IV-5 - Comparaison de l'état d'agrégation initiale de trois lots de peptide $A\beta_{1-42}$ avec le peptide $A\beta_{1-16}$ en CE-UV. Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μ m d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

Les résultats illustrent le manque de reproductibilité de l'état d'agrégation initiale après la mise en solution du peptide $A\beta_{1-42}$ provenant de différents lots. Alors que le peptide issu du lot 1 ne présente pas de forme oligomérique, les lots 2 et 3 apparaissent comme déjà partiellement oligomérisés à $t = 0$, à hauteur de 22 et 34% respectivement. Leur pourcentage d'oligomérisation a été calculé grâce à l'équation IV-1.

$$\% \text{ oligomérisation} = \frac{\text{Aire corrigée des espèces oligomériques}}{\text{Aire corrigée totale}} \quad (\text{IV-1})$$

L'oligomérisation partielle du peptide issu du lot 2 a été confirmée par fluorescence à la thioflavine T. Celui-ci a été comparé au peptide $A\beta_{1-16}$ qui ne présente pas de formes agrégées (**figure IV-6**).

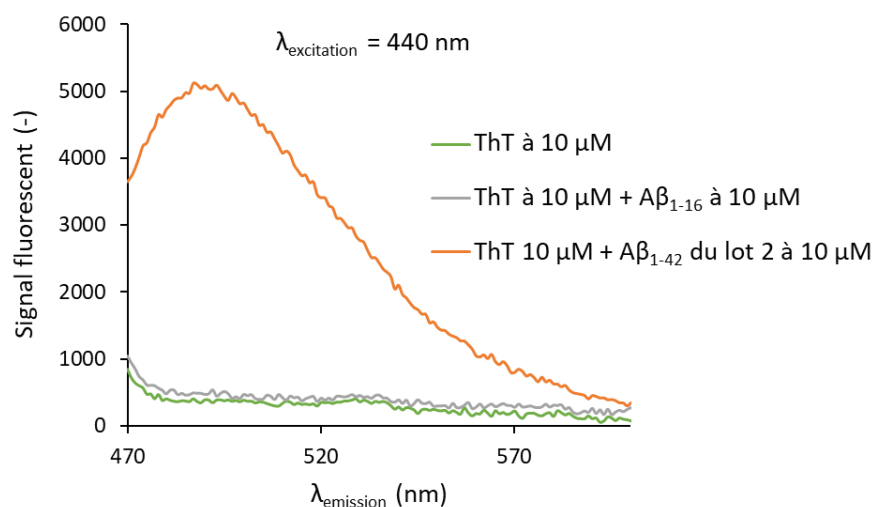


Figure IV-6 - Comparaison du signal de la fluorescence à la ThT du peptide $A\beta_{1-42}$ issu du lot 2 avec celle du peptide $A\beta_{1-16}$.

Le signal fluorescent du lot 2 montre une bande d'émission à 490 nm après excitation à 440 nm, caractéristique de la présence de formes agrégées du peptide $A\beta_{1-42}$. L'intensité de cette bande, multipliée par 5 par rapport au signal de référence, confirme la présence d'espèces oligomériques contenant des feuillettes β à $t = 0$.

1.2.2. Stratégie pour éliminer les formes agrégées

1.2.2.a) Utilisation d'agent de solubilisation

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de cette différence d'état d'agrégation entre les lots tels que la conservation de l'échantillon ou la mise en solution. En ce sens, la bibliographie montre que le protocole de solubilisation du peptide joue un rôle important et que l'auto-agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ lors de cette étape peut être limitée en utilisant des agents de solubilisation tels que l'ammoniaque ou l'hexafluoroisopropanol (HFIP).

NH_4OH est un composé basique qui permet d'améliorer la solubilité du peptide et minimise les interactions intramoléculaires.¹¹⁵ La séparation du peptide issu du lot 1, solubilisé dans NH_4OH à 0,1%, a montré un échantillon ne présentant pas de formes oligomérisées (**figure IV-5**). Cela confirme qu'il est possible d'éviter l'auto-agrégation du peptide dans ces conditions de mise en solution. Cependant, l'état d'agrégation des lots 2 et 3, qui ont subi le même traitement lors de la préparation d'échantillon montre que l'obtention d'un état monomérique n'est possible que si ce dernier n'est pas déjà partiellement agrégé avant solubilisation.

Les protocoles habituellement rencontrés dans la bibliographie pour la désagrégation du peptide consistent en l'utilisation de solvants organiques pour la dissolution du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ afin d'améliorer sa solubilité en perturbant la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires.¹⁶² La désagrégation par l'action d'HFIP a été étudiée par plusieurs groupes en testant différents protocoles avec (1) des volumes d'HFIP variables, (2) une étape d'agitation au vortex ou de sonication plus ou moins longue et (3) un temps d'incubation dans HFIP variable (de trente minutes¹¹⁶ à plusieurs semaines¹⁶³), le plus souvent à température ambiante. Alors que l'action de NH_4OH pour limiter l'agrégation est largement acceptée, l'action de HFIP pour la désagrégation du peptide fait quant à elle débat. Bien que certains auteurs émettent des réserves au sujet de l'efficacité du HFIP,¹⁶⁴ d'autres affirment que celui-ci permet de désagréger efficacement le peptide $\text{A}\beta_{1-42}$. Nous avons donc testé 2 méthodes de désagrégation du peptide issu du lot 2, avec des temps de sonication variables et différentes proportions d'HFIP en présence ou non de NH_4OH .

Dans un premier temps, le peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ issu du lot 2 a été dissous à 500 μM dans 100% de HFIP. Après une étape de sonication allant de 0 à 2h, l'échantillon a été dilué par 5 dans l'électrolyte de séparation (Tris 10 mM NaCl 15 mM) puis analysé en CE-UV dans un capillaire avec un revêtement HPC à -20 kV + 0,1 psi. Les électrophérogrammes obtenus sont présentés dans la **figure IV-7**.

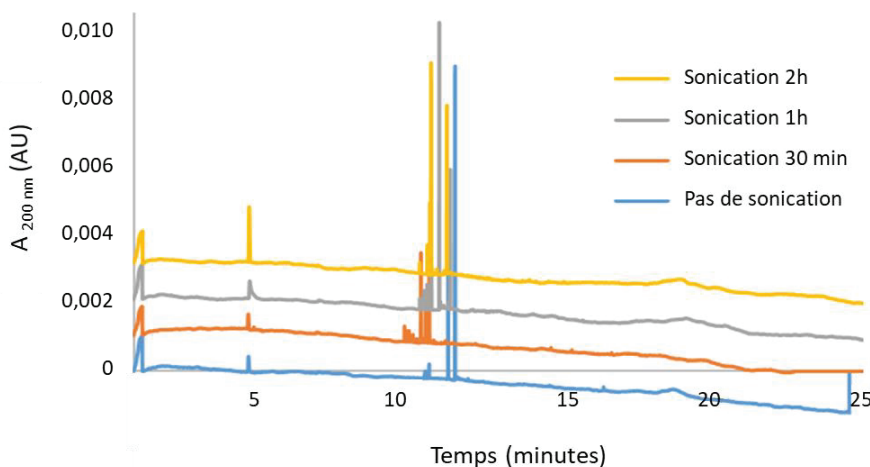


Figure IV-7 – Effet des ultra-sons après solubilisation du peptide dans 100% d'HFIP avec différents temps de sonication. Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

Les électrophérogrammes montrent que la dissolution du peptide dans 100% de HFIP provoque l'agrégation instantanée du peptide. En effet, quel que soit le temps de sonication, on remarque l'absence des pics caractéristiques des oligomères et du monomère. De plus, la présence de spikes, caractéristiques des espèces insolubles, confirme l'état d'agrégation avancé du peptide.

Dans un second temps, le peptide A β ₁₋₄₂ issu du lot 2 a été dissous à 500 μ M dans HFIP à 75% et NH₄OH à 0,1%. Comme précédemment, l'échantillon a été dilué par 5 dans l'électrolyte de séparation (Tris 10 mM NaCl 15 mM) après avoir subi une étape de sonication jusqu'à 1h. Les séparations en CE-UV dans un capillaire recouvert avec HPC à -20 kV + 0,1 psi sont présentées dans la **figure IV-8**. Pour chaque condition, les temps de migration, les aires et les proportions de chaque population sont récapitulés dans le **tableau IV-4**.

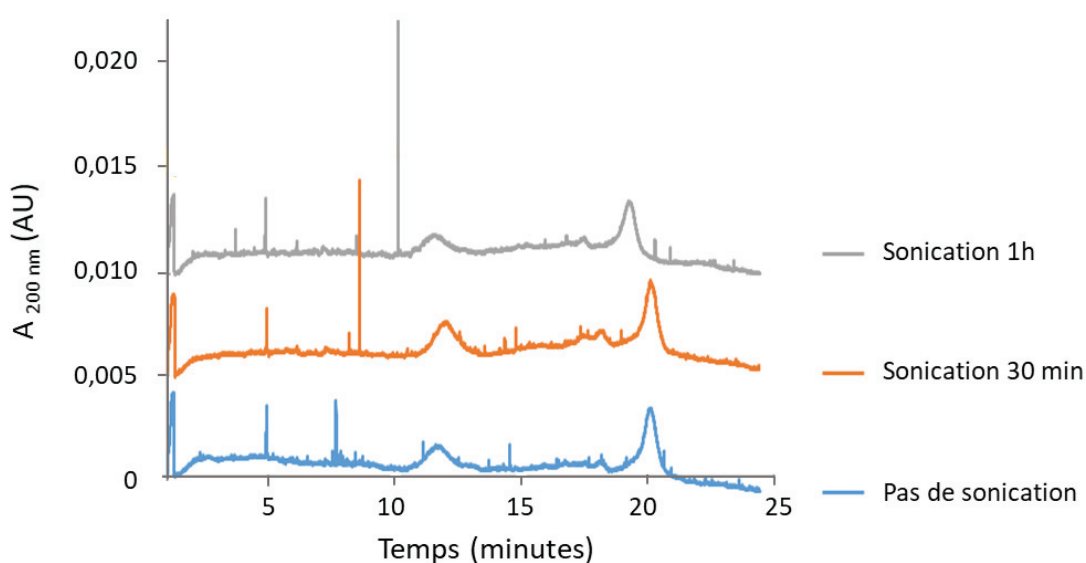


Figure IV-8 - Effet des ultra-sons après solubilisation du peptide dans 75% d'HFIP et 0,1% de NH₄OH avec différents temps de sonication

Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μ m d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

Tableau IV-4 - Action d'HFIP après solubilisation du peptide dans 75% d'HFIP et 0,3% de NH₄OH avec différents temps de sonication.

$t_{\text{sonication}}$	Population oligomérique		Population monomérique		% oligomères	% monomère
	tm (min)	Aire corrigée	tm (min)	Aire corrigée		
0	10.68	2 290	19.10	2 876	0.44	0.56
0.5h	11.08	2 513	19.10	2 750	0.48	0.52
1h	10.58	2 252	18.26	2 102	0.52	0.48

On remarque une action bénéfique due à la présence de NH_4OH qui empêche l'agrégation immédiate du peptide sous forme de fibrilles, observée en présence de 100% HFIP. Cependant, les résultats suggèrent l'inefficacité de l'HFIP sur la désagrégation du peptide. En effet, quel que soit le temps de sonication, le pic caractéristique des oligomères est toujours présent. De plus, alors que le taux d'agrégation du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ était de 22% lors de sa dissolution dans 0,1% de NH_4OH (lot 2, **figure IV-5**), il est de 44% lors de sa dissolution dans le mélange HFIP / NH_4OH .

Ainsi, quel que soit le protocole utilisé, la désagrégation avec HFIP n'a pas donné de résultats convaincants. Au contraire, sa présence semble accélérer le processus d'agrégation du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Bisceglia *et al.* pour qui ni l'utilisation de l'HFIP, ni celle du DMSO n'ont permis d'obtenir un échantillon non agrégé¹¹⁶ et les travaux de Pachahara *et al.*, pour qui la dissolution de l'amyloïde dans HFIP a abouti à la formation d'agrégats.¹⁶⁴

1.2.2.b) Ultrafiltration

Nous avons donc envisagé d'éliminer les agrégats déjà formés par ultrafiltration (UF), afin d'obtenir un état majoritairement monomérique du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$. Nous avons utilisé un dispositif d'UF avec un seuil de coupure de 30 kDa afin de conserver uniquement le monomère et les petits oligomères, le monomère ayant une masse molaire de l'ordre de 4,5 kDa. Le choix de la taille des pores de la membrane a également été guidé par l'étude réalisée par Sabella *et al.*¹¹² qui montre que le filtre à 30 kDa permet d'éliminer efficacement le groupe d'oligomères de haut poids moléculaire, en conservant la forme monomérique et les oligomères de bas poids moléculaire.

Un échantillon de peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ issu du lot 2, solubilisé à 2 mg/mL dans NH_4OH 0,1% et dilué par 5 dans l'électrolyte, a été filtré par centrifugation pendant 10 minutes à 8000 RPM. La solution d'intérêt (le filtrat) a ensuite été injectée en CE-UV et l'électrophérogramme obtenu a été comparé à celui obtenu pour le peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ avant filtration (**figure IV-9**). Les résultats sont résumés dans le **tableau IV-5**.

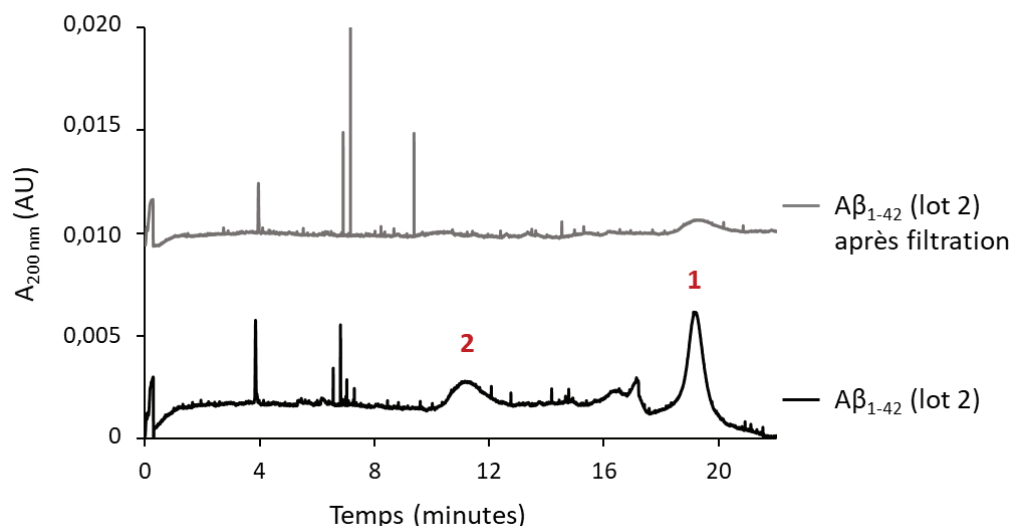


Figure IV-9 - Comparaison des électrophérogrammes obtenus pour la séparation du peptide $A\beta_{1-42}$ avant et après UF. Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

Tableau IV-5 - Aires corrigées obtenues pour la séparation du peptide $A\beta_{1-42}$ avant et après UF.

Echantillons	Aire corrigée pic 1	Aire corrigée pic 2
$A\beta_{1-42}$ avant UF	4 560 \pm 200	3 080 \pm 100
$A\beta_{1-42}$ après UF	70 \pm 20	/

Les résultats montrent que l'UF a conduit à une perte presque totale du peptide, tant pour ses formes oligomères que pour le monomère. Ces résultats peuvent être expliqués par :

- le pic 1 contient des oligomères de poids moléculaire supérieur à 30 kDa,
- la membrane n'est pas inerte vis-à-vis du peptide, où ce dernier peut s'y adsorber.

Bien que l'état d'agrégation initial du peptide $A\beta_{1-42}$ dépende du lot et pose donc des problèmes en terme de reproductibilité, l'obtention d'un peptide uniquement sous forme monomérique par l'action de l'HFIP et de l'UF n'a pas donné de résultats concluants. Dans ces conditions, il ne semble pas possible de revenir aisément à un état monomérique une fois le peptide agrégé. Ainsi, la préparation des échantillons de peptide $A\beta_{1-42}$ dans cette étude se fera par solubilisation du peptide dans NH_4OH pour limiter au mieux son auto-agrégation. La solution ainsi obtenue sera diluée dans le tampon utilisé pour la séparation CE juste avant analyse afin d'obtenir la concentration finale désirée. Puisque l'action de NH_4OH ne suffit pas pour avoir un état d'agrégation unique quel que soit le lot utilisé, un contrôle systématique de l'état d'agrégation initial du lot devra être réalisé par CE-UV.

1.2.3. Détermination de la concentration d'ammoniaque adaptée

L'ammoniaque étant un complexant de Cu(II), par la formation du complexe $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$, une étude a été menée pour déterminer la concentration maximale en NH_4OH possible sans engendrer la formation du complexe $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ de manière compétitive. Pour cela, le peptide $\text{A}\beta_{1-16}$ a été choisi comme modèle et l'ICP-MS a été sollicitée pour étudier la répartition du cuivre. Pour cela, des solutions contenant 100 μM de peptide $\text{A}\beta_{1-16}$, 10 μM de Cu(II) et une concentration croissante en NH_4OH ont été analysées en CE-ICP-MS dans un capillaire HPC avec du Tris 10 mM NaCl 15 mM pH 7,4. Les électrophérogrammes obtenus sont représentés dans la **figure IV-10** et le **tableau IV-6**.

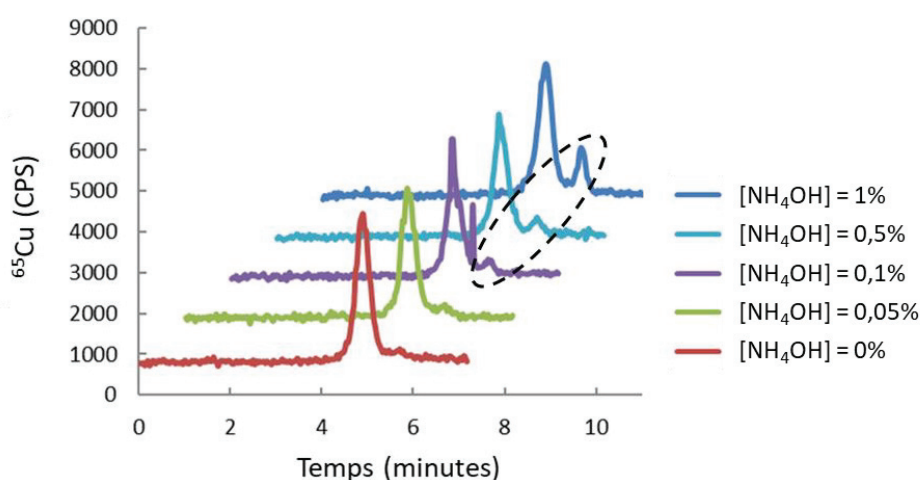


Figure IV-10 - Séparation de 100 μM de peptide $\text{A}\beta_{1-16}$ en CE-ICP-MS en présence de 10 μM de Cu(II) et d'une concentration croissante en NH_4OH .

Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,5 psi, 25°C, détection : ICP-MS à $m/z = 65$ à 64 cm.

Tableau IV-6 - Etude de l'influence de la concentration en ammoniaque sur la séparation du peptide $\text{A}\beta_{1-16}$ en présence de Cu(II).

[NH_4OH] en %	Aire ^{65}Cu pic principal (coups)	Aire ^{65}Cu pic secondaire (coups)	Aire ^{65}Cu totale (coups)
0	76 000 \pm 3 000	/	76 000 \pm 3 000
0,05	73 000 \pm 3 000	100 \pm 30	73 100 \pm 3 000
0,1	70 000 \pm 3 000	1 500 \pm 50	71 500 \pm 3 000
0,5	65 000 \pm 2 000	5 000 \pm 100	70 000 \pm 2 000
1	61 000 \pm 2 000	12 500 \pm 200	73 500 \pm 2 000

Les résultats montrent l'apparition d'un pic correspondant à la formation significative du complexe $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ à partir de 0,1% de NH_4OH dans l'échantillon (correspondant à environ 2% du cuivre total). De ce fait, la concentration en ammoniacque ne devra pas excéder 0,05% dans l'échantillon lors de son analyse pour ne pas agir comme un compétiteur lors des analyses quantitatives en CE-ICP-MS. La mise en solution du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ se fera donc par solubilisation à 2 mg/mL (environ 450 μM) dans NH_4OH à 0,1% pour garantir une bonne stabilité des échantillons dans le temps et une concentration d'ammoniacque inférieure à 0,05% dans l'échantillon après dilution dans le tampon.

1.3. Conservation du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ après la mise en solution

Après avoir déterminé le protocole adapté pour la mise en solution du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ dans le but de limiter son auto-agrégation, il est important d'étudier sa conservation en solution. Pour ce faire, le peptide majoritairement sous forme monomérique (lot 1) a été mis en solution à environ 2 mg/mL ($\sim 500 \mu\text{M}$) dans NH_4OH 0,1% et une moitié a été conservée à température ambiante (échantillon 1) et l'autre à 4°C (échantillon 2). Une partie de chaque échantillon a été diluée par 5 dans l'électrolyte juste avant séparation en CE-UV à -20 kV + 0.1 psi dans un capillaire HPC et ce, sur plusieurs jours. Les électrophérogrammes obtenus sont représentés dans les **figures IV-11** et **IV-12** respectivement et les données regroupées dans les **tableaux IV-7** et **IV-8**.

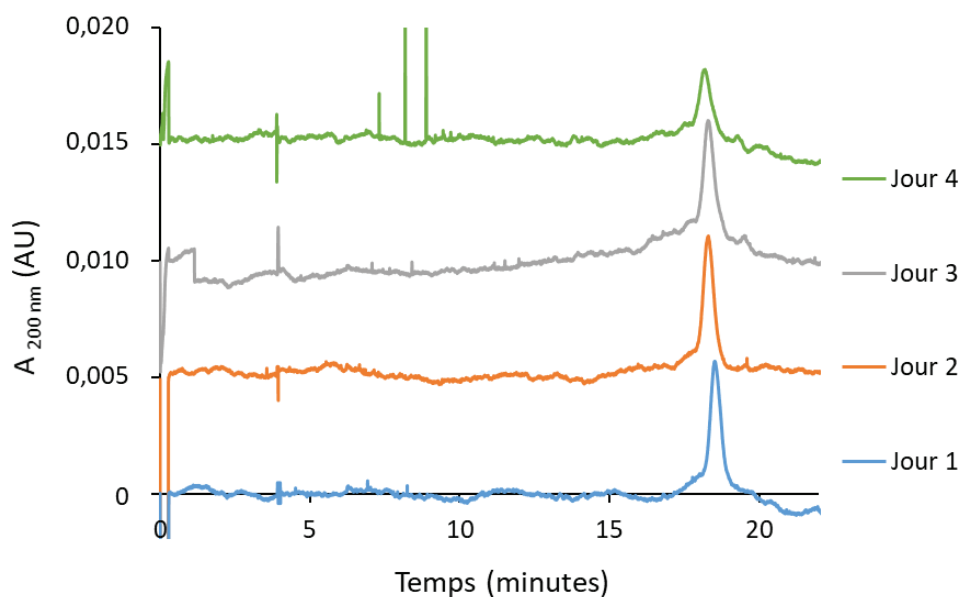


Figure IV-11 - Etude de la conservation de l'échantillon 1 à température ambiante. Injection à 0,5 psi 5 sec. Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

Tableau IV-7 - Evolution au cours du temps de la séparation en CE-UV de l'échantillon 1 conservé à température ambiante.

Analyse	tm (min)	Aire corrigée
Jour 1	18,57 ± 0,04	5 800 ± 200
Jour 2	18,42 ± 0,03	5 760 ± 200
Jour 3	18,38 ± 0,05	5 640 ± 200
Jour 4	18,37 ± 0,05	2 900 ± 100

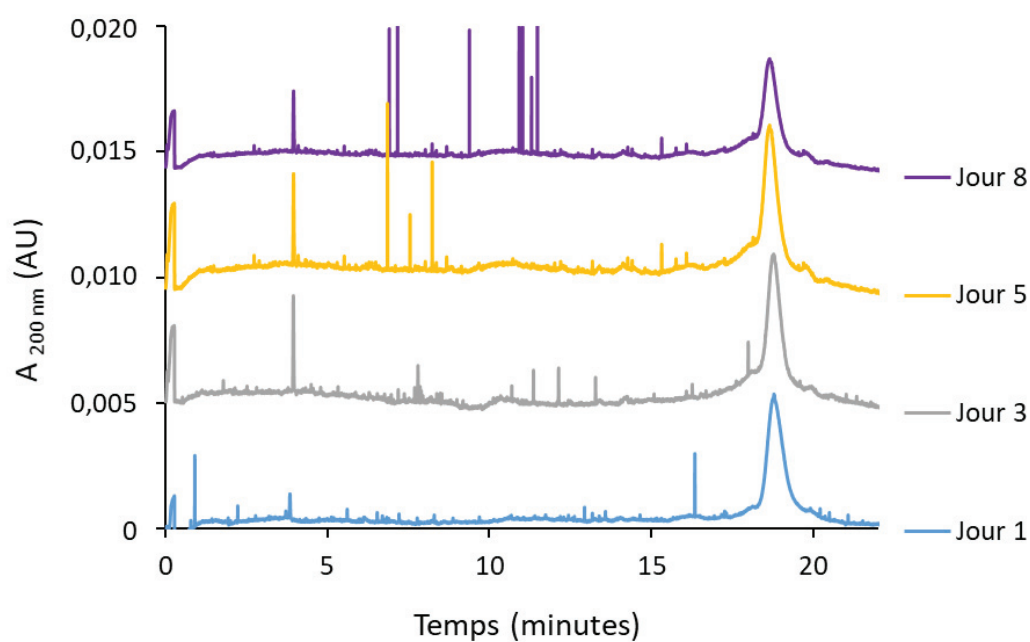


Figure IV-12 - Etude de la conservation de l'échantillon 2 à 4°C.

Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 µm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

Tableau IV-8 - Evolution au cours du temps de la séparation en CE-UV de l'échantillon 2 conservé à 4°C.

Analyse	tm (min)	Aire corrigée
Jour 1	18,62 ± 0,03	5 700 ± 200
Jour 3	18,66 ± 0,02	5 600 ± 200
Jour 5	18,65 ± 0,04	5 500 ± 200
Jour 8	18,62 ± 0,02	3 700 ± 100

Il est à noter la diminution du pic caractéristique du monomère et des petits oligomères pour les jours 4 et 8 pour une conservation à température ambiante (**tableau IV-7**) ou à 4°C (**tableau IV-8**) respectivement. La diminution de ce dernier s'accompagne de l'apparition de spikes, caractéristiques de la présence d'espèces agrégées insolubles. L'étude sur la conservation du peptide $A\beta_{1-42}$, majoritairement sous forme monomérique à $t = 0$, montre que celui-ci peut être conservé après solubilisation dans NH_4OH 0,1% à 2 mg/mL ($\sim 450 \mu M$) pendant 3 jours conservé à température ambiante et 5 jours conservé à 4°C.

2. Influence des métaux sur l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ en CE-UV

2.1. Evolution de l'état d'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ sans métal

La cinétique d'agrégation a dans un premier temps été étudiée par CE-UV sans métal et ce, sur les peptides issus des lots 1 (principalement sous forme monomérique) et 2 (partiellement agrégé à hauteur de 22%). Pour ce faire, 100 μM de peptide dans 10 mM de Tris et 15 mM de NaCl contenant 0,02% de NH_4OH ont été séparés dans un capillaire avec un revêtement HPC à -20 kV + 0,1 psi à différents temps d'incubation.

Les électrophérogrammes obtenus sont représentés dans la **figure IV-13** pour les lots 1 (A) et 2 (B).

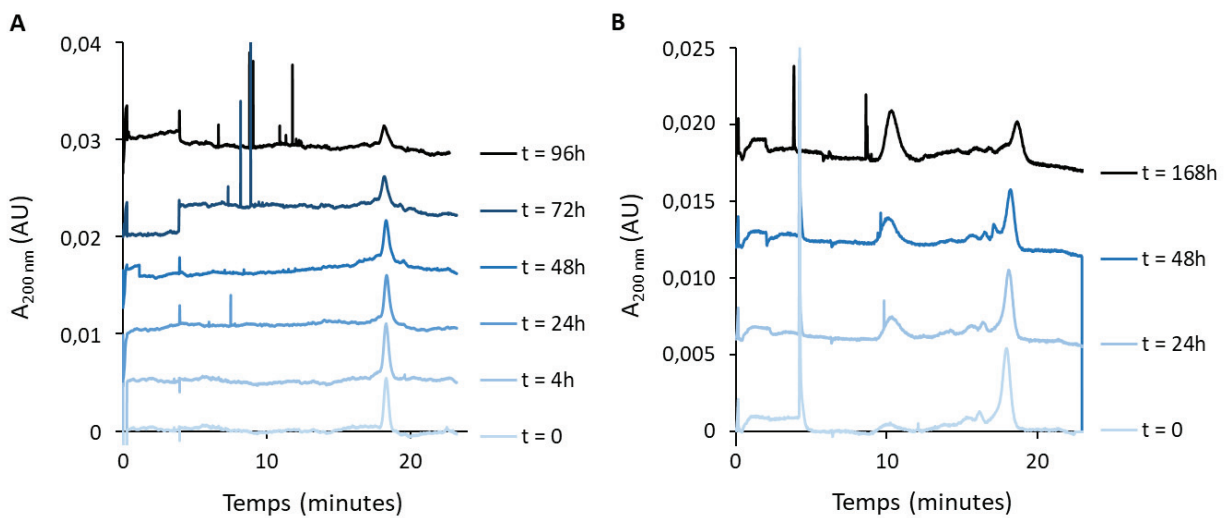


Figure IV-13 - Etude cinétique de l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ issu des lots 1 (A) et 2 (B).

Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

La **figure IV-14** regroupe les données obtenues pour les aires corrigées de la population monomère/petits oligomères du peptide issu du lot 1 (A) et le ratio des aires corrigées des deux populations de peptide A β issues du lot 2 (B) au cours du temps.

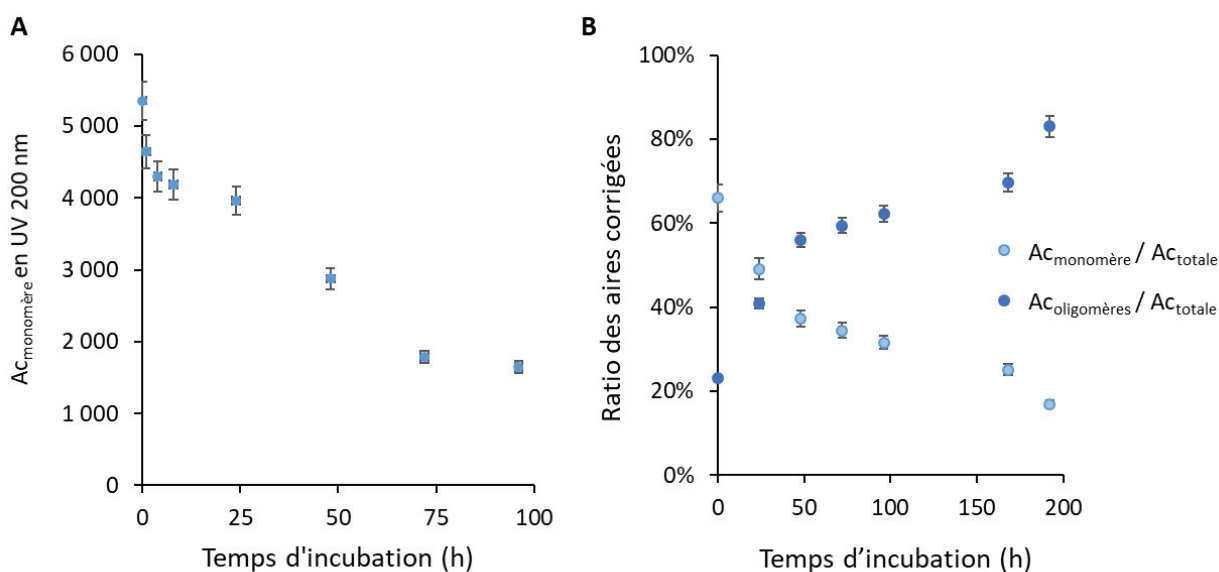


Figure IV-14 - Evolution de l'aire corrigée de la population monomérique issue du lot 1 (A) et évolution du ratio des aires corrigées des différentes formes sur l'aire corrigée totale du signal UV pour le lot 2.

Dans le cas du lot 1 (**figure 13.A**), on remarque la présence majoritaire du pic caractéristique du monomère et des petits oligomères du peptide quel que soit le temps d'incubation. La diminution de l'aire de ce pic au cours du temps s'accompagne de l'apparition d'espèces insolubles de type fibrilles à partir de $t = 72$ h. Cependant, il est à noter l'absence de formes oligomériques intermédiaires, quel que soit le temps d'incubation.

En revanche, l'évolution des aires corrigées obtenues pour le lot 2, déjà partiellement agrégé à $t = 0$, montre la diminution de la population monomère / petits oligomères au profit des gros oligomères, jusqu'à l'obtention de 90% de gros oligomères à $t = 190$ h. Il est également à noter l'absence de fibrilles quel que soit le temps d'incubation. Les différences entre ces deux lots montrent l'existence de différents chemins réactionnels, pouvant mener à la formation de différentes formes agrégées solubles ou non, comme il a déjà été montré dans la bibliographie.^{148,165} Les données mettent aussi en lumière l'importance de prêter attention à l'état d'agrégation initiale du peptide. En effet, pour avoir des données comparables et reproductibles il est important de travailler avec un état d'agrégation initial unique. Ainsi, les études suivantes ont toutes été réalisées sur le lot 2, partiellement agrégé à hauteur de 22%.

2.2. Influence de Cu(II) et de Zn(II) sur l'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂ dans des conditions stœchiométriques

La CE avec détection UV a été mise à contribution pour étudier l'effet du cuivre et du zinc, présents dans des proportions stœchiométriques par rapport au peptide, sur la cinétique d'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂. Pour cela, 100 μ M de peptide dans Tris 10 mM NaCl 15 mM NH₄OH 0,02% ont été incubés en présence de 100 μ M de Cu(II) (A) ou de 100 μ M de Zn(II) (B), puis séparés à -20 kV + 0,1 psi dans un capillaire avec un revêtement HPC avec du Tris 10 mM NaCl 15 mM à pH 7,5 comme électrolyte. Les électrophérogrammes obtenus à différents temps d'incubation sont représentés dans la **figure IV-15**.

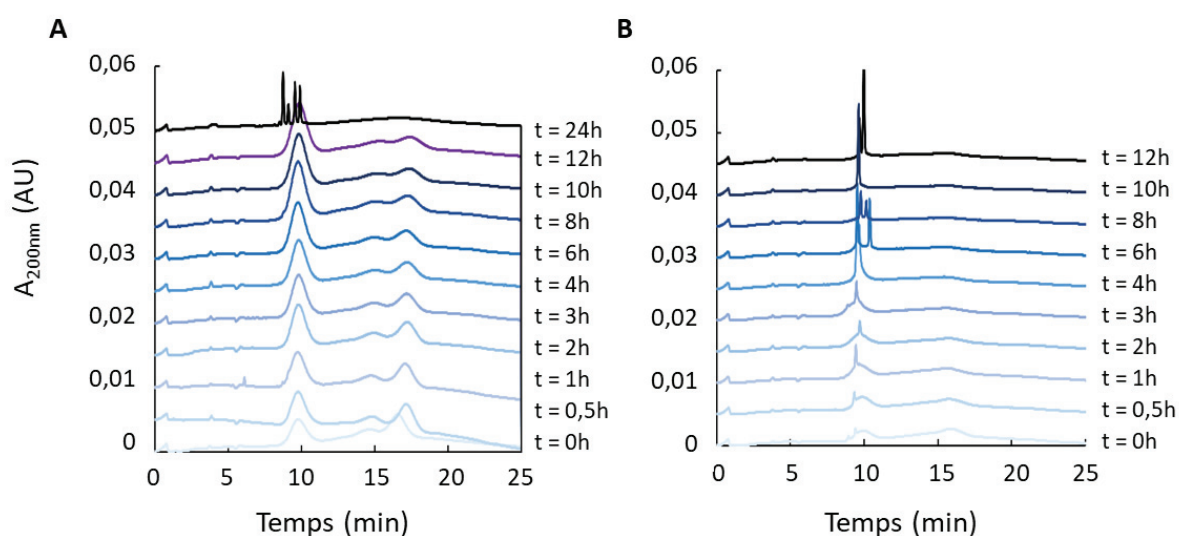


Figure IV-15 - Electrophérogrammes obtenus pour étudier la cinétique d'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂ en présence de Cu(II) (A) ou Zn(II) (B).

Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μ m d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

Les proportions respectives des populations monomérique et oligomérique ont été calculées à partir des aires de pic corrigées et tracées en fonction du temps d'incubation (**figure IV-16**) en présence de Cu(II) (A) et de Zn(II) (B). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus précédemment sans métal pour ce même lot (**figure IV-14.B**).

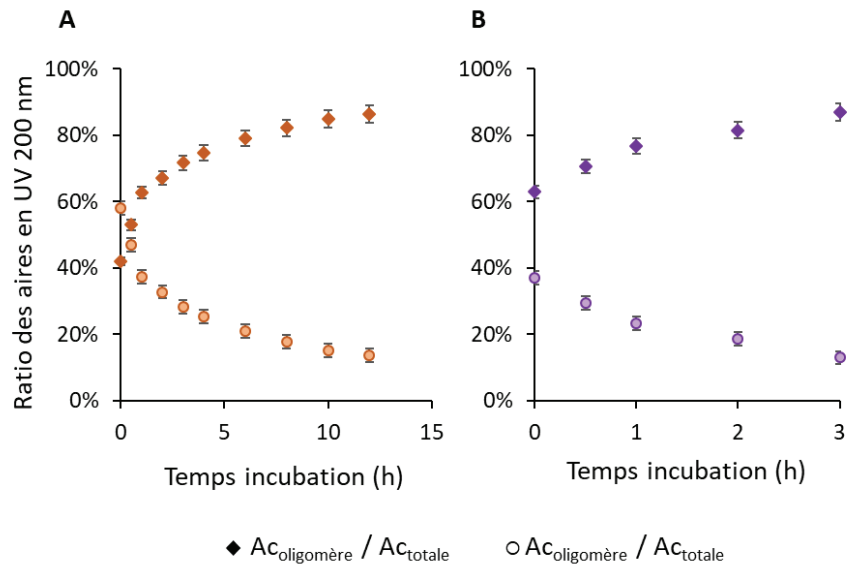


Figure IV-16 - Evolution de l'agrégation du peptide Aβ₁₋₄₂ au cours du temps en présence de Cu(II) (A) ou de Zn(II) (B).

L'état d'agrégation initial du peptide dépend de la présence ou non de métal dans l'échantillon. Pendant que celui-ci se trouve à 22% sous formes agrégées à $t = 0$ sans métal, la proportion de formes oligomériques se voit augmenter à 40% et 60% en présence de Cu(II) et de Zn(II) respectivement. De plus, la cinétique d'agrégation est largement accélérée en présence de métaux et plus particulièrement en présence de zinc. En effet, le peptide Aβ₁₋₄₂ se présente à 90% sous forme oligomérisée à partir de 3h ou 12h après dilution dans des solutions contenant du Zn(II) ou du Cu(II) respectivement (**figure IV-16**), alors que ce taux d'oligomérisation est atteint au bout de 200h en absence de métal (**figure IV-14.B**). Au-delà de ces temps d'incubation, il est à noter l'apparition de fibrilles.

Ainsi, les résultats montrent que le zinc et le cuivre présents dans des proportions M : L de 1 : 1 ont un effet promoteur sur l'agrégation du peptide Aβ₁₋₄₂, accélérant la cinétique et la formation d'espèces insolubles de type fibrilles. Zn(II), déjà reconnu comme favorisant d'avantage l'agrégation du peptide Aβ₁₋₄₀ par rapport à Cu(II)¹⁶⁶ semble avoir un effet similaire sur le peptide Aβ₁₋₄₂.

2.3. Article 2 : Influence de Cu(II) sur l'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂ dans des conditions sous-stœchiométrique et étude de sa répartition

Résumé :

Cet article présente le développement d'une méthode analytique permettant d'étudier :

- l'influence de la concentration en Cu(II) sur la cinétique d'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂,
- la répartition du cuivre dans les différentes formes agrégées solubles du peptide A β ₁₋₄₂ pour des rapports sous-stœchiométriques en cuivre par rapport au peptide.

La première partie de cet article reprend les difficultés liées à la dissociation des complexes labiles en science séparative, décrites plus précisément dans le chapitre 2 de ce manuscrit, en utilisant le peptide A β ₁₋₁₆ comme modèle.

Dans un second temps, la CE-UV a été mise à contribution pour étudier l'effet de la stœchiométrie en cuivre sur la cinétique d'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂. La concentration croissante en cuivre, toujours dans des proportions A β : Cu(II) sous-stœchiométriques, s'est avérée accélérer significativement la vitesse d'agrégation du peptide, par rapport à l'auto-agrégation du peptide A β ₁₋₄₂ sans métal.

Parallèlement, le couplage CE-ICP-MS a permis d'étudier l'affinité de Cu(II) pour les formes oligomériques par rapport au monomère. Dans le cas d'une stœchiométrie 1 : 0,1, une étroite corrélation entre les proportions obtenues en CE-UV et en CE-ICP-MS a été observée, semblant indiquer une affinité similaire de Cu(II) pour les différentes formes du peptide A β ₁₋₄₂. En revanche, en ce qui concerne la stœchiométrie 1 : 0,5, la superposition des données UV et ICP-MS suggère clairement que Cu(II) est majoritairement présent dans la fraction « monomère et petits oligomères ». Cette différence soutiendrait l'hypothèse de la formation de complexes intramoléculaires aux faibles concentrations de Cu(II) et intermoléculaires pour les concentrations plus élevées.

CE-ICP-MS to probe $A\beta_{1-42}$ / copper (II) interactions, a complementary tool to study amyloid aggregation in Alzheimer's Disease

C. Duroux, A. Hagege

Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 69100 Villeurbanne, France, e-mail : agnes.hagege@isa-lyon.fr

Metallomics, accepté en décembre 2021

Abstract: Copper (II) ions appear to be involved in the Alzheimer's disease (AD) and seem to influence the aggregation of the amyloid- β_{1-42} ($A\beta_{1-42}$) peptide. However, data are not conclusive and still not subject to consensus, copper (II) being suspected to either promote or inhibit aggregation. To address this question, CE-ICP-MS hyphenation was proposed as a complementary tool to follow the distribution of copper in the different oligomeric forms, at different sub-stoichiometries and different incubation times. Results clearly indicated the formation of several negatively charged copper complexes and showed the enhancement of the aggregation rate with copper concentration. Moreover, the variations of copper (II) speciation suggest different aggregation pathway, even for sub-stoichiometric ratios.

Keywords: amyloid- β ; oligomerization ; copper speciation ; CE-ICP-MS hyphenation ; labile complexes ; voltage induced dissociation

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common forms of dementia in the world, characterized by progressive cognitive and memory impairments. However, the treatments are further hampered by the lack of understanding of the highly complex mechanisms at the origin of AD. While it now seems accepted that amyloid- β peptides ($A\beta$), mainly $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$, play a central role, their mode of action is not yet understood. Although the aggregation of the peptide appears to be a crucial step, many questions remain unsolved about the toxicity of oligomerized species of $A\beta$. Toxicity, initially attributed to the presence of senile plaques,¹ seems to be now caused by small soluble oligomers of these peptides.²

In addition, the involvement of metals such as copper (Cu), zinc (Zn), and iron (Fe) seem to be accepted and is supported by various observations.

As far as Cu is concerned, micro-PIXE analyses performed by Lovell *et al.* indicated a significant increase in Cu in amyloid plaques rims.³ Cu and Zn observed in brain by SXRF microprobe were also reported to be localized in high β -sheet content regions.⁴ However, even if a co-localization of Cu with these amyloid plaques was ascertained,^{3,4} some authors reported a non-significant increase of Cu amounts associated with A β plaques in brain regions of Alzheimer patients, compared to the basal Cu levels.⁵ Conversely, ICP measurements of 7 brain regions from 9 cases with AD revealed a copper deficiency in all AD brain regions.⁶

Apparently contradictory findings were also reviewed about the influence of Cu(II) on aggregation.⁷ Both promoting^{8,9} and inhibiting effects¹⁰⁻¹² of copper binding on aggregation were reported. A β_{1-42} aggregation is an intricate problem since many parameters, such as pH, temperature, and concentrations affect this phenomenon. However, Cu(II) appears to be one of the driving forces in the conformational changes of the A β_{1-42} in different oligomerized forms with various structures and sizes, such as pre-fibrillar oligomers, fibrillar oligomers and annular protofibrils.¹³ Pedersen *et al.* proposed the existence of copper-dependent aggregation pathways.¹² It was suggested that the presence of Cu (II) in high concentration leads to the formation of amorphous deposits prone to precipitation. However, under stoichiometric ratios, Cu(II) might accelerate β -sheet formation, promoting the appearance of thioflavin-T reactive fibrils species.¹⁴ Little data have been published on the aggregation kinetics of A β_{1-42} upon addition of sub-equimolar amounts of Cu(II). In these conditions, Cu was found to lead to the formation of oligomers and even to the disassembly of fibres.¹⁵

Although many studies have been devoted to this problem, most of them were focused on amyloid- β peptide's conformation, structure and properties variations upon copper addition. Developments of speciation approaches allowing the study of the association of metals with the oligomers of these A β are scarce. No changes in Cu(II) coordination environment were detected in EPR when bound to A β_{1-40} in various oligomeric states⁸ which seems to preclude its use in speciation analysis. The coupling of ion mobility with mass spectrometry was used to demonstrate the stabilization of metal-induced compact forms of A β_{1-40} oligomers, from trimers to pentamers, in the presence of metal ions such as Cu²⁺ and Zn²⁺. Although recorded mass spectra correspond to metal-free oligomers, the slow interconversion between compact species and extended species allowed to retain the metal-bound drift time profile in their metal-free form.¹⁶

The aim of the presented research was to propose an analytical approach to assess the distribution of Cu (II) among the different A β ₁₋₄₂-species. Directly assessing metal-A β complexes requires an analytical method allowing a minimal disruption of the complexes. Capillary zone electrophoresis coupled to ICP-MS was successfully used for the analysis of several metal-protein complexes.¹⁷⁻²⁰ However, owing to the small size of the peptides and oligomers and the lability of copper complexes, analysis of Cu(II) complexes of A β ₁₋₄₂ remains a difficult challenge. Capillary zone electrophoresis was demonstrated to be able to separate A β monomer and oligomers,²¹⁻²⁵ but to our knowledge, only one study looked at the fate of both amyloid- β peptides and Cu. However, only total Cu concentrations were measured by ICP-MS after centrifugation and no speciation data were provided.¹²

Here the use of coupling of capillary electrophoresis to ICP-MS has been proposed to study the influence of Cu(II) on A β ₁₋₄₂ aggregation and evaluate the Cu content of oligomers during the aggregation process.

2. Materials and methods

2.1. Products

A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₁₆ (purity \geq 95%) were purchased as lyophilized powder from GeneCust (Boynes, France) and used without further purification. Tris (Trizma[®] base), sodium chloride, hydrochloric acid 37%, tributyl phosphate (TBP) 99% and EDTA were obtained from Sigma-Aldrich. Nitric acid 1% was obtained by dilution in water of HNO₃ 65% (Suprapur[®] quality) purchased from Merck. Stock solution of Cu(II) at 500 μ M in 10 mM Tris, 15 mM NaCl at pH 7.4 was obtained via dissolution of CuCl₂.2H₂O purchased from Merck. Acetone (0.1% in water) and tributylphosphine (TBP 0.03% in DMSO 2%) purchased from Sigma-Aldrich were used as neutral species markers for CE-UV and CE-ICP-MS respectively.

Since Cu is one of the most difficult element to analyze at trace levels, extreme caution was taken to avoid external contamination (see SI). All products were analysed regarding to their Cu content by ICP-MS and compared with a reference value obtained for copper at 5 ppb. Products with contamination greater than the one measured for HNO₃ 1% were discarded (a few tens of ppt). Before use, labware was cleaned three times with nitric acid 1%. These precautions drastically improve the background level which can however not fall below 600 cps.

Fused-silica capillaries were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ). A hydroxypropyl cellulose (HPC) thermal coating of the capillaries (I.D of 75 μ m, O.D of 375 μ m, 64 cm total length)²⁶ was performed using a HPC solution, 0.05 g/ mL in water in order to limit the interactions between the silanols of the capillary surface and the copper ions.

2.2. Peptide samples preparation

Stock solutions of A β ₁₋₄₂ at 250 μ M were prepared by direct dissolution of lyophilized A β ₁₋₄₂ in 0.1% (m/v) ammonium hydroxide aqueous solution. Stock solutions of A β ₁₋₁₆ at 500 μ M were prepared by direct dissolution of lyophilized A β ₁₋₁₆ in 10 mM Tris, 15 mM NaCl at pH 7.4. A β peptides concentration was determined by UV measurements (Thermo Scientific™ NanoDrop™ UV-Vis Spectrophotometer) at 280 nm ($\epsilon = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for both peptides, from UniProtKB/Swiss-Prot Database). These solutions were checked to be stable over one week, when stored at 4°C.

Before each study, A β peptides were diluted in 10 mM Tris, 15 mM NaCl at pH 7.4 and varying volumes of the stock solution of Cu(II) were added in order to obtain a final peptide concentration of 100 μ M in 8 mM Tris, 10 mM NaCl at pH 7.4, in the presence of different concentrations of Cu(II).

2.3. Taylor dispersion analysis (TDA) for A β ₁₋₄₂ size measurements

TDA experiments were conducted using a Beckman P/ACE MDQ instrument in HPC capillaries. After injection (0.5 psi, 5 s, i.e. 23.5 nL), samples were mobilized with an applied pressure of 0.7 psi. The mobilization medium used was a Tris 10 mM, NaCl 15 mM buffer at pH 7.4 and detection was performed by UV at 200 nm with a data acquisition rate of 16 Hz (detection length: 54 cm). Between runs, the capillary was flushed at 10 psi for 5 min with the mobilization medium.

The taylorgrams obtained by TDA can be assimilated to the sum of several Gaussians signals:

$$S(t) = \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma_i^2}\right) \quad (1)$$

where t_0 is the peak residence time and A_i and σ_i are the area under the curve and temporal variance associated to the different species i , respectively.

Under these experimental conditions, the molecular diffusion coefficient D is given by equation 2 and can be related to the hydrodynamic radius of the species.

$$D = \frac{r_c^2 t_0}{24\sigma^2} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (2)$$

where r_c is the capillary radius, k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature, η is the viscosity, and R_h is the hydrodynamic radius of the solute. For a Tris 10 mM, NaCl 15 mM buffer, the viscosity was previously measured and found to be 0.908.

Deconvolution and integration of the peak was performed using the Origin 8.5 software, assuming $\epsilon_{200\text{nm}}$ to be equal for all A β ₁₋₄₂ species.

2.4. Aggregation monitoring using CE-UV

CE experiments were carried out on a Beckman P/ACE MDQ instrument, using HPC capillaries. The background electrolyte (BGE) was 10 mM Tris, 15 mM NaCl at pH 7.4. Prior to the first use, the capillary was flushed with water and BGE for 5 min under 10 psi. Samples were introduced into the capillary by hydrodynamic injection under 0.5 psi for 5 sec (i.e. 23.5 nL). Separations were performed at 25°C at -20 kV with an assisted pressure of 0.1 psi. Since amyloid- β compounds have relatively low electrophoretic mobility, this additional pressure was necessary to compensate the absence of electroosmotic mobility in a neutral capillary such as HPC. The assisted pressure leads to a reduced residence time in the capillary but also to the formation of a Poiseuille flow affecting the peak width, and consequently the resolution. Detection was performed by UV at 200 nm at 54 cm from the inlet with an acquisition rate of 16 Hz. Data were collected using the 32 Karat Software. Between runs, the capillary was rinsed with the BGE for 5 min under 10 psi.

Calculation of A β_{1-42} species content was performed using the classical correction of peak areas in CE (measured area divided by migration time), assuming $\epsilon_{200\text{nm}}$ to be equal for all A β_{1-42} species.

2.5. Determination of copper distribution using CE-ICP-MS

For CE-ICP-MS hyphenation, the ICP-MS instrument used as detector was an Agilent 7700 equipped with a MicroMist nebulizer. The spectrometer was controlled by the MassHunter software. Hyphenation was achieved *via* a home-made sheath-flow interface. The capillary goes first through a microcross piece toward the tip of the nebulizer. The electrical connection was achieved by the ground electrode positioned through the third inlet of the microcross. The sheath liquid (Tris 5 mM, pH 7.4 containing 10 μM EDTA to warrant the absence of copper sorption on ICP-MS glass parts) was introduced by self-aspiration to the fourth inlet of the interface. The sheath liquid solution height was adjusted by means of an elevator to both eliminate the suction effect due to the nebulizer and avoid any flow reversal into the capillary following the procedure described elsewhere.²⁷ The optimal flow was estimated to be around 450 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ by measuring the sheath flow consumption over a 30 min period. This interface was checked not to introduce significant external dispersion (see supplementary information).

Samples were introduced into the HPC capillary by hydrodynamic injection under 1 psi for 10 sec (i.e. around 90 nL). Electrophoretic separations were performed at 25°C at -7 kV assisted by a pressure of 0.3 psi. Cu was detected by ICP-MS at $m/z = 65$ (dwell time 1 s) at the end of the capillary (64 cm). ICP operating conditions were: carrier gas flow rate: 1 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, makeup gas flow rate: 0.1 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, plasma gas flow rate: 15 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, auxiliary gas flow rate: 0.9 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, radiofrequency power 1550 W for the plasma, other parameters were tuned in order to maximize the signal. Between runs, the capillary was rinsed with nitric acid 1% for 10 min under 5 psi and with the BGE for 5 min under 5 psi.



Integration of the Cu(II) containing peaks was performed using Origin 8.5 by minimizing an exponentially modified Gauss function, as proposed by Sauge-Merle *et al.*²⁸, when using low resolution conditions (i.e. 5kV + 0.5 psi in their case).

3. Results and discussion

3.1. Identification of A β ₁₋₄₂ species

In order to follow A β ₁₋₄₂ aggregation, attempts to identify the different of A β ₁₋₄₂ species within electropherograms were performed. For that purpose, two different solutions containing 100 μ M A β ₁₋₄₂ were prepared: one solution prepared in self-aggregating conditions, i.e. incubated for 48h at room temperature in the electrolyte at pH 7.4, another one in conditions limiting aggregation, i.e. freshly prepared in NH₄OH 0.1%.

Analyses of both samples were realized in capillary electrophoresis at -20 kV + 0.1 psi in a HPC-modified capillary using Tris 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7.4 as background electrolyte. The resulting electropherograms are presented in Figure 1.

The electrophoretic mobilities (μ_{ep}) were determined by subtracting the Poiseuille flow contribution, using acetone as a neutral marker (NM) and thanks to the equation 3:

$$\mu_{ep} = \frac{L_d L_t}{V} * \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{NM}} \right) \quad (3)$$

where L_d is the length of detection, L_t is the total length of the capillary, V is the applied voltage, t_m is the migration time of the analyte peak and t_{NM} is the migration time of the neutral marker peak.

Apart from the first peak attributed to the presence of NH₄OH by direct injection of a 0.05% NH₄OH, both mobilograms exhibit two main peaks (1 and 2), with electrophoretic mobilities of $- 2 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $- 1 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectively (Fig.1a).

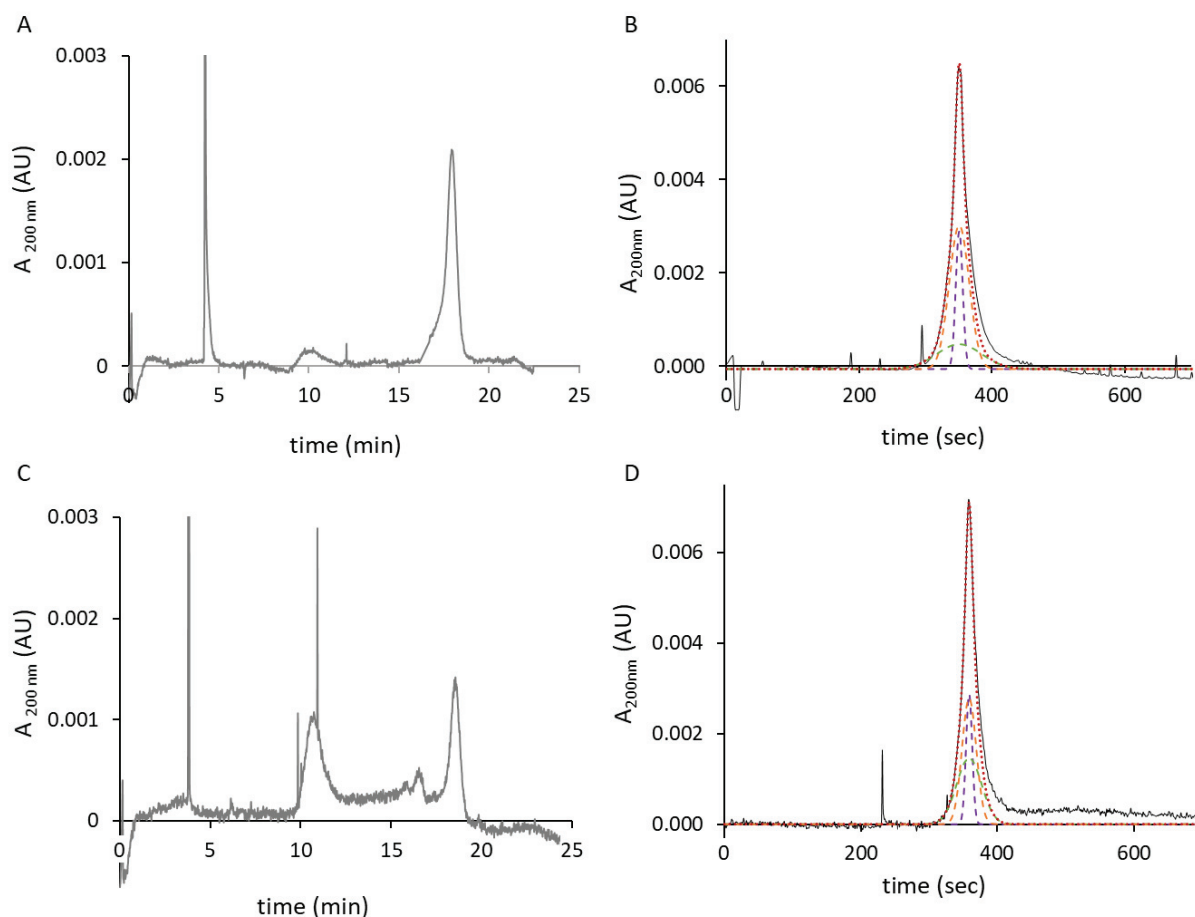


Figure 1: Electrophoretic profiles of obtained by CE-UV (a,c) and Taylorgrams obtained by TDA-UV (b,d). Samples: 100 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ at $t = 0$ after dilution in 0.1% NH_4OH (A,B) and at $t = 48\text{h}$ after dilution in 10 mM Tris buffer containing 0.04% NH_4OH at pH 7.4 (c,d).

CE experimental conditions: HPC coated - capillary (75 μm i.d. x 64 cm), buffer: 10 mM Tris, 15 mM NaCl at pH 7.4, -20 kV with an assisted pressure of 0.1 psi, 25°C. Detection: UV at 200 nm at 54 cm from the inlet.

TDA experimental conditions: HPC coated - capillary (75 μm i.d. x 64 cm), buffer: 10 mM Tris, 15 mM NaCl at pH 7.4, mobilisation pressure: 0.7 psi, 25°C. Detection: UV at 200 nm at 54 cm from the inlet.

Peak areas were measured for both peaks and the respective percentages of both species were calculated from the corrected peak areas (peak area/migration time). Results are presented in Table 1.

Table 1: Electrophoretic mobilities and hydrodynamic radii of the different species present in $\text{A}\beta_{1-42}$ samples

	$\text{A}\beta_{1-42}$ 100 μM in NH_4OH 0.1%				$\text{A}\beta_{1-42}$ 100 μM in Tris, pH 7.4			
CE experiments	$\mu_{\text{ep},1}$ ($\times 10^8 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	% _{species 1}	$\mu_{\text{ep},2}$ ($\times 10^8 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	% _{species 2}	$\mu_{\text{ep},1}$ ($\times 10^8 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	% _{species 1}	$\mu_{\text{ep},2}$ ($\times 10^8 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	% _{species 2}
	-0.98 ± 0.02	74 ± 4	-2.10 ± 0.05	26 ± 2	-0.94 ± 0.03	53 ± 4	-2.13 ± 0.07	47 ± 4
TDA experiments	$R_{\text{H},1}$ (nm)	% _{species 1}	$R_{\text{H},2}$ (nm)	% _{species 2}	$R_{\text{H},1}$ (nm)	% _{species 1}	$R_{\text{H},2}$ (nm)	% _{species 2}
	1.3	72 ± 7	6.6 ± 0.9	28 ± 3	1.3 ± 0.2	54 ± 6	4.2 ± 0.7	46 ± 6

In parallel, TDA experiments were performed using the same capillary and the same electrolyte as mobilization buffer. The taylorgrams were shown to be successfully fitted by a trimodal fitting, indicating the presence of three different species in the two samples (Fig.1b). The sharpest deconvoluted peak was attributed to NH_4OH since the diffusion coefficient experimentally determined ($(1.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-9} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) was similar to the one tabulated for NH_4OH at 20°C ($1.5 \cdot 10^{-9} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Both hydrodynamic radii and percentages of the other two species were calculated and compared in Table 1.

Based on these results, the presence of two different populations containing $\text{A}\beta_{1-42}$ was assumed: one fast migrating population ($\mu_{\text{ep}} \sim -2 \times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) with a large hydrodynamic radius, attributed to large oligomers, and one population migrating slower ($\mu_{\text{ep}} \sim -1 \times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) with a smaller hydrodynamic radius, attributed to monomers and small oligomers.

This assumption is reinforced by the data obtained by Deleanu *et al.*²⁹, who proposed possible conformations of $\text{A}\beta_{1-42}$ in relation with their size determined by TDA. They found a population of monomers and small oligomers, with a mean hydrodynamic radius around 1.9 nm, and a population of larger oligomers, with a mean radius around 5.1 nm. Moreover, several groups reported the μ_{ep} of $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomers and monomer at pH 7.4²¹⁻²³ and showed that oligomers present a mobility, which is twice the one of monomers.

3.2. Separation conditions preserving copper complexes

The separation of $\text{A}\beta_{1-42}$ species is well-described in literature²¹⁻²⁵ and was performed at $-20\text{kV} + 0.1$ psi on a neutral HPC capillary without further improvement. The repeatability of mobilities was determined by performing three CE separations of a partially aggregated peptide $\text{A}\beta_{1-42}$. Results indicated a relative standard deviation not exceeding 5% for mobilities allowing the use of this method for the monitoring of the different species over time.

However, the separation of the Cu(II) -complexes monitored by CE-ICP-MS in such analytical conditions is severely marred by the observation of strongly tailing peaks, due to the partial dissociation of the complexes during separation.

Optimization of separation conditions was carried out, to face the disequilibrium effects linked to the analysis of copper complexes. Indeed, kinetically fast metals like Cu(II) may form labile complexes, which are likely to dissociate during the separation.³⁰

As this dissociation may be increased by the application of voltage, experiments were carried out with different voltages. For that purpose, $\text{A}\beta_{1-16}$ was chosen as reference compound since it contains the same complexation site than $\text{A}\beta_{1-42}$ and is not subject to aggregation.

Figure 2 presents the results obtained for the CE-ICP-MS analysis of solutions containing $100 \mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{1-16}$ and either $10 \mu\text{M}$ or $50 \mu\text{M}$ Cu(II) . The electropherograms show distorted peaks, composed of a nearly Gaussian part corresponding to the $\text{A}\beta_{1-16}\text{-Cu(II)}$ complex, and a tailing part, corresponding to the copper dissociated from this complex (Fig. 2a). For the different voltages, Gaussian peak, tailing part and Cu(II) peak released by HNO_3 rinses areas were calculated (Fig. 2b).

These results show that an increase of voltage leads to an increase of the tailing part of the peak (Fig. 2c and 2d). Moreover, the washing step using HNO_3 1% reveals a small but increasing amount of Cu adsorbed on the HPC capillary. Applying a high voltage such as -20kV leads to the dissociation of $2/3$ of Cu(II) initially complexed, for both Cu(II) concentrations. By decreasing the voltage to -7 kV , more than 80% of the complex remains intact. However, these conditions dramatically affect the resolution and any additional decrease of the voltage would prohibit the separation of the $\text{A}\beta_{1-42}$ species.

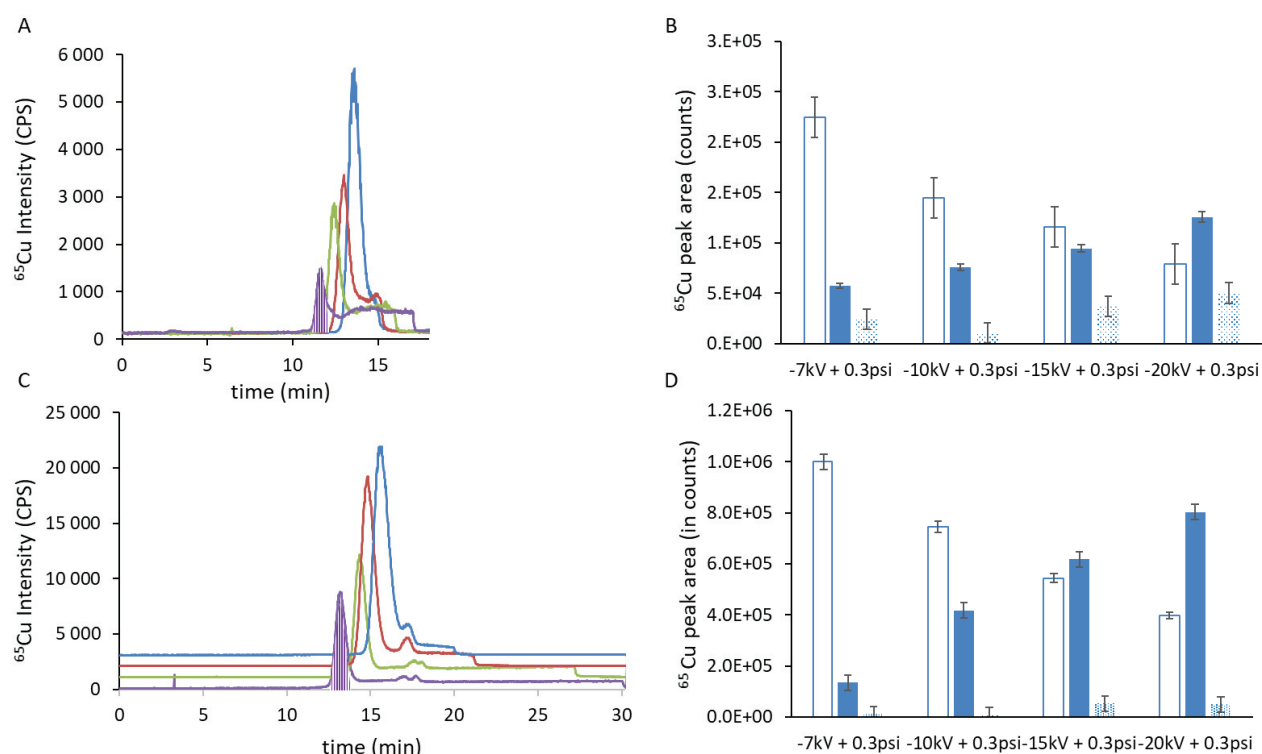


Figure 2: Influence of the voltage applied in CE on the $\text{A}\beta_{1-16} - \text{Cu(II)}$ dissociation

Electropherograms obtained in CE-ICP-MS for a $100 \mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{1-16}$ and $10 \mu\text{M}$ Cu(II) sample (a) and a $100 \mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{1-16}$ and $50 \mu\text{M}$ Cu(II) sample (c) at -20kV (in purple), -15kV (green), -10kV (red) and -7kV (blue).

Electropherograms are shifted in cps for sake of clarity.

Areas attributed to the gaussian peak (white bars), the tailing part (blue bars) and the Cu(II) released by the HNO_3 rinse at the end of the separation (dotted bars) for a $100 \mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{1-16}$ and $10 \mu\text{M}$ Cu(II) sample (b) and a $100 \mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{1-16}$ and $50 \mu\text{M}$ Cu(II) sample (d).

As a consequence, $-20\text{kV} + 0.1 \text{ psi}$ was maintained in association with the UV detection to separate $\text{A}\beta_{1-42}$ species with a good resolution and $-7\text{kV} + 0.3 \text{ psi}$ was applied when using the ICP-MS detection to perform the separation of Cu(II) complexes while limiting the dissociation.

As $A\beta_{1-42}$ undergoes self-aggregation over the time, repeatability on peak areas, linearity and limit of quantification cannot be evaluated using such a sample. Consequently, $A\beta_{1-16}$ was used instead of $A\beta_{1-42}$, to overcome variations due to speciation changes during aggregation (see supplementary information).

Although all the analytical figures of merit (Table 2) cannot be directly transposed to the analysis of $A\beta_{1-42}$, they may be representative of the method.

Table 2: Repeatability, linearity and limits of detection determined in both CE-UV and CE-ICP-MS using $A\beta_{1-16}$ and $A\beta_{1-42}$

	CE-UV	CE-ICP-MS
Migration times RSD ^a	3%	
Peak area RSD ^b	< 5 %	< 15 %
Linearity ^b	$r^2 = 0.9997$ (range : 5 - 100 μ M)	$r^2 = 0.991$ (range : 1.25 - 25 μ M)
Limit of quantification ^b	6.5 μ M $A\beta_{1-16}$	0.6 μ M Cu

^a measured using $A\beta_{1-42}$

^b measured using $A\beta_{1-16}$

3.3. Does copper accelerate the aggregation of the $A\beta_{1-42}$ peptide?

This CE-UV method was used in order to study the influence of the presence of Cu on the aggregation kinetics of the $A\beta_{1-42}$ peptide. For that purpose, kinetic monitoring was carried out, for several $A\beta_{1-42}$: copper initial ratios (1: 0, 1: 0.1 and 1: 0.5). Incubations of 100 μ M of $A\beta_{1-42}$ in the presence of different Cu(II) concentrations (10 and 50 μ M) were performed at room temperature. The solutions were analysed at different incubation times and compared with the results obtained for a 100 μ M of $A\beta_{1-42}$ solution in the absence of Cu. All the results are averages from two different kinetic experiments for each $A\beta_{1-42}$: Cu(II) ratio and are presented in Fig. 3.

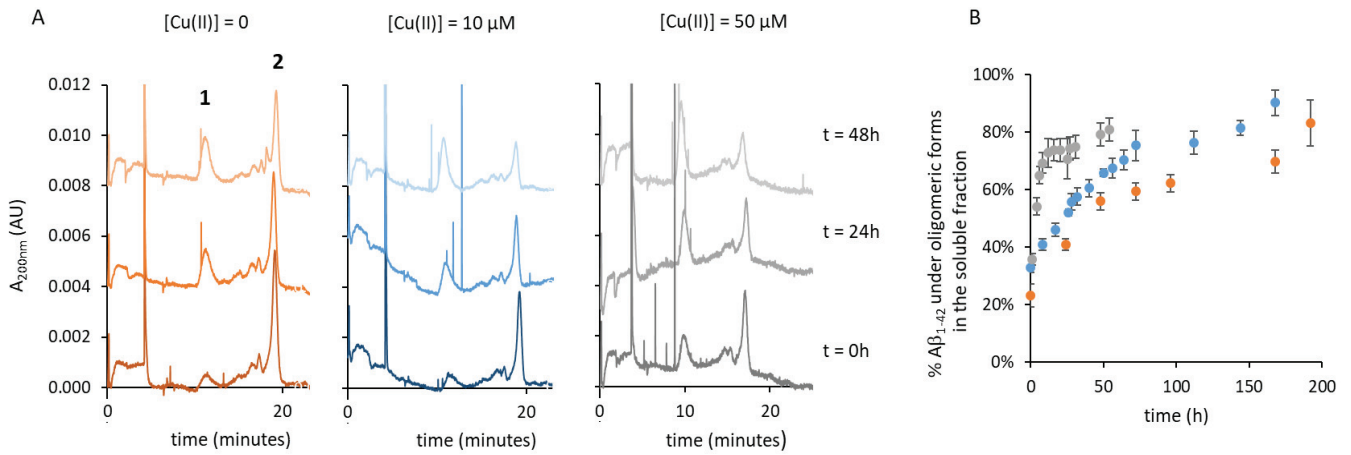


Figure 3: Monitoring in CE-UV of 100 μM of Aβ₁₋₄₂ aggregation over time in 10 mM Tris 15 mM NaCl (pH 7.4). (a) Electropherograms for different incubation times in the absence or the presence of either 10 or 50 μM of Cu(II). (b) Percentage of Aβ₁₋₄₂ involved in large oligomeric forms in the soluble fraction over incubation time in the absence (◆) or presence of 10 (■), and 50 μM (●) of Cu(II). Electropherograms are shifted in absorbance for sake of clarity.

All the electropherograms (Fig. 3a) exhibit two main peaks, with electrophoretic mobilities $-2 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ and $-1 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$. Previous affinity capillary electrophoresis studies performed in the presence of Cu(II) in the electrolyte have shown that Aβ and Aβ-Cu complexes exhibit only slight differences in electrophoretic mobilities (see supplementary information). Peaks 1 and 2 were therefore attributed to large oligomers and small oligomers/monomer respectively. Peak 1, observed in many studies in the absence of copper, was not observed by Pedersen *et al.* in the presence of this metal with Aβ₁₋₄₀.¹² Indeed, it was postulated that Aβ₁₋₄₀ displays a different aggregation pathway, which does not lead to the formation of transient soluble oligomers.²⁹

Fig. 3b shows the percentage of Aβ₁₋₄₂ involved in large oligomers in the soluble fraction. This was determined by calculating the ratio of large oligomeric forms area to the total area in UV, using corrected areas to correct the influence of the different velocities on the signal measurement and assuming $\epsilon_{\text{A}\beta \text{ in monomer}}$ to be equal to $\epsilon_{\text{A}\beta \text{ in oligomer species}}$ at 200 nm.

The distribution of Aβ₁₋₄₂ between the different soluble species was calculated as follows:

$$\% \text{A}\beta_{1-42, \text{ species } i} = \frac{\text{Corrected peak area}_{\text{species } i}}{\sum_{j=1}^n \text{Corrected peak area}_{\text{species } j}} \quad (4)$$

Such calculations allow to compensate for the absence of calibration curve (impossible to obtain for Aβ₁₋₄₂).

Surprisingly, no immediate precipitation of A β_{1-42} was observed whatever the copper concentration in the sample. This was verified by measuring both UV absorbance at 280 nm and copper concentration by ICP-MS at the beginning and the end of the experiment. Moreover, Σ corrected peak area was found to be constant over the time with a relative standard deviation of 10%. In our case, percentages can be directly converted into A β_{1-42} concentrations.

Data obtained at t=0 for the copper-free sample illustrate the strong ability of A β_{1-42} peptide to instantaneously self-aggregate upon dissolution in the buffer despite the presence of NH₄OH. This could be due to the high concentration of A β_{1-42} (100 μ M) used in this study, similar to concentrations usually used by others in *in vitro* kinetics studies. A β_{1-42} involved in large oligomerized forms was found to be about 20%. By comparing the initial repartition for each Cu(II): A β_{1-42} ratio, it could be noticed that the initial percentage of oligomerization increases in the presence of Cu(II) in the sample, to reach up to 35% for both initial ratios. This instantaneous aggregation observed in the presence of Cu(II) was already observed in studies on A β_{1-40} .^{9,12}

The examination of the oligomerization kinetics curves (Fig. 3b) shows a similar profile with a propensity of the peptide to aggregate either with or without Cu(II). Whatever the Cu(II) concentration is, the percentage of peptide involved in oligomeric forms increases almost linearly with the incubation time to reach a plateau.

Therefore, the slope of the linear part reflects the apparent oligomerization velocity (in %·h⁻¹). Results are summarized in Table 3. The apparent velocities either in the absence of copper or for 10 μ M Cu(II) were similar, which does not reflect any significant influence of Cu for such a sub-stoichiometric ratio. However, in the presence of 50 μ M Cu (II) in the sample, velocity was found ca. 10 times higher, indicating an increase in the kinetic of aggregation. The percentage at the plateau does not seem to depend on Cu(II) concentration and discrepancies observed with and without Cu seem to be due to the differences observed à t=0.

Table 3: Influence of amyloid- β : Cu(II) stoichiometry on the apparent aggregation velocity

Amyloid- β : Cu(II) initial ratio	$v_{\max, \text{app}}$ (%·s ⁻¹)	% monomers involved in oligomeric forms at the plateau
1: 0	1.9×10^{-6}	65
1: 0.1	2.0×10^{-6}	77
1: 0.5	1.4×10^{-5}	74

3.4. How is copper distributed among the different oligomeric forms?

Monitoring of the distribution of Cu among the different forms of the peptide was performed by CE-ICP-MS analyses of 100 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ samples containing either 10 or 50 μM $\text{Cu}(\text{II})$. Experiments were performed in duplicates and results are presented in Fig. 4.

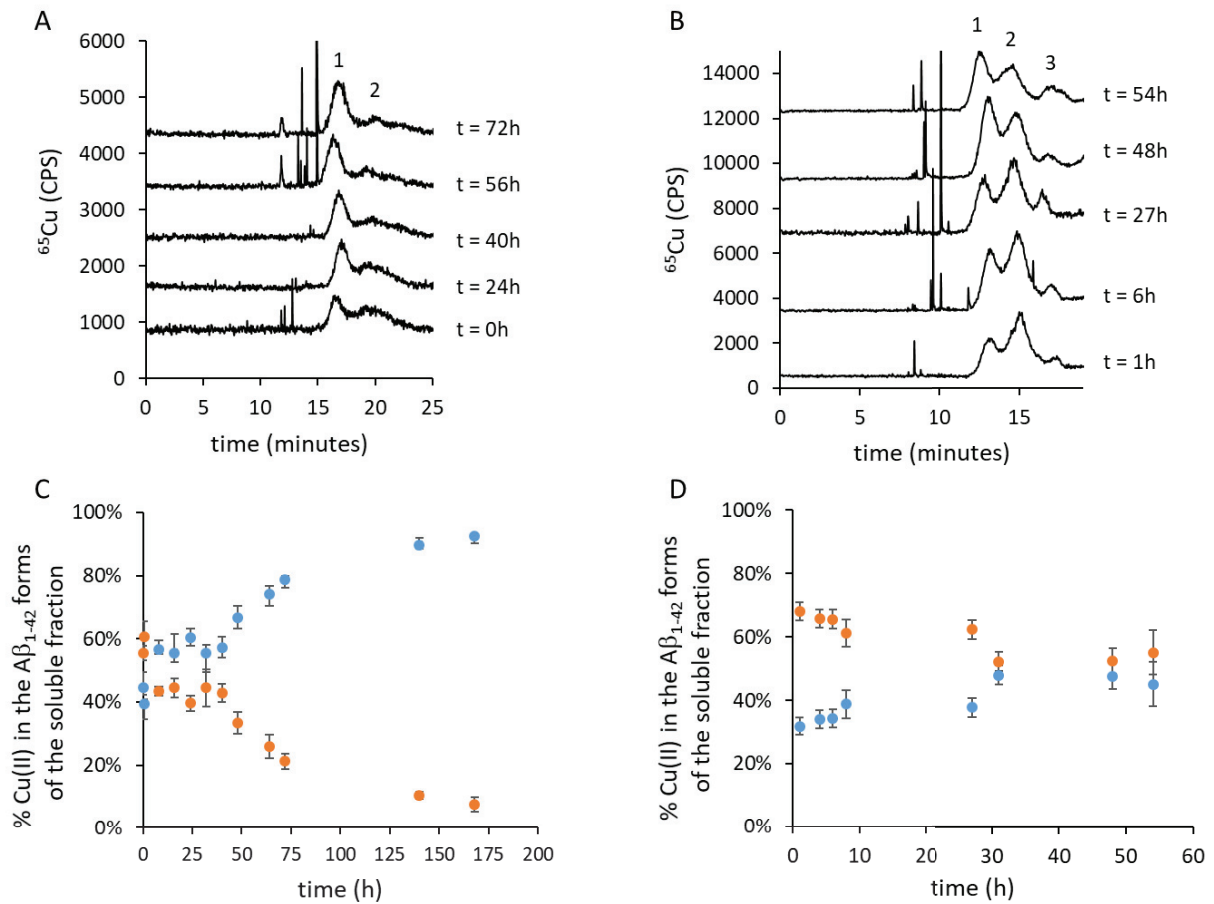


Figure 4: Repartition of copper between the different oligomerization forms of 100 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ over time followed by CE-ICP-MS in the presence of 10 μM (a, c) or 50 μM (b, d) of $\text{Cu}(\text{II})$.

(a, b) Electropherograms (shifted in ^{65}Cu signal intensity for sake of clarity, background signal is around 800 cps for all the electropherograms)

Peak 1 represents copper present in the large oligomeric forms, peak 2 represents both small oligomers and monomer $\text{A}\beta / \text{Cu}(\text{II})$ complexes, and peak 3 is likely to be the $\text{Cu}(\text{II})$ released from the monomer. (c, d) Percentages of soluble copper in small (●) and large (●) oligomeric forms of $\text{A}\beta_{1-42}$ peptide over time in the presence of 10 or 50 μM of $\text{Cu}(\text{II})$. Experimental conditions: HPC coated - capillary (75 μm i.d. x 64 cm), Buffer: 10 mM Tris, 15 mM NaCl at pH 7.4, -7 kV with an assisted pressure of 0.3 psi, 25°C. Detection: ICP-MS at $m/z = 65$ at the end of the capillary.

For both samples (Fig. 4a and b), electropherograms show the presence of two negative copper complexes (peaks 1 and 2). The negative mobilities, calculated using TBP as a neutral marker ($m/z = 31$), are in agreement with the formation of negatively charged $A\beta$ -Cu complexes. As a consequence of the combination of the application of low voltage and high pressure, the resolution was strongly affected. This peak overlapping hinders any accurate quantitative measurements but the separation remained sufficient to be able to distinguish both monomeric and oligomeric states of $A\beta_{1-42}$. Moreover, a significant peak broadening was observed for the so called-monomeric species, compared to the results obtained in UV (Fig. 3a), and might suggest the co-migration of both the monomer and the smallest oligomers, already observed in UV. In the presence of 50 μM of Cu(II) (Fig. 4b), an additional unknown peak was revealed, which might result from the presence of ammonium hydroxide in the solution, since a copper species with similar mobility was also observed in blank samples. Calculation of copper percentages were performed as previously for the different peaks in the soluble fraction:

$$\%Cu_{, \text{species } i} = \frac{\text{Corrected peak area}_{\text{species } i}}{\sum_{j=1}^n \text{Corrected peak area}_{\text{species } j}} \quad (5)$$

The absence of copper precipitation was checked by copper ICP-MS analyses at the beginning and at the end of each experiment.

Figure 4 shows a decrease of the “monomer and small oligomers” fraction for both stoichiometries as the aggregation progresses (Fig. 4c and 4d). In the 1: 0.1 $A\beta$: Cu sample, an increase over time of the percentage of Cu present in the larger oligomers fraction was observed, until nearly all the soluble copper was incorporated in this fraction (Fig. 4c). This increase is closely correlated to the increase of the $A\beta_{1-42}$ peptide involved in the larger oligomers forms (Fig. 3b). Such a trend might indicate a similar complexation of Cu in the different forms. Mold *et al.* assumed that it could reveal a kinetically favoured aggregation, to the detriment of complexation. As a result, this could explain the similarity of the conversion of monomer into larger oligomers in the absence and in the presence of 10 μM Cu.³¹ Increasing Cu(II) concentration to 50 μM led to a quite different behaviour. Cu involved in the larger oligomers fraction slightly increased, until a plateau representing 40-45% of the soluble copper (Fig. 4d). Comparison of this distribution with the one of $A\beta_{1-42}$ peptide in the soluble forms (Fig. 3b) suggests clearly that Cu is mainly present in the “monomer and small oligomers” fraction. Based on the researches so far, the aggregation process could be enhanced via the formation of an intermolecular copper complex.

4. Conclusion

CE-ICP-MS was used to monitor for the first time the distribution of Cu between soluble species of A β ₁₋₄₂ and confirmed that Cu exhibits an affinity for both monomeric and oligomeric A β ₁₋₄₂ species and lead to the formation of anionic species. The investigation of A β ₁₋₄₂ oligomerization over time showed that Cu influences the rate of oligomerization and tends to distribute in both small and large oligomers. A clear difference in copper distribution was observed depending on the Cu(II) concentration used, which seems to be in agreement with the formation of intramolecular at low Cu(II) concentrations and intermolecular complexes for higher concentrations. Although the A β ₁₋₄₂ concentrations used may not be representative of *in vivo* conditions and could favour self-aggregation, we showed that this method can provide valuable information in A β / copper complexation studies.

Moreover, such a study was impaired by the poor resolution of the separation, resulting from mild separation conditions optimized to avoid complexes dissociation. Since, a total separation of the species was not possible, an accurate quantitation of copper in the different species is precluded. Non-separative methods, such as Taylor dispersion analysis, allowing the discrimination of species according to their diffusion coefficient, could also be envisaged. The ability of TDA to be coupled with ICP-MS should provide useful information concerning the size of the copper species formed during the *in vitro* aggregation process. It is also of importance to be able to separate monomer from small oligomers and further investigations are still ongoing to achieve this goal.

Acknowledgements

This work was supported by the Doctoral School of Chemistry, University of Lyon, France (grant to CD). The authors have declared no conflict of interest.

References

- 1 J. A. Hardy and G. A. Higgins, *Science*, 1992, 256, 184–185.
- 2 P. Cizas, R. Budvytyte, R. Morkuniene, R. Moldovan, M. Broccio, M. Lösche, G. Niaura, G. Valincius and V. Borutaite, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2010, 496, 84–92.
- 3 M. A. Lovell, J. D. Robertson, W. J. Teesdale, J. L. Campbell and W. R. Markesbery, *J. Neurol. Sci.*, 1998, 158, 47–52.
- 4 L. M. Miller, Q. Wang, T. P. Telivala, R. J. Smith, A. Lanzirotti and J. Miklossy, *J. Struct. Biol.*, 2006, 155, 30–37.
- 5 S. A. James, Q. I. Churches, M. D. de Jonge, I. E. Birchall, V. Streltsov, G. McColl, P. A. Adlard and D. J. Hare, *ACS Chem Neurosci*, 2017, 8, 629–637.
- 6 J. Xu, S. J. Church, S. Patassini, P. Begley, H. J. Waldvogel, M. A. Curtis, R. L. M. Faull, R. D. Unwin and G. J. S. Cooper, *Metallomics*, 2017, 9, 1106–1119.
- 7 M. Rana and A. K. Sharma, *Metallomics*, 2019, 11, 64–84.
- 8 C. J. Sarell, S. R. Wilkinson and J. H. Viles, *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 41533–41540.
- 9 C. S. Atwood, R. D. Moir, X. Huang, R. C. Scarpa, N. M. E. Bacarra, D. M. Romano, M. A. Hartshorn, R. E. Tanzi and A. I. Bush, 1998, 273, 12817–12826.
- 10 E. House, M. Mold, J. Collingwood, A. Baldwin, S. Goodwin and C. Exley, *J. Alzheimers Dis.*, 2009, 18, 811–817.
- 11 J. Zou, K. Kajita and N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 2274–2277.
- 12 J. T. Pedersen, J. Østergaard, N. Rozlosnik, B. Gammelgaard and N. H. H. Heegaard, *J. Biol. Chem.*, 2011, 286, 26952–26963.
- 13 J. H. Viles, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, 256, 2271–2284.
- 14 D. P. Smith, G. D. Ciccotosto, D. J. Tew, M. T. Fodero-Tavoletti, T. Johanssen, C. L. Masters, K. J. Barnham and R. Cappai, *Biochemistry*, 2007, 46, 2881–2891.
- 15 C. J. Matheou, N. D. Younan and J. H. Viles, *Biochem. J.*, 2015, 466, 233–242.
- 16 E. Sitkiewicz, M. Kłoniecki, J. Poznański, W. Bal and M. Dadlez, *J. Mol. Biol.*, 2014, 426, 2871–2885.
- 17 B. Michalke, M. Lucio, A. Berthele, B. Kanawati, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, 405, 2301–2309.
- 18 S. S. Aleksenko, M. Matczuk, X. Lu, L. S. Foteeva, K. Pawlak, A. R. Timerbaev, M. Jarosz, *Metallomics*, 2013, 5, 955–963
- 19 T.-N. S. Huynh, C. Vidaud, A. Hagège, *Metallomics*, 2016, 8, 1185–1192.
- 20 K. Poléc, M. Perez-Calvo, O. Garcia-Arribas, J. Szpunar, B. Ribas-Ozonas, R. Lobinski, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, 88, 197–206
- 21 S. Sabella, M. Quaglia, C. Lanni, M. Racchi, S. Govoni, G. Caccialanza, A. Calligaro, V. Bellotti and E. D. Lorenzi, *Electrophoresis*, 2004, 25, 3186–3194.
- 22 R. Colombo, A. Carotti, M. Catto, M. Racchi, C. Lanni, L. Verga, G. Caccialanza and E. De Lorenzi, *Electrophoresis*, 2009, 30, 1418–1429.
- 23 R. A. Picou, I. Kheterpal, A. D. Wellman, M. Minnamreddy, G. Ku and S. D. Gilman, *J. Chromatogr. B*, 2011, 879, 627–632.
- 24 D. Brinet, J. Kaffy, F. Oukacine, S. Glumm, S. Ongeru and M. Taverna, *Electrophoresis*, 2014, 35, 3302–3309.
- 25 F. Bisceglia, A. Natalello, M. M. Serafini, R. Colombo, L. Verga, C. Lanni and E. De Lorenzi, *Talanta*, 2018, 188, 17–26.
- 26 Y. Shen, S. J. Berger, G. A. Anderson and R. D. Smith, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 2154–2159.
- 27 J. Chamoun and A. Hagège, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, 20, 1030–1034.
- 28 S. Sauge-Merle, D. Lemaire, R. W. Evans, C. Berthomieu, J. Aupiais, *Dalton Trans.*, 2017, 46, 1389–1396.
- 29 M. Deleanu, J.-F. Hernandez, L. Cipelletti, J.-P. Biron, E. Rossi, M. Taverna, H. Cottet and J. Chamieh, *Anal. Chem.*, 2021, 93, 6523–6533.
- 30 J. E. Sonke and V. J. M. Salters, *The Analyst*, 2004, 129, 731.
- 31 M. Mold, L. Ouro-Gnao, B. M. Wieckowski and C. Exley, *Sci. Rep.*, 2013, 3, 1–6.

Supplementary Information

1. Verification of the CE-ICP-MS hyphenation

To ensure that the hyphenation does not introduce any significant external dispersion, a fetuin/uranium complex was used. This sample (fetuin 10 μM , U(VI) 1 μM) was assumed to be stable all along the capillary (T.N.S. Huynh, D. Bourgeois, C. Basset, C. Vidaud, A. Hagège *Electrophoresis*, 2015, **36**,1374-1382).

With such experimental design, this compound can be detected by both UV (before the interface) and ICP-MS (after the interface) detectors in a single experiment. Figure S1 shows the results obtained with both UV and ICP-MS detections.

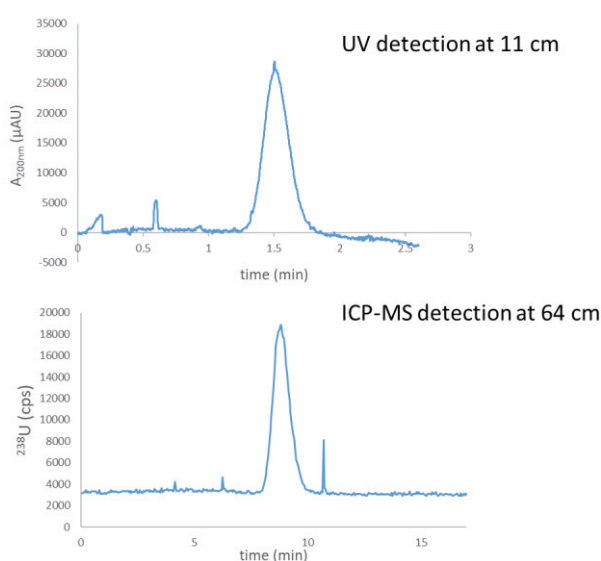


Figure S1: Electropherograms of the fetuin/uranium complex, with both UV and ICP-MS detection. Experimental conditions: injection 0.5 psi; HPC capillary 75 μm i.d. x 64 cm length; buffer Tris 10 mM NaCl 15 mM pH 7.4; -25 kV + 0.3 psi; ICP-MS detection $m/z = 238$; UV detection window at 11 cm, wavelength 200 nm

2. Determination of A β ₁₋₄₂ copper complexes mobilities using ACE

2.1. Method

Affinity capillary electrophoresis (ACE) experiments were carried out on a Beckman P/ACE MDQ instrument. A HPC thermally coated capillary (I.D of 75 μ m, O.D of 375 μ m, 64 cm total length) was used with 10 mM Tris buffer 15 mM NaCl at pH 7.4 background electrolyte (BGE), containing various concentrations of Cu²⁺. Before the first use, the capillary was flushed with water for 5 min under 10 psi and before each run with BGE for 5 min under 10 psi. 50 μ M of A β ₁₋₄₂ and acetone flow marker were introduced successively by hydrodynamic injection under 0.5 psi for 5 sec into the capillary. Separations were performed at 25°C at -20 kV with an assisted pressure of 0.1 psi. Detection was performed by UV detection at 200 nm at 10 cm from the inlet. Data were collected using the 32 Karat Software.

2.2. Results and discussion

In order to determine the electrophoretic mobilities of the different A β ₁₋₄₂ complexes with copper, the migration time was monitored as a function of the total CuCl₂ concentration introduced in the electrolyte, until a large excess of copper was added with respect to the ligand.

The mobility variations with increased copper concentrations in the BGE are presented in figure S2.

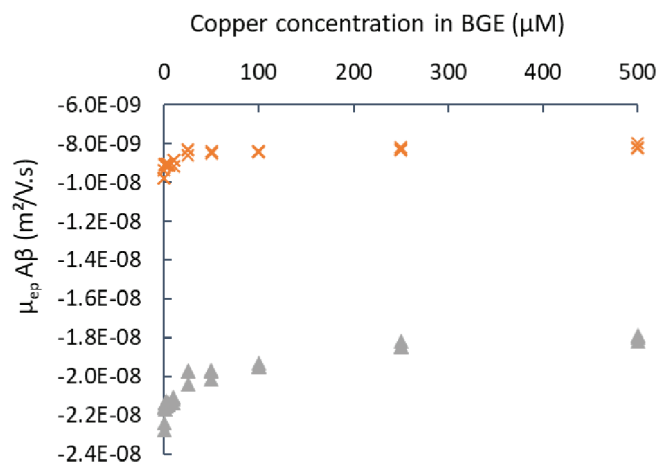


Fig. S.2: Binding isotherms of monomer and oligomer forms with copper

Conditions: HPC coated - capillary (75 μ m i.d. x 64 cm), Buffer: 10 mM Tris, 15 mM NaCl at pH 7.4 with varying concentrations of CuCl₂, -20 kV with an assisted pressure of 0.1 psi, 25°C. Detection: UV at 200nm (detection length = 10 cm).

A single peak was observed for each species whatever the copper content, indicating a fast copper/ligand exchange kinetics and suggesting the formation of labile complexes. Complex formation leads to a systematic decrease of the mobility (in absolute values). In the case of the monomeric form, the initial value equal to $-1.0 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, represents the mobility of the free monomer. This mobility decreases rapidly with the addition of copper in the BGE to reach a plateau at $-8.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, attributed to the mobility of monomer $\text{A}\beta/\text{Cu(II)}$ complex. The same trend was observed for the oligomers with mobilities ranging from $-2.3 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (free ligand) to $-1.8 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (complexed form).

It is important to note that (i) monomeric and oligomeric species have very different electrophoretic mobilities, (ii) variations of the electrophoretic mobilities induced by Cu(II) complexation are small. This allow us to relate without ambiguity a ligand to its Cu(II) complex. Therefore, the assignment of the peaks observed in ICP-MS to either monomer or oligomers can be performed on the basis of the these mobilities.

3. Analysis of copper contamination by ICP/MS

In order to assess the copper contamination in the chemicals, solutions of buffers, salts and copper ligands were prepared in water. Before use, labware was soaked with HNO_3 1% for 15 min cycles and wash waters were collected after each washing step.

Samples were injected via a peristaltic pump equipped with Tygon tubing at $400 \mu\text{L}/\text{min}$ flow rate and introduced into the ICP-MS detector by means of a micro-concentric nebulizer. Measurements were performed at $m/z = 65$.

Results are recapitulated in Table S1.

Table S.1: Copper contamination in labware and chemical products by ICP-MS

Reference value	⁶⁵ Cu signal in HNO ₃ 1% (CPS)*	Concentration
Copper standard 5ppb in HNO ₃ 1%	140 000	5 ppb
Labware	⁶⁵ Cu signals in HNO ₃ 1% (CPS)*	Estimated concentration
CE vials (1500 µL) before washing	100 000	3.6 ppb
CE vials after 3 washing steps with 1% HNO ₃	800	< 30 ppt
Glass bottle (1L) before washing	45 000	1.6 ppb
Glass bottle after 3 washing steps with 1% HNO ₃	800	< 30 ppt
Plastic tubes (15 mL) before washing	75 000	2.7 ppb
Plastic tubes after 3 washing steps with 1% HNO ₃	800	< 30 ppt
Chemical products	⁶⁵ Cu signals (CPS)*	Estimated concentration
Water	600	< 30 ppt
HNO ₃ 1%	800	< 30 ppt
NaCl 15 mM	750	< 30 ppt
Tris 10 mM	650	< 30 ppt
Mops 10 mM	25 000	0.9 ppb
Hepes 10 mM	650	< 30 ppt
EDTA / NTA / IDA 2,5 mM	850 / 700 / 750	< 30 ppt

* RSD ≤ 8% for 2 minutes measurements in time resolved analysis.

4. Analytical figures of merit

4.1. Repetability of migration times using $A\beta_{1-42}$ samples

In order to evaluate repetability in CE-UV, $A\beta_{1-42}$ 100 μ M in background electrolyte (Tris 10 mM NaCl 15 mM) was analyzed in CE-UV at -20 kV + 0.1 psi, using a HPC capillary. Results are presented in Table S2.

Table S2: Migration times for the two $A\beta_{1-42}$ containing peaks obtained in both CE-UV and CE-ICP-MS. Conditions: HPC coated - capillary (75 μ m i.d. x 64 cm), Buffer: 10 mM Tris, 15 mM NaCl at pH 7.4, -20 kV with an assisted pressure of 0.1 psi, 25°C. Detection: UV at 200 nm at 54 cm. -7 kV with an assisted pressure of 0.3 psi, 25°C. Detection: ICP-MS at $m/z=65$ at 64 cm.

Injection number	CE-UV				CE-ICP-MS	
	Peak 1		Peak 2		Peak 1	Peak 2
	Migration time (min)	μ ep ($\times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Migration time (min)	μ ep ($\times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Migration time (min)	Migration time (min)
1	10.68	-2.11	19.10	-0.92	16.5	18.9
2	11.08	-2.01	19.10	-0.92	17.1	19.6
3	10.58	-2.13	18.26	-0.98	16.8	19.3
Average	10.8 \pm 0.3	-2.08 \pm 0.06	18.8 \pm 0.5	-0.94 \pm 0.04	16.8 \pm 0.3	19.3 \pm 0.4

4.2. Repetability in peak areas using $A\beta_{1-16}$ samples

Repetability was evaluated from 3 injections of solutions containing 100 μ M $A\beta_{1-16}$ and 10 μ M Cu(II) with both CE-UV and CE-ICP-MS

Table S3: Migration times, mobilities, and peak areas for $A\beta_{1-16}$ obtained in CE-UV and CE-ICP-MS. Conditions: HPC coated - capillary (75 μ m i.d. x 64 cm), Buffer: 10 mM Tris, 15 mM NaCl at pH 7.4, -20 kV with an assisted pressure of 0.1 psi, 25°C. Detection: UV at 200 nm, -7 kV with an assisted pressure of 0.3 psi, 25°C. Detection: ICP-MS at $m/z=65$.

Injection number	CE-UV		CE-ICP-MS	
	Migration time (min)	Corrected area (arbitrary units)	Migration time (min)	Area (counts)
Average	18.3 \pm 0.2	5700 \pm 200	13.7 \pm 0.8	(23 \pm 1). 10 ⁴

4.3. Linearity

In order to assess the linearity and calculate the detection limit, experiments were carried out using $A\beta_{1-16}$ as this peptide is stable over the time.

Using UV detection, different standards containing $A\beta_{1-16}$ were used in the 3 μM – 100 μM concentration range. For ICP-MS detection, a series of $A\beta_{1-16}$ – Cu(II) solutions was prepared in the separation electrolyte, for different $A\beta_{1-16}$ concentrations and for different $A\beta_{1-16}$: Cu(II) ratios.

These solutions were then injected (0.5 psi, 5s) and analyzed with either UV or CE-ICP-MS under the optimal conditions determined. Calibration curves are shown in Fig. S2 and S3 for $A\beta_{1-16}$ and Cu(II) complexed with $A\beta_{1-16}$ respectively.

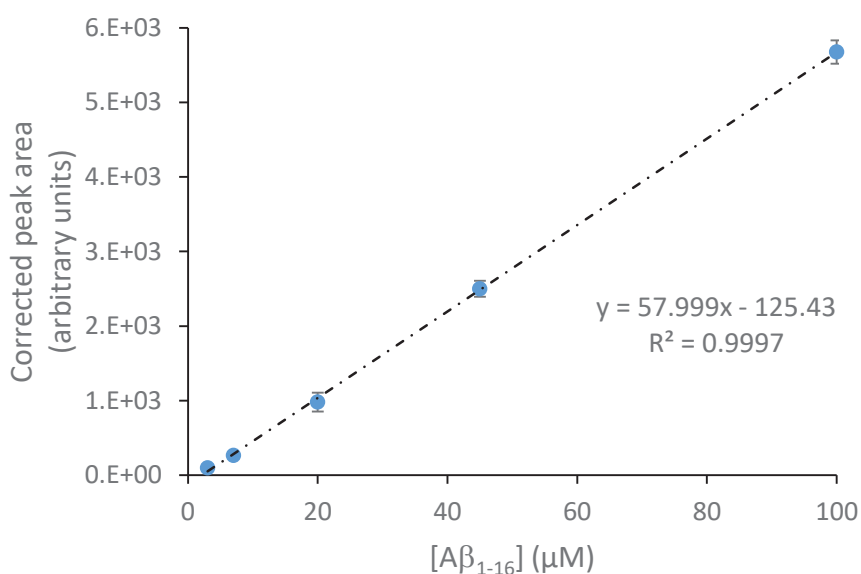


Figure S3: Calibration curve realized from different $A\beta_{1-16}$ solutions by CE-UV
 Conditions: HPC coated - capillary (75 μm i.d. x 64 cm), Buffer: 10 mM Tris, 15 mM NaCl at pH 7.4, -20 kV with an assisted pressure of 0.1 psi, 25°C. Detection: UV at 200 nm.

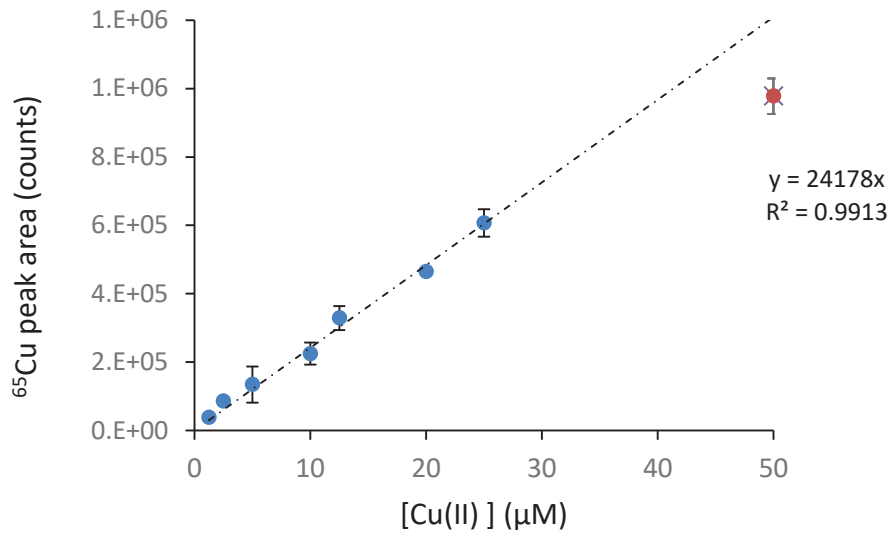


Figure S4: Calibration curve realized from different $A\beta_{1-16}$ – Cu(II) solutions by CE-ICP-MS
 Conditions: HPC coated - capillary (75 μm i.d. x 64 cm), Buffer: 10 mM Tris, 15 mM NaCl at pH 7.4, -7 kV with an assisted pressure of 0.3 psi, 25°C. Detection: ICP-MS at $m/z = 65$.

Linear relationships with good correlation were obtained $r^2 = 0.9996$ in CE-UV and $r^2 = 0.991$ in CE-ICP-MS.

4.4. Limits of quantification

Limits of quantification (LOQ) were calculated from peak heights according to the following equation:

$$\text{LOQ} = \mu_{\text{noise}} + k\sigma_{\text{noise}}, \text{ using } k = 5$$

In our conditions, limits of quantification of 6.5 μM for $A\beta_{1-16}$ and 0.6 μM for Cu(II) can be calculated. It should be noticed that these LOQ will be obviously higher for $A\beta_{1-42}$ species, as peaks are significantly broader.

3. Conclusion du chapitre

Les électrophérogrammes obtenus en CE-UV pour la séparation d'Aβ₁₋₄₂ ont montré la présence de deux populations principales dont l'identification a été réalisée par TDA-UV :

- une population comprenant le monomère et les petits oligomères, avec $\mu_{ep} \sim -1 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, et $R_h \sim 1 \text{ nm}$,
- une population caractéristique des gros oligomères, avec $\mu_{ep} \sim -2 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ et $R_h \sim 5 \text{ nm}$.

La CE-UV et la TDA-UV apparaissent donc des méthodes adaptées pour caractériser l'état d'agrégation initial du peptide, information essentielle pour fournir des analyses reproductibles étant donné que l'agrégation d'Aβ₁₋₄₂ dépend de la présence initiale ou non de formes agrégées. La spectrométrie de masse avec ionisation par électrospray aurait également pu être utilisée pour confirmer l'attribution des différentes formes grâce à l'identification des masses moléculaires.

L'étape de mise en solution du peptide a mis en lumière un problème important lié à la capacité d'auto-agrégation d'Aβ₁₋₄₂ : la variabilité de son état d'agrégation initial. La comparaison de trois lots a montré que le taux d'oligomérisation initial du peptide dépendait du lot utilisé. Bien que la solubilisation dans l'ammoniaque se soit montrée efficace pour limiter l'agrégation, certains lots se sont avérés être déjà oligomérisés avant la mise en solution. L'action de solvant tel que le HFIP ou le recours à l'UF ont été testés pour obtenir un peptide uniquement sous forme monomérique, mais n'ont pas donné de résultats concluants.

La deuxième partie de ce chapitre a été consacrée à l'étude de l'influence des métaux (Cu(II) et Zn(II)) sur l'agrégation d'Aβ₁₋₄₂. D'une part, la méthode CE-UV développée a été utilisée pour suivre la cinétique d'agrégation d'Aβ₁₋₄₂ en présence ou non de Cu(II) ou de Zn(II). Dans des proportions M : L de 1 : 1, la présence de ces métaux s'est avérée accélérer significativement la cinétique d'agrégation par rapport à celle obtenue sans métal, avec un effet plus prononcé pour le zinc. L'influence de la concentration en cuivre a également été étudiée pour des rapports sous-stœchiométriques en cuivre par rapport au peptide et a montré que plus la concentration en Cu(II) était élevée, plus la cinétique était rapide. D'autre part, le couplage CE-ICP-MS a été mis à contribution pour étudier la répartition du cuivre dans les différentes formes agrégées du peptide et ce, pour deux sous-stœchiométries en cuivre. Bien que la résolution de la séparation des différentes formes soit largement impactée par les conditions choisies pour limiter la dissociation des complexes, les résultats ont montré une répartition du cuivre dépendante de sa concentration. Les données suggèrent la formation de complexes intramoléculaires à faible concentration en Cu(II) et de complexes intermoléculaires pour des concentrations plus élevées.



Conclusion générale et perspectives

Le rôle du cuivre dans la maladie d'Alzheimer semble aujourd'hui de plus en plus probable, notamment de par sa capacité à se lier directement au peptide A β et à moduler l'agrégation de ce dernier. L'élucidation de la relation entre le peptide A β et Cu(II) est donc cruciale pour comprendre son rôle dans le développement de la maladie. Bien qu'il soit maintenant clair que les ligands His6, His13, His14, Asp1 et Ala2 du peptide A β se lient au Cu(II), rien n'indique que ce sont les seuls, particulièrement dans les formes agrégées de ce peptide, et aucune quantification absolue n'a pu être réalisée jusqu'à présent.

L'objectif de cette thèse était donc de concevoir un outil analytique capable de contribuer à l'obtention de données quantitatives dans ce domaine. Ceci impliquait de prendre en compte la nature dynamique du processus d'agrégation et donc le travail sur des échantillons complexes. Dans ce manuscrit, nous avons donc choisi de développer un couplage entre l'électrophorèse capillaire et l'ICP-MS et d'évaluer le potentiel.

L'un des enjeux principaux de ce travail a consisté à développer une méthode analytique permettant la quantification du cuivre présent dans les différentes espèces contenant le peptide A β . Une des premières difficultés a consisté à s'affranchir des contaminations qui entachent l'analyse quantitative du cuivre à l'état de traces : contamination provenant des réactifs, des surfaces des flacons et des tubes mais aussi contamination croisée d'un échantillon à l'autre, conduisant à des erreurs aléatoires. Une procédure drastique de lavage des contenants et de l'appareillage a donc été mise en place et nous avons montré que celle-ci permet d'atteindre des seuils de contamination n'excédant pas quelques dizaines de ppt.

D'autre part, les complexes de ce métal étant en général labiles, l'analyse pose le problème de leur dissociation par sorption sur les surfaces, que ce soit celle des capillaires ou celles de l'ICP-MS. Ainsi, la surface des capillaires de silice a été modifiée soit par un revêtement neutre de HPC immobilisé thermique, soit par un revêtement dynamique avec le polybrène cationique. Nous avons également montré que l'ajout d'un complexant fort, tel que l'EDTA, juste avant l'introduction dans l'ICP-MS, permet de s'affranchir de ces phénomènes de dissociation dus à la sorption.

L'étude de complexes labiles en science séparative est également affectée par le phénomène de dissociation induit par la rupture de l'état d'équilibre pendant la séparation. Une étude de l'influence du voltage sur les taux de recouvrement du cuivre pour des complexes de nature différente, différents électrolytes et différents revêtements de capillaire a été réalisée. Cette étude a montré que la

dissociation induite par le voltage dépend non seulement de l'affinité des ligands pour le cuivre mais aussi de la différence entre leur mobilité électrophorétique et de celle de leur complexe avec le cuivre. Les conditions électrophorétiques les plus adaptées pour limiter ce phénomène ont été déterminées. Bien que ces conditions affectent la résolution, elles sont nécessaires pour garantir le maintien de l'intégrité du complexe tout au long de l'analyse. Cette étude a permis de développer une méthode pour l'analyse du complexe A β -Cu(II) et cette méthodologie de développement peut être étendue à d'autres complexes labiles.

Dans la suite de ce projet, l'affinité de Cu(II) et de Zn (II) pour le peptide A β_{1-16} a été étudiée. Dans ce domaine, l'électrophorèse capillaire d'affinité est une méthode de choix, notamment grâce à sa facilité d'utilisation. Cette méthode permet de mesurer des constantes d'affinité s'il existe une différence de mobilités assez importante entre le ligand et son complexe. Elle nous a permis de déterminer la constante d'affinité du complexe A β_{1-16} -Zn(II) : $\log K_{A\beta_{1-16}\text{-Zn(II)}} = 5,0 \pm 0,2$, en faisant l'hypothèse d'un complexe 1 : 1. Cette constante est en accord avec les constantes reportées dans la bibliographie ($\log K_{A\beta_{1-16}\text{-Zn(II)}} = 3,5-6$). Cependant, elle ne permet pas l'étude de l'interaction entre le peptide A β_{1-16} et Cu(II). Le couplage CE-ICP-MS a donc été utilisé dans ce cas. Des études compétitives, avec l'acide nitrilotriacétique comme compétiteur, dont la constante de complexation avec Cu(II) est connue, ont été réalisées afin de déterminer cette constante et ont permis de mettre en évidence l'existence d'un complexe A β_{1-16} -Cu(II) à pH 7,4, avec $\log K_{A\beta_{1-16}\text{-Cu(II)}} = 9,9 \pm 0,2$. Cette constante est en accord avec la majorité des études publiées et contribue à l'établissement d'un consensus autour de cette valeur. Nous avons montré que cette constante ne varie pas de manière significative en présence de fortes concentrations en NaCl (100 mM) ou en NaHCO₃ (30 mM), ce qui confirme que la formation du complexe A β -Cu(II) semble pertinente *in vivo*.

Dans la dernière partie de ce manuscrit, l'influence des ions Cu(II) sur l'agrégation du peptide A β_{1-42} et sa répartition dans les différentes formes ont été étudiées. Une des principales difficultés de cette étude réside dans le contrôle de l'état d'agrégation initial du peptide A β_{1-42} , d'autant plus que celui-ci dépend du lot utilisé. Les différentes options envisagées pour désagréger le peptide (traitement à l'hexafluoroisopropanol) ou isoler la fraction monomérique (filtration sur membrane) se sont avérées inefficaces. L'ensemble des études portant sur le peptide A β_{1-42} a donc été réalisé sur un lot unique.

Dans ce contexte, la CE-UV et la CE-ICP-MS ont été utilisées conjointement pour l'étude de l'agrégation du peptide A β_{1-42} . La complémentarité de ces deux détections a été mise à profit pour déterminer à la fois la répartition du peptide A β_{1-42} et celle du cuivre entre deux populations principales : monomère / petits oligomères et plus gros oligomères (**figure C-1**).

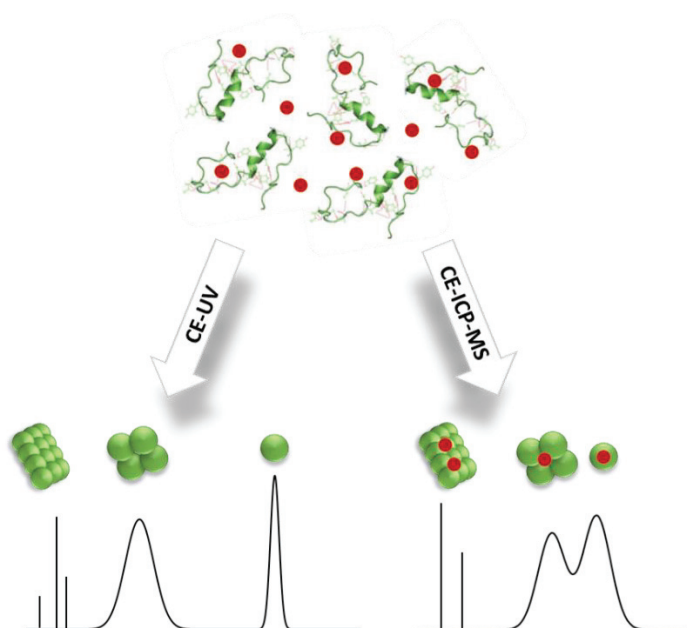


Figure C-1 - Schéma illustrant la complémentarité de la CE avec détection UV ou couplée à l'ICP-MS pour étudier la répartition du cuivre dans les formes d'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$.

En ce qui concerne la cinétique d'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$, nous avons confirmé que celle-ci est significativement accélérée en présence de Cu(II) et de Zn(II). L'influence de la concentration en Cu(II) a également été étudiée et nous avons montré que la cinétique d'agrégation est d'autant plus rapide que la concentration en cuivre est élevée. L'analyse de la répartition de Cu(II) a montré sa distribution dans les différentes formes au cours de l'agrégation. Une nette différence dans la distribution du cuivre a été observée selon la concentration de Cu(II) utilisée, ce qui semble être en accord avec la formation de complexes intramoléculaires aux faibles concentrations de Cu(II) et intermoléculaires pour les concentrations plus élevées.

Le couplage CE-ICP-MS a ainsi permis d'étudier pour la première fois la répartition du cuivre dans les différentes formes d'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$. Toutefois, les exigences liées à l'analyse de complexes labiles ont imposé le choix de conditions de séparation peu résolutive qui ne permettent pas une analyse quantitative précise du cuivre dans les états d'oligomérisation du peptide $A\beta_{1-42}$. Pour pallier ces exigences, le couplage de l'analyse par dispersion de Taylor (TDA) à l'ICP-MS, récemment développé au laboratoire, semble être une option intéressante.¹⁶⁸ L'avantage de la TDA est le maintien des espèces à l'équilibre tout au long de l'analyse. Elle a récemment fait ses preuves pour étudier de façon quantitative la spéciation du peptide $A\beta$ au cours du processus d'agrégation.¹⁵⁸ Des études préliminaires ont donc été réalisées en TDA-ICP-MS dans le but d'étudier l'évolution de la répartition du cuivre dans les différentes formes d'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ (**figure C-2**).

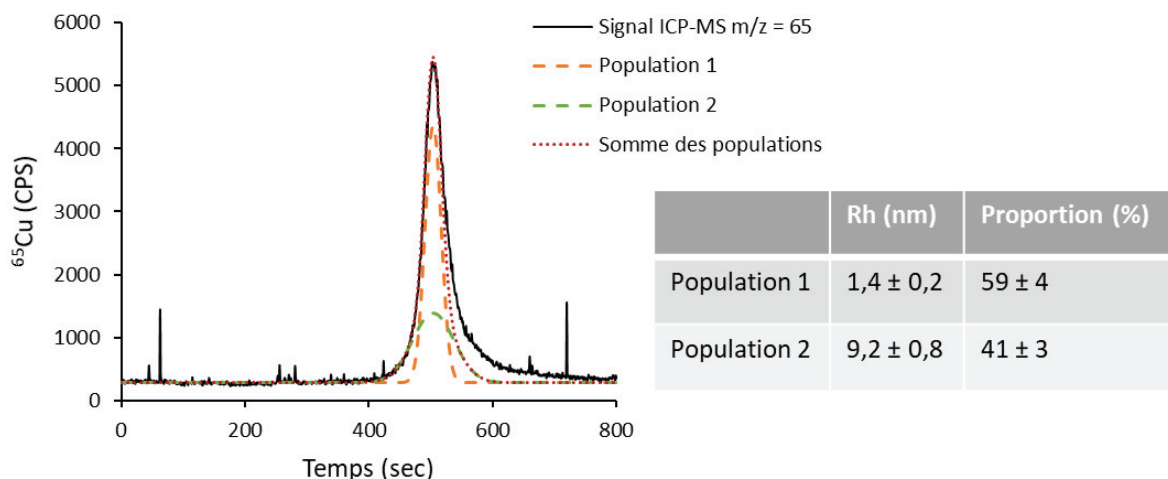


Figure C-2 : Signal ICP-MS et ajustement bimodal obtenus pour l'analyse d'une solution contenant 100 μM du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ et 50 μM de Cu(II) en TDA-ICP-MS. Le signal de référence est représenté en trait plein noir. Les traits en pointillés représentent les ajustements des deux populations (orange et vert) et la somme des populations (rouge). Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, pression de mobilisation : 0,7 psi, 25°C, détection : ICP-MS à $m/z = 65$.

Si cette méthode ne pourra pas être utilisée pour l'analyse d'échantillons biologiques, compte tenu de leur complexité (présence de protéines liant le cuivre telles que la céruloplasmine ou l'albumine sérique humaine), elle semble cependant d'un intérêt considérable pour l'étude de l'influence des métaux sur l'agrégation des peptides amyloïdes.

En conclusion, le couplage CE-ICP-MS constitue certainement une alternative complémentaire à l'ensemble des techniques utilisées pour l'étude de la relation entre les métaux et les peptides $\text{A}\beta$ dans la maladie d'Alzheimer. Des études approfondies devront être engagées afin d'améliorer la résolution des séparations et/ou l'adjonction de détections sélectives des différentes formes oligomériques. La séparation des petits oligomères en particulier semble être un défi particulièrement important à relever, afin de les distinguer des monomères.

Il faut également noter que dans le cas particulier du cuivre, l'élaboration de supports inertes à cette dernière est d'une importance cruciale.





Annexe 1 : Partie expérimentale

1. Préparation des capillaires

Dans le but de supprimer ou d'inversé le flux électroosmotique, la surface du capillaire peut être modifiée au moyen de greffage thermique ou recouvrement dynamique de polymères ou de tensioactifs. Dans cette partie, les protocoles de greffage thermique avec HPC et le recouvrement dynamique avec le polybrène sur des capillaires de 75 μm de diamètre sont détaillés.

1.1. Immobilisation thermique avec HPC

Le capillaire de silice classique peut être recouvert par immobilisation thermiquement d'un polymère neutre tel que l'hydroxypropyle cellulose (**figure A-1**) dans le but de neutraliser sa surface et ainsi annuler la μ_{eo} .

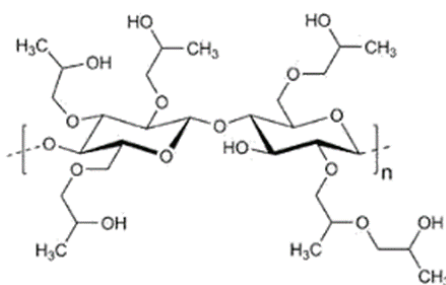


Figure A-1 - Formule semi-développée de l'HPC.

Le protocole de greffage, adapté de Shen *et al.*²²⁴ est détaillé ci-dessous :

Etape 1 : le capillaire de silice vierge est rempli avec une solution de HPC à 50 mg/mL sous 4 bars d'azote. Le remplissage est maintenu pendant 30 min après l'apparition des premières gouttes à la sortie du capillaire pour garantir son homogénéité.

Etape 2 : le capillaire préalablement rempli est vidé sous 2 bars d'azote afin de ne conserver qu'une fine couche de HPC à la surface du capillaire. Cette étape est jugée terminée lors de l'apparition des premiers bulles d'air, dans un flacon d'eau, à la sortie du capillaire.

Etape 3 : le capillaire est ensuite chauffé en appliquant le programme suivant : 60°C pendant 10 min, puis un gradient de 5°C/min jusqu'à 140°C et enfin pendant 25 min à 140°C.

Le montage utilisé pour réaliser le greffage est présenté dans la **figure A-2**.



Figure A-2 - Montage pour la réalisation du greffage avec HPC.

Avant chaque première utilisation, le capillaire est rincé à l'eau puis à l'acide HNO_3 1%, puis au tampon de séparation pendant 5 min à 10 psi. Entre chaque analyse, le capillaire est rincé deux fois avec HNO_3 1% puis avec l'électrolyte pendant 5 minutes à 5 psi.

1.2. Recouvrement dynamique avec du polybrène

L'hexadiméthrine bromide (**figure A-3**) couramment appelé polybrène (PB) est un polymère cationique utilisé pour le recouvrement positif des capillaires de silice. Sa longue chaîne polymérique lui permet de s'adsorber à la surface du capillaire de façon plus résistante qu'un tensio-actif monomérique tel que le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB). L'avantage d'un tel polymère est que le greffage dynamique se fait en amont de la séparation et qu'il ne nécessite pas d'être présent dans l'électrolyte de séparation.

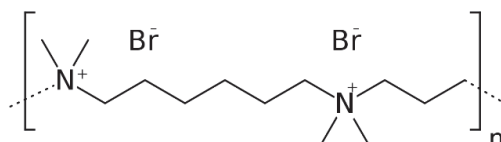


Figure A-3 - Formule semi-développée du polybrène.

Etape 1 : le capillaire de silice est pré-conditionné par des rinçages à l'eau, à la soude 1M puis de nouveau à l'eau pendant 5 min à 10 psi. Cette étape est réalisée lors de la première utilisation uniquement

Etape 2 : le greffage dynamique du capillaire est réalisé par percolation par une solution de polybrène à 0,1% en masse dans l'électrolyte de séparation pendant 30 minutes à une pression de 5 psi pour la première séparation puis pendant 10 minutes pour les séparations suivantes.

Etape 3 : le capillaire est rincé pendant 3 minutes à l'électrolyte de séparation sous une pression de 5 psi.

N.B. : lorsque le capillaire est rincé à l'acide HNO₃ 1% pour limiter les contaminations en cuivre, le capillaire est de nouveau percolé au polybrène pendant 30 minutes.

2. Préparation des solutions

2.1. Le peptide amyloïde

Protocole de préparation des échantillons de peptide :

- Solubilisation du peptide à environ 500 μM dans NH_4OH 0,1% pour le peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ et dans l'électrolyte pour le peptide $\text{A}\beta_{1-16}$.
- Détermination de la concentration exacte obtenue par mesures d'absorbance UV avec le spectrophotomètre UV-Vis Thermo Scientific™ NanoDrop™ ($\epsilon = 1490 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).
- Dilution du peptide dans l'électrolyte pour obtenir une concentration de 100 μM , avec ou sans métaux et avec ou sans compétiteur avec des concentrations variables.

2.2. Les tampons

Tampon Tris 10 mM NaCl 15 mM pH 7,4

- Solution mère Tris 100 mM NaCl 150 mM pH7,4 :

Tris base	2,42 g
NaCl	1,75 g
HCl concentré	1,5 mL
H ₂ O	200 mL

- Dilution par 10 de la solution mère.

Tampon Hepes 10 mM NaCl 15 mM pH 7,4

- Solution mère Hepes 100 mM NaCl 150 mM pH7,4 :

Hepes	4,77 g
NaCl	1,75 g
NaOH 1 mM	1 mL
H ₂ O	200 mL

- Dilution par 10 de la solution mère.

2.3. Solution diverses

Polybrène 0,1% en masse

Polybrène	10 mg
Tampon	10 mL

Acide HNO₃ 1%

HNO ₃ 65 %	12 mL
Tampon	QSP 800 mL

3. Conditions opératoires

3.1. CE-UV

Les expériences en CE-UV ont été réalisées sur l'électrophorèse Beckman P/ACE MDQ et les données ont été collectées avec le logiciel 32Karats. Les conditions suivantes ont été utilisées :

Capillaire	Silice immobilisée thermiquement avec HPC, 64 cm * 75 µm
Electrolyte	Tris 10 mM NaCl 15 mM pH 7,4
Injection	Hydrodynamique 0,5 psi pendant 5 sec
Séparation	-20 kV + 0,1 psi
Détection	UV 200 nm à 54 cm
Lavage pré-séparation	5 min 10 psi à l'électrolyte
Lavage post-séparation	5 min 10 psi à l'acide nitrique

3.2. CE-ICP-MS

Couplage réalisé entre l'électrophorèse capillaire Beckman P/ACE MDQ et l'ICP-MS Agilent 7700 équipé d'un analyseur quadripolaire.

Conditions opératoires CE

Longueur / diamètre du capillaire	64 cm / 75 µm
Nature du capillaire	Silice recouverte thermiquement avec HPC ou dynamiquement avec polybrène
Nature de l'électrolyte	Tampon Tris ou Hepes 10 mM + NaCl 15 mM
pH de l'électrolyte	7,4
Injection	Hydrodynamique 0.5 psi pendant 5 sec
Séparation	Entre 0 et -20 kV assisté par pression dans les capillaires HPC
Lavage pré-séparation	5 min 10 psi à l'électrolyte
Lavage post-séparation	2 * 5 min 10 psi à l'acide nitrique

Conditions opératoires ICP-MS

Nébuliseur	MicroMist
Détection du cuivre	m/z = 65
Temps d'acquisition	1 sec / masse
Débit de gaz vecteur	1 L.min ⁻¹
Débit de gaz d'appoint	0.1 L.min ⁻¹
Débit de gaz auxiliaire	0.9 L.min ⁻¹
Débit de gaz pour le plasma	15 L.min ⁻¹
Puissance radiofréquence	1550 W
Solvant additionnel	Tris 5 mM + EDTA 10 µM

3.3. TDA-UV

Les expériences en TDA-UV ont été réalisées sur l'électrophorèse Beckman P/ACE MDQ dans les conditions suivantes :

Capillaire	Silice immobilisée thermiquement avec HPC, 64 cm * 75 µm
Electrolyte	Tris 10 mM NaCl 15 mM pH 7,4
Injection	Hydrodynamique 0,5 psi pendant 5 sec
Séparation	0,3 psi
Détection	UV 200 nm à 54 cm
Lavage pré-séparation	5 min 10 psi à l'électrolyte
Lavage post-séparation	5 min 10 psi à l'acide nitrique



Annexe 2 : Principe TDA

Lorsque le soluté est injecté et poussé, il s'établit un profil de vitesse parabolique dans le capillaire. Dans le cas d'un soluté présentant des populations de tailles différentes, le signal obtenu en UV peut être considéré comme la somme de plusieurs pics gaussiens correspondant chacun à une taille. L'ajustement du signal par des distributions gaussiennes via l'**équation A-1** est réalisé à l'aide d'un logiciel de traitement de données.

$$y = y_0 + \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{(t-t_0)^2}{\sigma^2}\right) \quad (\text{A-1})$$

où t est le temps expérimental, t_0 et σ sont respectivement la moyenne et la variance temporelle de la distribution gaussienne ajustée, y_0 la ligne de base et A une constante dépendant de la sensibilité de détection et de la concentration de l'échantillon.

L'ajustement du signal permet de déterminer les coefficients de diffusion de chaque population. Dans les conditions expérimentales décrites par Chamieh *et al.*,¹⁵⁷ R_h peut alors être déterminé par combinaison de l'équation de Taylor et de Stokes-Einstein (**équation A-2**) :

$$D = \frac{R_c^2 t_0}{24\sigma^2} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (\text{A-2})$$

où D est le coefficient de diffusion du soluté ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), R_c le diamètre du capillaire (m), k_B la constante de Boltzmann ($\text{m}^2.\text{kg}.\text{s}^{-2}.\text{K}^{-1}$), T la température (K), η la viscosité (Pa.s) et R_h le rayon hydrodynamique du soluté (m).

Il est à noter que l'ajustement des données expérimentales est réalisé sur la première moitié du signal uniquement, grâce au logiciel OriginPro 8.5.

Pour garantir un écart-type relatif inférieur à 3% dans le traitement des résultats, les conditions expérimentales doivent être adaptées pour que les **équations A-3 et A-4** soient vérifiées, où u est la vitesse linéaire (m/s).¹⁵⁷

$$t_0 \geq 2,5 \frac{R_c^2}{D} \quad (\text{A-3})$$

$$u \geq \frac{69D}{R_c} \quad (\text{A-4})$$



Annexe 3 : Détermination de la mobilité du complexe NTA-Cu(II) par ACE

Une étude ACE a été réalisée pour déterminer la mobilité du complexe NTA-Cu(II). Les résultats obtenus sont représentés dans la **figure A-4** et le **tableau A-1**.

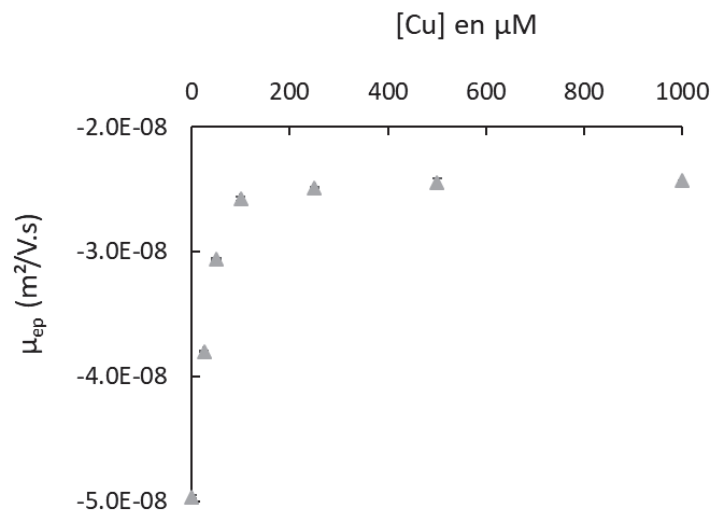


Figure A-4 - Variation de la mobilité électrophorétique de 100 μM de NTA en présence de cuivre. Conditions : capillaire avec revêtement HPC (75 μm d.i. x 64 cm), tampon : 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7,4, injection : 0,5 psi pendant 5 sec, séparation : -20 kV avec une pression assistée de 0,1 psi, 25°C, détection : UV 200 nm à 55 cm.

Tableau A-1 - Mobilités électrophorétiques de NTA libre ou complexé au cuivre déterminées par ACE.

Ligand	Métal	μ_{ep} ligand ($10^{-8} m^2.V^{-1}.s^{-1}$)	μ_{ep} complexe ($10^{-8} m^2.V^{-1}.s^{-1}$)
NTA	Cuivre	$-4,96 \pm 0,01$	$-2,43 \pm 0,01$

Les résultats montrent un ligand et un complexe de charge négative. Il est à noter une différence de mobilité plus importante que dans le cas du complexe $A\beta_{1-16}$ -Cu(II) avec $\mu_{ep}(NTA) = 2 \times \mu_{ep}(NTA-Cu(II))$. Cette différence explique l'effet dissociant plus important lors de l'application du voltage pour les séparations en CE du complexe NTA-Cu(II) par rapport à $A\beta_{1-16}$ -Cu(II), déjà discuté dans le chapitre 2 de ce manuscrit.



RÉFÉRENCES

- 1 E. N. Cline, M. A. Bicca, K. L. Viola and W. L. Klein, *JAD*, 2018, **64**, S567–S610.
- 2 G. McKhann, D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price and E. M. Stadlan, *Neurology*, 1984, **34**, 939–944.
- 3 M. F. Folstein, S. E. Folstein and P. R. McHugh, *J. Psychiatr. Res.*, 1975, **12**, 189–198.
- 4 R. C. Petersen, G. E. Smith, S. C. Waring, R. J. Ivnik, E. G. Tangalos and E. Kokmen, *Archives of Neurology*, 1999, **56**, 303–308.
- 5 *The EMBO Journal*, 1995, **14**, 1304–1313.
- 6 O. Hansson, H. Zetterberg, P. Buchhave, E. Londos, K. Blennow and L. Minthon, *The Lancet Neurology*, 2006, **5**, 228–234.
- 7 F. H. Bouwman, S. N. M. Schoonenboom, W. M. van der Flier, E. J. van Elk, A. Kok, F. Barkhof, M. A. Blankenstein and Ph. Scheltens, *Neurobiology of Aging*, 2007, **28**, 1070–1074.
- 8 S.-K. Herukka, S. Helisalmi, M. Hallikainen, S. Tervo, H. Soininen and T. Pirttilä, *Neurobiology of Aging*, 2007, **28**, 507–514.
- 9 D. Stroyk, K. Blennow, L. R. White and L. J. Launer, *Neurology*, 2003, **60**, 652–656.
- 10 T. Tapiola, I. Alafuzoff, S.-K. Herukka, L. Parkkinen, P. Hartikainen, H. Soininen and T. Pirttilä, *Archives of Neurology*, 2009, **66**, 382–389.
- 11 C. R. Jack, D. S. Knopman, W. J. Jagust, L. M. Shaw, P. S. Aisen, M. W. Weiner, R. C. Petersen and J. Q. Trojanowski, *The Lancet Neurology*, 2010, **9**, 119–128.
- 12 P. S. Aisen, R. C. Petersen, M. C. Donohue, A. Gamst, R. Raman, R. G. Thomas, S. Walter, J. Q. Trojanowski, L. M. Shaw, L. A. Beckett, C. R. Jack, W. Jagust, A. W. Toga, A. J. Saykin, J. C. Morris, R. C. Green, M. W. Weiner, and Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative, *Alzheimer Dement*, 2010, **6**, 239–246.
- 13 J. Kang, H.-G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K.-H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther and B. Müller-Hill, *Nature*, 1987, **325**, 733–736.
- 14 H. W. Querfurth and F. M. LaFerla, *New England Journal of Medicine*, 2010, **362**, 329–344.
- 15 F. Checler, *Journal of Neurochemistry*, 1995, **65**, 1431–1444.
- 16 L. Guilloureau, L. Damian, Y. Coppel, H. Mazarguil, M. Winterhalter and P. Faller, *J Biol Inorg Chem*, 2006, **11**, 1024–1038.
- 17 C. L. Masters, G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald and K. Beyreuther, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1985, **82**, 4245–4249.
- 18 C. Vigo-Pelfrey, D. Lee, P. Keim, I. Lieberburg and D. B. Schenk, *Journal of Neurochemistry*, 1993, **61**, 1965–1968.
- 19 D. Burdick, J. Kosmoski, M. F. Knauer and C. G. Glabe, *Brain Research*, 1997, **746**, 275–284.
- 20 J. A. Hardy and G. A. Higgins, *Science*, 1992, **256**, 184–185.
- 21 T. L. Williams, I. J. Day and L. C. Serpell, *Langmuir*, 2010, **26**, 17260–17268.
- 22 A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio and R. Tycko, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, **99**, 16742–16747.
- 23 E. Cerf, R. Sarroukh, S. Tamamizu-Kato, L. Breydo, S. Derclaye, Y. F. Dufrêne, V. Narayanaswami, E. Goormaghtigh, J.-M. Ruysschaert and V. Raussens, *Biochemical Journal*, 2009, **421**, 415–423.
- 24 J. T. Jarrett, E. P. Berger and P. T. Lansbury, *Biochemistry*, 1993, **32**, 4693–4697.
- 25 R. Wetzol, *Acc. Chem. Res.*, 2006, **39**, 671–679.
- 26 E. Hellstrand, B. Boland, D. M. Walsh and S. Linse, *ACS Chem. Neurosci.*, 2010, **1**, 13–18.
- 27 V. Borghesani, B. Alies and C. Hureau, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2018, **2018**, 7–15.
- 28 G. Bitan, M. D. Kirkitadze, A. Lomakin, S. S. Vollers, G. B. Benedek and D. B. Teplow, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, **100**, 330–335.

- 29 F. Hasecke, T. Miti, C. Perez, J. Barton, D. Schölzel, L. Gremer, C. S. R. Grüning, G. Matthews, G. Meisl, T. P. J. Knowles, D. Willbold, P. Neudecker, H. Heise, G. Ullah, W. Hoyer and M. Muschol, *Chem. Sci.*, 2018, **9**, 5937–5948.
- 30 G. Chen, K. S. Chen, J. Knox, J. Inglis, A. Bernard, S. J. Martin, A. Justice, L. McConlogue, D. Games, S. B. Freedman and R. G. M. Morris, 2000, **408**, 5.
- 31 W. L. Klein, W. B. Stine and D. B. Teplow, *Neurobiology of Aging*, 2004, **25**, 569–580.
- 32 J. Näslund, *JAMA*, 2002, **283**, 1571–1577.
- 33 M. E. Larson and S. E. Lesné, *Journal of Neurochemistry*, 2012, **120**, 125–139.
- 34 K. A. Bruggink, W. Jongbloed, E. A. L. M. Biemans, R. Veerhuis, J. A. H. R. Claassen, H. B. Kuiperij and M. M. Verbeek, *Analytical Biochemistry*, 2013, **433**, 112–120.
- 35 J. M. Walshe, *QJM*, 2012, **105**, 419–423.
- 36 M. Ozturk, E. Karacelebi, K. Gungor, S. Coskun and E. Boysan, *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, **8**, 3943–3945.
- 37 A. Poujois, J.-M. Trocello, N. Djebrani-Oussedik, J. Poupon, C. Collet, N. Girardot-Tinant, R. Sobesky, D. Habès, D. Debray, C. Vanlemmens, F. Fluchère, F. Ory-Magne, J. Labreuche, C. Preda and F. Woimant, *European Journal of Neurology*, 2017, **24**, 154–160.
- 38 A. Ahuja, K. Dev, R. S. Tanwar, K. K. Selwal and P. K. Tyagi, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2015, **29**, 11–23.
- 39 K. P. Kepp and R. Squitti, *Coordination Chemistry Reviews*, 2019, **397**, 168–187.
- 40 J. Xu, S. J. Church, S. Patassini, P. Begley, H. J. Waldvogel, M. A. Curtis, R. L. M. Faull, R. D. Unwin and G. J. S. Cooper, *Metallomics*, 2017, **9**, 1106–1119.
- 41 E. András, É. Farkas, H. Scheibler, A. Réffy and L. Bezúr, *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 1995, **21**, 89–97.
- 42 M. A. Deibel, W. D. Ehmann and W. R. Markesbery, *Journal of the Neurological Sciences*, 1996, **143**, 137–142.
- 43 S. Magaki, R. Raghavan, C. Mueller, K. C. Oberg, H. V. Vinters and W. M. Kirsch, *Neuroscience Letters*, 2007, **418**, 72–76.
- 44 J. Liu, L. Zheng, X. Wei, B. Wang, H. Chen, M. Chen, M. Wang, W. Feng and J. Wang, *Microchemical Journal*, 2022, **172**, 106912.
- 45 P. Ramos, E. Pinto, A. Santos and A. Almeida, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2021, **66**, 126745.
- 46 S. Bucossi, M. Ventriglia, V. Panetta, C. Salustri, P. Pasqualetti, S. Mariani, M. Siotto, P. M. Rossini and R. Squitti, *JAD*, 2011, **24**, 175–185.
- 47 D.-D. Li, W. Zhang, Z.-Y. Wang and P. Zhao, *Front Aging Neurosci*, 2017, **9**, 300.
- 48 R. Squitti, I. Simonelli, M. Ventriglia, M. Siotto, P. Pasqualetti, A. Rembach, J. Doecke and A. I. Bush, *JAD*, 2014, **38**, 809–822.
- 49 P. Faller and C. Hureau, *Dalton Trans.*, 2009, **7**, 1080–1094.
- 50 P. Faller, C. Hureau, P. Dorlet, P. Hellwig, Y. Coppel, F. Collin and B. Alies, *Coordination Chemistry Reviews*, 2012, **256**, 2381–2396.
- 51 C. C. Curtain, F. Ali, I. Volitakis, R. A. Cherny, R. S. Norton, K. Beyreuther, C. J. Barrow, C. L. Masters, A. I. Bush and K. J. Barnham, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**, 20466–20473.
- 52 C. D. Syme, R. C. Nadal, S. E. J. Rigby and J. H. Viles, *Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**, 18169–18177.
- 53 P. Dorlet, S. Gambarelli, P. Faller and C. Hureau, *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, **48**, 9273–9276.
- 54 C. Hureau, Y. Coppel, P. Dorlet, P. L. Solari, S. Sayen, E. Guillon, L. Sabater and P. Faller, *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, **48**, 9522–9525.
- 55 L. Hou and M. G. Zagorski, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 9260–9261.
- 56 B. Alies, H. Eury, C. Bijani, L. Rechinat, P. Faller and C. Hureau, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 11192–11201.
- 57 W. A. Gunderson, J. Hernández-Guzmán, J. W. Karr, L. Sun, V. A. Szalai and K. Warncke, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 18330–18337.

- 58 S. Parthasarathy, F. Long, Y. Miller, Y. Xiao, D. McElheny, K. Thurber, B. Ma, R. Nussinov and Y. Ishii, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 3390–3400.
- 59 L. Q. Hatcher, L. Hong, W. D. Bush, T. Carducci and J. D. Simon, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, **112**, 8160–8164.
- 60 L. A. Byrne, M. J. Hynes, C. D. Connolly and R. A. Murphy, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2011, **105**, 1656–1661.
- 61 Q.-F. Ma, J. Hu, W.-H. Wu, H.-D. Liu, J.-T. Du, Y. Fu, Y.-W. Wu, P. Lei, Y.-F. Zhao and Y.-M. Li, *Biopolymers*, 2006, **83**, 20–31.
- 62 W. Garzon-Rodriguez, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 2243–2248.
- 63 J. W. Karr, H. Akintoye, L. J. Kaupp and V. A. Szalai, *Biochemistry*, 2005, **44**, 5478–5487.
- 64 N. E. Grosseohme, A. M. Spuches and D. E. Wilcox, *J Biol Inorg Chem*, 2010, **15**, 1183–1191.
- 65 B. Alies, E. Renaglia, M. Rózga, W. Bał, P. Faller and C. Hureau, *Analytical Chemistry*, 2013, **85**, 1501–1508.
- 66 T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta and K. Wisniewska, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003, **95**, 270–282.
- 67 V. Tõugu, A. Karafin and P. Palumaa, *Journal of Neurochemistry*, 2008, **104**, 1249–1259.
- 68 D. Jiang, L. Zhang, G. P. G. Grant, C. G. Dudzik, S. Chen, S. Patel, Y. Hao, G. L. Millhauser and F. Zhou, *Biochemistry*, 2013, **52**, 547–556.
- 69 D. Jiang, L. Men, J. Wang, Y. Zhang, S. Chickenyen, Y. Wang and F. Zhou, *Biochemistry*, 2007, **46**, 9270–9282.
- 70 K. D. Fasae, A. O. Abolaji, T. R. Faloye, A. Y. Odunsi, B. O. Oyetayo, J. I. Enya, J. A. Rotimi, R. O. Akinyemi, A. J. Whitworth and M. Aschner, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2021, **67**, 126779.
- 71 J. Nasica-Labouze, P. H. Nguyen, F. Sterpone, O. Berthoumieu, N.-V. Buchete, S. Coté, A. De Simone, A. J. Doig, P. Faller, A. Garcia, A. Laio, M. S. Li, S. Melchionna, N. Mousseau, Y. Mu, A. Paravastu, S. Pasquali, D. J. Rosenman, B. Strodel, B. Tarus, J. H. Viles, T. Zhang, C. Wang and P. Derreumaux, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 3518–3563.
- 72 J. A. Duce and A. I. Bush, *Progress in Neurobiology*, 2010, **92**, 1–18.
- 73 M. Gu, D. C. Bode and J. H. Viles, *Sci Rep*, 2018, **8**, 16190.
- 74 S. S. Hindo, A. M. Mancino, J. J. Braymer, Y. Liu, S. Vivekanandan, A. Ramamoorthy and M. H. Lim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 16663–16665.
- 75 A. K. Sharma, S. T. Pavlova, J. Kim, D. Finkelstein, N. J. Hawco, N. P. Rath, J. Kim and L. M. Mirica, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 6625–6636.
- 76 L. Guilloreau, S. Combalbert, A. Sournia-Saquet, H. Mazarguil and P. Faller, *ChemBioChem*, 2007, **8**, 1317–1325.
- 77 L. Perrone, E. Mothes, M. Vignes, A. Mockel, C. Figueroa, M.-C. Miquel, M.-L. Maddelein and P. Faller, *Chem. Eur. J. of Chem. Bio.*, 2009, **11**, 110–118.
- 78 S. Chassaing, F. Collin, P. Dorlet, J. Gout, C. Hureau and P. Faller, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2012, **12**, 2573–2595.
- 79 A. I. Bush, *Trends in Neurosciences*, 2003, **26**, 207–214.
- 80 P. S. Donnelly, Z. Xiao and A. G. Wedd, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2007, **11**, 128–133.
- 81 H. Kozłowski, A. Janicka-Klos, J. Brasun, E. Gaggelli, D. Valensin and G. Valensin, *Coordination Chemistry Reviews*, 2009, **253**, 2665–2685.
- 82 J. T. Pedersen, J. Østergaard, N. Rozlosnik, B. Gammelgaard and N. H. H. Heegaard, *Journal of Biological Chemistry*, 2011, **286**, 26952–26963.
- 83 M. Rana and A. K. Sharma, *Metallomics*, 2019, **11**, 64–84.
- 84 A. K. Sharma, S. T. Pavlova, J. Kim, J. Kim and L. M. Mirica, *Metallomics*, 2013, **5**, 1529–1536.
- 85 M. G. M. Weibull, S. Simonsen, C. R. Oksbjerg, M. K. Tiwari and L. Hemmingsen, *J Biol Inorg Chem*, 2019, **24**, 1197–1215.
- 86 C. S. Atwood, R. D. Moir, X. Huang, R. C. Scarpa, N. M. E. Bacarra, D. M. Romano, M. A. Hartshorn, R. E. Tanzi and A. I. Bush, *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**, 12817–12826.
- 87 C. J. Sarell, S. R. Wilkinson and J. H. Viles, *Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**, 41533–41540.

- 88 E. House, M. Mold, J. Collingwood, A. Baldwin, S. Goodwin and C. Exley, *J. Alzheimer's Dis.*, 2009, **18**, 811–817.
- 89 J. Zou, K. Kajita and N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 2274–2277.
- 90 C. J. Matheou, N. D. Younan and J. H. Viles, *Biochem. J.*, 2015, **466**, 233–242.
- 91 D. P. Smith, G. D. Ciccotosto, D. J. Tew, M. T. Fodero-Tavoletti, T. Johanssen, C. L. Masters, K. J. Barnham and R. Cappai, *Biochemistry*, 2007, **46**, 2881–2891.
- 92 A. Olofsson, M. Lindhagen-Persson, M. Vestling, A. E. Sauer-Eriksson and A. Öhman, *The FEBS Journal*, 2009, **276**, 4051–4060.
- 93 M. Mold, L. Ouro-Gnao, B. M. Wieckowski and C. Exley, *Scientific Reports*.
- 94 V. Töugu, A. Karafin, K. Zovo, R. S. Chung, C. Howells, A. K. West and P. Palumaa, *Journal of Neurochemistry*, 2009, **110**, 1784–1795.
- 95 F. Attanasio, P. De Bona, S. Cataldo, M. F. M. Sciacca, D. Milardi, B. Pignataro and G. Pappalardo, *New J. Chem.*, 2013, **37**, 1206.
- 96 P. Faller, C. Hureau and O. Berthoumieu, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 12193–12206.
- 97 L.-W. Jin, K. A. Claborn, M. Kurimoto, M. A. Geday, I. Maezawa, F. Sohraby, M. Estrada, W. Kaminsky and B. Kahr, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, **100**, 15294–15298.
- 98 M. R. H. Krebs, E. H. C. Bromley and A. M. Donald, *Journal of Structural Biology*, 2005, **149**, 30–37.
- 99 L. M. Miller, Q. Wang, T. P. Telivala, R. J. Smith, A. Lanzirotti and J. Miklossy, *Journal of Structural Biology*, 2006, **155**, 30–37.
- 100 A. C. Leskovjan, A. Lanzirotti and L. M. Miller, *Neuroimage*, 2009, **47**, 1215–1220.
- 101 R. W. Hutchinson, A. G. Cox, C. W. McLeod, P. S. Marshall, A. Harper, E. L. Dawson and D. R. Howlett, *Analytical Biochemistry*, 2005, **346**, 225–233.
- 102 L. Feng, J. Wang, H. Li, X. Luo and J. Li, *Analytica Chimica Acta*, 2017, **984**, 66–75.
- 103 S. A. James, Q. I. Churches, M. D. de Jonge, I. E. Birchall, V. Streltsov, G. McColl, P. A. Adlard and D. J. Hare, *ACS Chem. Neurosci.*, 2017, **8**, 629–637.
- 104 M. J. Hackett, J. A. McQuillan, F. El-Assaad, J. B. Aitken, A. Levina, D. D. Cohen, R. Siegele, E. A. Carter, G. E. Grau, N. H. Hunt and P. A. Lay, *Analyst*, 2011, **136**, 2941.
- 105 M. A. Lovell, J. D. Robertson, W. J. Teesdale, J. L. Campbell and W. R. Markesbery, *Journal of the Neurological Sciences*, 1998, **158**, 47–52.
- 106 K. M. Davies, D. J. Hare, S. Bohic, S. A. James, J. L. Billings, D. I. Finkelstein, P. A. Doble and K. L. Double, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 6639–6645.
- 107 C. Guan, R. Dang, Y. Cui, L. Liu, X. Chen, X. Wang, J. Zhu, D. Li, J. Li and D. Wang, *PLoS ONE*, 2017, **12**, e0178271.
- 108 A.-M. Chiorcea-Paquim, T. A. Enache and A. M. Oliveira-Brett, *CMC*, 2018, **25**, 4066–4083.
- 109 A.-M. Chiorcea-Paquim and A. M. Oliveira-Brett, *Current Opinion in Electrochemistry*, 2022, **31**, 100837.
- 110 Y. Yu, P. Wang, X. Zhu, Q. Peng, Y. Zhou, T. Yin, Y. Liang and X. Yin, *Analyst*, 2018, **143**, 323–331.
- 111 R. Verpillot, M. Otto, H. Klafki and M. Taverna, *Journal of Chromatography A*, 2008, **1214**, 157–164.
- 112 S. Sabella, M. Quaglia, C. Lanni, M. Racchi, S. Govoni, G. Caccialanza, A. Calligaro, V. Bellotti and E. D. Lorenzi, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 3186–3194.
- 113 R. Colombo, A. Carotti, M. Catto, M. Racchi, C. Lanni, L. Verga, G. Caccialanza and E. D. Lorenzi, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 1418–1429.
- 114 R. A. Picou, I. Kheterpal, A. D. Wellman, M. Minnamreddy, G. Ku and S. D. Gilman, *Journal of Chromatography B*, 2011, **879**, 627–632.
- 115 D. Brinet, J. Kaffy, F. Oukacine, S. Glumm, S. Ongeru and M. Taverna, *Electrophoresis*, 2014, **35**, 3302–3309.
- 116 F. Bisceglia, A. Natalello, M. M. Serafini, R. Colombo, L. Verga, C. Lanni and E. De Lorenzi, *Talanta*, 2018, **188**, 17–26.
- 117 M. Kato, H. Kinoshita, M. Enokita, Y. Hori, T. Hashimoto, T. Iwatsubo and T. Toyo'oka, *Analytical Chemistry*, 2007, **79**, 4887–4891.

- 118 M. Morani, M. Taverna and T. D. Mai, *ELECTROPHORESIS*, 2019, **40**, 2618–2624.
- 119 S. Lan, Y. Xiong, S. Tian, L. Sun, T. Xie, X. Wang and L. Kong, *Electroanalysis*, 2014, **26**, 2534–2540.
- 120 J. E. Sonke and V. J. M. Salters, *Analyst*, 2004, **129**, 731.
- 121 A. Prange and D. Pröfrock, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, **383**, 372–389.
- 122 T.-N. S. Huynh, C. Vidaud and A. Hagège, *Metallomics*, 2016, **8**, 1185–1192.
- 123 L. S. Foteeva, M. Matczuk, K. Pawlak, S. S. Aleksenko, S. V. Nosenko, V. K. Karandashev, M. Jarosz and A. R. Timerbaev, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, **409**, 2421–2427.
- 124 S. M. Ansar and T. Mudalige, *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, **561**, 283–288.
- 125 A. Hagège, T. N. S. Huynh and M. Hébrant, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, **64**, 64–74.
- 126 P. Janos, *Journal of Chromatography A*, 1999, **834**, 3–20.
- 127 J. E. Sonke and V. J. M. Salters, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 235–240.
- 128 J. W. Olesik, J. A. Kinzer and S. V. Olesik, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 1–12.
- 129 J. Chamoun and A. Hagège, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, **20**, 1030.
- 130 T.-N. S. Huynh, D. Bourgeois, C. Basset, C. Vidaud and A. Hagège, *ELECTROPHORESIS*, 2015, **36**, 1374–1382.
- 131 J. Horvath and V. Dolník, *ELECTROPHORESIS*, 2001, **22**, 644–655.
- 132 R. Wu, L. Tian, W. Wang and X. Man, *Journal of Applied Polymer Science*, 2015, **132**, 1–9.
- 133 Y. Shen and R. D. Smith, *Journal of Microcolumn Separations*, 2000, **12**, 135–141.
- 134 M. Takahashi, M. Takano and K. Asada, *The Journal of Biochemistry*, 1981, **90**, 87–94.
- 135 M. Sokołowska and W. Bal, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, **99**, 1653–1660.
- 136 K. L. Haas, A. B. Putterman, D. R. White, D. J. Thiele and K. J. Franz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 4427–4437.
- 137 I. Zawisza, M. Rózga and W. Bal, *Coordination Chemistry Reviews*, 2012, **256**, 2297–2307.
- 138 M. Rózga, M. Kłoniecki, M. Dadlez and W. Bal, *Chemical Research in Toxicology*, 2010, **23**, 336–340.
- 139 K. Shimura and K. Kasai, *Analytical Biochemistry*, 1997, **251**, 1–16.
- 140 A. Varenne, P. Gareil, S. Collicec-Jouault and R. Daniel, *Analytical Biochemistry*, 2003, **315**, 152–159.
- 141 K. L. Rundlett and D. W. Armstrong, *Electrophoresis*, 1997, **18**, 2194–2202.
- 142 M. T. Bowser and D. D. Y. Chen, *J. Phys. Chem. A*, 1998, **102**, 8063–8071.
- 143 K. L. Rundlett and D. W. Armstrong, *Journal of Chromatography A*, 1996, **721**, 173–186.
- 144 G. Owens, V. K. Ferguson, M. J. McLaughlin, I. Singleton, R. J. Reid and F. A. Smith, *Environ. Sci. Technol.*, 2000, **34**, 885–891.
- 145 B. E. Fischer, U. K. Häring, R. Tribolet and H. Sigel, *European Journal of Biochemistry*, 1979, **94**, 523–530.
- 146 M. Goedert and M. G. Spillantini, *Science*, 2006, **314**, 777–781.
- 147 E. Stefaniak, E. Atrian-Blasco, W. Goch, L. Sabater, C. Hureau and W. Bal, *Chem. Eur. J.*, 2021, **27**, 2798–2809.
- 148 E. Atrián-Blasco, paulina gonzalez, A. Santoro, B. Alies, P. Faller and C. Hureau, *Coordination Chemistry Reviews*, 2018, **371**, 38–55.
- 149 G. Arena, G. Pappalardo, I. Sovago and E. Rizzarelli, *Coordination Chemistry Reviews*, 2012, **256**, 3–12.
- 150 Y. Bin, Z. Jiang and J. Xiang, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, **176**, 56–65.
- 151 M. Rózga, A. M. Protas, A. Jabłonowska, M. Dadlez and W. Bal, *Chem. Commun.*, 2009, 1374–1376.
- 152 Y. Shen, S. J. Berger, G. A. Anderson and R. D. Smith, *Analytical Chemistry*, 2000, **72**, 2154–2159.
- 153 F. Varenne, M. Bourdillon, M. Meyer, Y. Lin, M. Brellier, R. Baati, L. J. Charbonnière, A. Wagner, E. Doris, F. Taran and A. Hagège, *Journal of Chromatography A*, 2012, **1229**, 280–287.
- 154 M. Rózga, M. Sokołowska, A. M. Protas and W. Bal, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2007, **12**, 913–918.
- 155 G. Multhaupt and C. L. Masters, *Met Ions Biol Syst*, 1999, **36**, 365–387.
- 156 F. d’Orlyé, A. Varenne and P. Gareil, *Journal of Chromatography A*, 2008, **1204**, 226–232.
- 157 J. Chamieh, L. Leclercq, M. Martin, S. Slaoui, H. Jensen, J. Østergaard and H. Cottet, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 13487–13493.

- 158 M. Deleanu, J.-F. Hernandez, L. Cipelletti, J.-P. Biron, E. Rossi, M. Taverna, H. Cottet and J. Chamieh, *Anal. Chem.*, 2021, **93**, 6523–6533.
- 159 E. L. Cussler, Diffusion Mass Transfer In Fluid Systems, (accessed September 23, 2021).
- 160 P. Faller and C. Hureau, *Front Chem*, 2021, **8**, 611227.
- 161 M. Y. Suvorina, O. M. Selivanova, E. I. Grigorashvili, A. D. Nikulin, V. V. Marchenkov, A. K. Surin and O. V. Galzitskaya, *J. Alzheimers Dis.*, 2015, **47**, 583–593.
- 162 Z. Szabo, E. Klement and K. Jost, *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 1999, **265**, 4.
- 163 B. Zhang-Haagen, R. Biehl, L. Nagel-Steger, A. Radulescu, D. Richter and D. Willbold, *PLoS One*, 2016, **11**, e0150267.
- 164 S. K. Pachahara, N. Chaudhary, C. Subbalakshmi and R. Nagaraj, *Journal of Peptide Science*, 2012, **18**, 233–241.
- 165 T. Miti, M. Mulaj, J. D. Schmit and M. Muschol, *Biomacromolecules*, 2015, **16**, 326–335.
- 166 C. Talmard, L. Guilloreau, Y. Coppel, H. Mazarguil and P. Faller, *ChemBioChem*, 2007, **8**, 163–165.
- 167 E. Sitkiewicz, M. Kłoniecki, J. Poznański, W. Bal and M. Dadlez, *J. Molec. Biol.*, 2014, **426**, 2871–2885.
- 168 L. Labied, P. Rocchi, T. Doussineau, J. Randon, O. Tillement, F. Lux and A. Hagège, *Anal. Chem.*, 2021, **93**, 1254–1259.



Résumé

Il est aujourd'hui largement accepté que la cascade amyloïde est un élément clé dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Il semble aussi de plus en plus probable que le cuivre a un rôle important dans la progression de la maladie, de par sa capacité à se lier au peptide amyloïde β ($A\beta$) et à influencer son agrégation. Cependant, le rôle exact de ce métal est encore incertain, notamment à cause du manque de données quantitatives dans ce domaine. Cette thèse a donc pour objectif de fournir une méthode analytique complémentaire aux méthodes existantes pour étudier l'interaction entre les différentes formes d'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ et le cuivre. Dans ce contexte, une méthodologie centrée sur le couplage entre l'électrophorèse capillaire et l'ICP-MS (CE-ICP-MS) a été développée. Elle a nécessité de résoudre au préalable les problèmes liés à l'analyse du cuivre à l'état de traces (contamination, sorption) et à la labilité du complexe $A\beta$ -Cu(II) (dissociation) pour obtenir une méthode permettant la quantification du cuivre complexé aux différentes formes du peptide $A\beta$ à l'échelle du μM . Ce couplage a permis de déterminer une constante d'affinité du peptide $A\beta$ pour Cu(II) ($\log K = 9,9 \pm 0,2$), contribuant ainsi à l'établissement d'un consensus autour de cette valeur, et de confirmer la pertinence de la formation du complexe $A\beta$ -Cu(II) *in vivo*. Le couplage CE-ICP-MS a également permis d'obtenir pour la première fois une répartition du cuivre entre les petits oligomères du peptide et ceux de taille plus large au cours du processus d'agrégation et de montrer que celle-ci est fonction de la concentration initiale de ce métal.

Abstract

It is now widely accepted that the amyloid cascade is a key element in the development of Alzheimer's disease. It also seems that copper is likely to have an important role in the progression of the disease, through its ability to interact with the amyloid peptide β ($A\beta$) and to influence its aggregation. However, the exact role of this metal is still uncertain, especially due to the lack of quantitative data in this area. This thesis aims at providing an analytical method, complementary to the existing methods in order to study the interaction between the different forms of aggregation of the $A\beta_{1-42}$ peptide and copper. In this context, a methodology focused on the coupling between capillary electrophoresis and ICP-MS (CE-ICP-MS) was developed. This required preliminary studies to solve the problems related to the analysis of copper at trace levels (contamination, sorption) and to the lability of the $A\beta$ -Cu (II) complex (dissociation) to obtain a method allowing the quantification of copper complexed to the different forms of the $A\beta$ peptide at the μM scale. CE-ICP-MS hyphenation allowed to determine an affinity constant of the $A\beta$ peptide for Cu (II) ($\log K = 9.9 \pm 0.2$), thus contributing to the establishment of a consensus around this value, and to confirm the relevance of the formation of the $A\beta$ -Cu (II) complex *in vivo*. CE-ICP-MS hyphenation also enabled to obtain for the first time a distribution of copper between the small oligomers of the peptide and those of larger size during the process of aggregation and to show that this is a function of the initial concentration of this metal.