



HAL
open science

Membranes biomimétiques pour la caractérisation de nouveaux agents thérapeutiques : application à la maladie d'Alzheimer

Willy Smeralda

► **To cite this version:**

Willy Smeralda. Membranes biomimétiques pour la caractérisation de nouveaux agents thérapeutiques : application à la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMC419 . tel-04617195

HAL Id: tel-04617195

<https://theses.hal.science/tel-04617195v1>

Submitted on 19 Jun 2024

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Membranes biomimétiques pour la caractérisation de nouveaux agents thérapeutiques- Application à la maladie d'Alzheimer.

Présentée et soutenue par
Willy SMERALDA

**Thèse soutenue publiquement le 16/12/2019
devant le jury composé de**

Mme KARINE ANDRIEUX	Professeur, Université Paris 5 Descartes	Rapporteur du jury
M. TRISTAN RICHARD	Professeur, Université de Bordeaux	Rapporteur du jury
M. CHRISTOPHE CULLIN	Professeur, Université de Bordeaux	Président du jury
M. MARC SINCE	Maître de conférences, Université Caen Normandie	Membre du jury
Mme AURELIE MALZERT-FREON	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

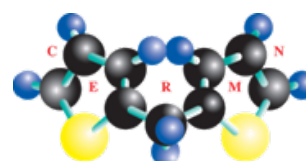
Thèse dirigée par AURELIE MALZERT-FREON, Centre d'études et de recherches sur le médicament de normandie (Caen)



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Chimie



A Madame Karine Andrieux,

Professeur à l'Université Paris Descartes

A Monsieur Tristan Richard,

Professeur à l'Université de Bordeaux

A Monsieur Christophe Cullin,

Professeur à l'Université de Bordeaux

A Monsieur Marc Since,

Maître de conférence à l'Université de Caen Normandie

A Madame Aurélie Malzert-Freon,

Professeur à l'Université de Caen Normandie

Qui me font l'honneur de lire ce manuscrit,

Et de juger ces travaux,

En témoignage de ma profonde reconnaissance

REMERCIEMENTS

Je tenais tout d'abord à remercier le ministère pour l'allocation doctorale qui m'a permis d'effectuer cette thèse. Je remercie également toutes les institutions qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse : l'Ecole Doctorale Normande de Chimie et l'entreprise Lipoid.

Je tiens également à remercier le professeur Patrick Dallemagne, directeur du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, de m'avoir accueilli au sein de l'unité pour que je puisse réaliser mon doctorat.

Aurélie et Marc, merci pour ces 3 années passées à mes côtés à m'encadrer, me guider et m'assister pour le déroulement de cette thèse. Je ne suis pas le roi de l'expressivité alors cette section remerciement sera probablement le meilleur moyen pour moi de vous exprimer mon infinie reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi. Vous avez fait tout ce qui était en votre pouvoir pour que je puisse évoluer dans le meilleur cadre et les meilleures conditions possibles, vous vous êtes adaptés à ma personnalité et à ma façon de fonctionner afin de me permettre de progresser, et ce, à tous les niveaux. Toujours disponibles, toujours là pour m'aider à aller de l'avant et à s'inquiéter de mon bien-être, vous avez largement dépassé vos fonctions d'encadrants et si aujourd'hui j'ai évolué par rapport à mon arrivée il y a 3 ans de cela, ce n'est pas uniquement parce que j'ai vieilli mais parce que vous avez été là. J'ai conscience de la chance que j'ai eu d'avoir un tel duo pour me suivre durant ces 3 années et je ne peux vous souhaiter que de bonnes choses pour la suite. Merci à vous deux.

Sophie, mon fournisseur normand de menthe agréé. Tu as contribué à part entière au déroulement de cette thèse et je tenais à te remercier spécialement pour ça. Merci de m'avoir permis de sous-louer ta paillasse durant ces 3 années, cette place centrale au sein du laboratoire qui a rendu ma vie laborantine si fabuleuse, car sans elle, l'utilisation d'un fauteuil à roulette deviendrait totalement fade. Merci pour tout le temps que tu as pu consacrer à m'aider et merci pour les précieux conseils que tu as pu m'apporter pendant ces 3 années. Je te souhaite le meilleur pour la suite, enfin je vous souhaite le meilleur à toi, Marc et Gabin.

Line, je suis vraiment désolé mais je dois commencer par te rappeler que tu me dois toujours un cassoulet préparé dans les règles de l'art. A part ce léger petit détail, ne change rien ! Tu as toujours été là, souriante, prête à cacher des bonbons pour éviter les vols en série et à faire de ton mieux pour me supporter. Je n'ai aucun doute quant à la réussite de ta thèse et pour ton avenir professionnel. Bonne chance pour la suite et longue vie au mamie style.

Anne-Claire, merci pour ta présence, tes conseils, tes dolipranes et la monnaie que tu as pu me fournir au cours de ces 3 années. Toujours disponible lorsqu'on a besoin de toi, j'espère que tu garderas précieusement ce mug qui fait partie de mes plus grands accomplissements au sein du laboratoire. Bonne continuation à toi, Rémy et Pierre.

Audrey, merci pour ton aide et ta bonne humeur durant ces 3 années. Je ne viendrai plus empiéter sur tes plannings de spectro, c'est promis. Encore désolé d'avoir sacrifié tes solutions salines, j'ai fait de gros progrès vis-à-vis de ma maniaquerie pour le ménage. Merci et bonne continuation pour la suite.

Christophe, tout d'abord merci d'avoir accepté d'être mon enseignant référent pour cette thèse. Merci pour ton suivi, tes conseils et ton aide apportée depuis Bordeaux. Mon intérêt pour les sciences existe à ce jour en grande partie parce que j'ai eu la chance de travailler avec toi. Je te souhaite le meilleur pour la suite et merci pour tout.

Sophie (de Bordeaux cette fois), merci également pour ton aide, tes conseils et ton accompagnement depuis Bordeaux. Je profite également pour remercier les autres membres de ton équipe qui m'ont toujours accueilli comme si je n'étais jamais parti (Isabel, Christelle, Sabine) mais aussi Sarah et ceux qui ne sont plus là. Merci pour tout.

Cédric, Cécé, que dire à part vive le sport et vive mpg ! Merci de m'avoir montré les joies de la chimie avec cette petite purification. Merci pour les excursions boulangerie et les discussions philosophiques profondes avec Rémy et JP dans votre bureau. On se revoit au temple ! Je crois que Mr Cazarre nous attend. Et courage, la ligue 2 ce n'est pas si mal.

Rémy, merci de m'avoir aidé à apprivoiser Top Spin et les secrets de la RMN. Ta bonne humeur et ta passion pour la chasse d'animaux virtuels resteront un souvenir marquant.

Jean-Pierre, merci pour ton aide, tes conseils et bien évidemment pour ton MR. Toujours de bonne humeur et disponible pour m'aider. Tout cela sans compter la petite réserve de fruits secs.

Sylvia, merci pour ton aide et ta gentillesse durant ces 3 années. Merci également de m'avoir si souvent laissé louer ta hotte et plus important, merci pour les bonbons.

Victor, mister babin ! Merci de m'avoir fait connaître mpg, ça a changé ma vie. Et surtout merci pour les incroyables découvertes vidéoludiques, musicales et pour m'avoir fait bénéficier de ton statut de célébrité locale dans les restaurants populaires où l'on sert des mets sans prétention.

Johanna, merci pour ton aide et ce précieux partage de connaissances scientifiques. La découverte des mails programmés c'est vraiment quelque chose. Mot de fin : « ah ! ».

Merci à toi Peggy de m'avoir aiguillé au sein de cette gigantesque chimiothèque et d'avoir permis que ma première inondation ne vire pas au cauchemar.

Merci à Julien, Sylvain, Michael et autres membres du Cimap. Qui m'ont si souvent accueilli et m'ont permis de m'adonner aux joies de la physique et du traitement du signal. Merci également à Didier qui m'a permis de voir à des échelles inaccessibles avec l'œil humain. Merci à Romuald d'avoir hébergé mes échantillons qui ont laissé 5 étoiles dans les avis. Merci à Arnaud de m'avoir assisté pour le bon déroulement des travaux pratiques.

Merci à tous ceux qui m'ont accueilli à mon arrivée en Normandie, FX, Camille, Clémence, Martina, Marie, Charline, Bérénice, Sangeetha, Bogdan, Yohann, Alexandra, Windbedema, Julien, Jean-Philippe, Florian et à ceux qui sont arrivés en cours d'aventure, Clément, Caroline, Pauline, Reynald, Benjamin, Mirjana, Meziane, Gonzalo, Amanda et pardon à ceux que j'oublie.

Merci aux membres du CERMN pour leur gentillesse et leur accueil, Alban, Jean-François 1, Jean-François 2, Stéphane, Jana, Ronan, Valérie, Christophe, Thomas, Christine, Anne-Sophie, Colette, Fred, Xiao et Michèle. J'espère que je n'oublie personne.

Mention spéciale au mini club Fifa, Mohammed, Abdallah, Etienne, Thomas et Youcef. Toujours un plaisir d'aller provoquer des rage quit en ligne. Et merci à Thomas et Etienne pour ces longs vendredis après-midi musicaux à manipuler dans la bonne humeur.

Merci à la confrérie pour ces moments de partage et de festivité qui m'auront permis de décompresser lorsque c'était nécessaire. Merci à Mehdi (fabuleuse victoire au Barberousse), Julien, Clément, Rebecca, Ghita, Titom, Quentin, Lionel, Stéphane, Ludovic, Piky, Micka, Benny, Roméo, Yann, Momo, Mass, Cynthia, Aurélia, Lilian, Luc, Mahiedine, Aminn, Clément, Mélanie, Célia et tous les autres pour leur soutien.

Je ne pourrais pas finir sans remercier ma famille. Mes parents et ma sœur qui m'ont toujours soutenu et sont les meilleurs au monde. Sans eux je ne serais rien et je saurais jamais leur exprimer à quel point ils sont importants à mes yeux. Si j'en suis là aujourd'hui c'est essentiellement grâce à vous et tout ce que je réussis dans la vie c'est parce que vous êtes toujours derrière moi pour me soutenir. Merci pour tout.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	5
RESUME.....	7
ABSTRACT	8
LISTE DES TABLES	9
LISTE DES FIGURES	9
ABREVIATIONS	11
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
1. LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	15
1.1 Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer.....	15
1.2 Enjeux socio-économiques.....	16
1.3 Un enjeu scientifique majeur.....	17
1.3.1 Historique : De la découverte à l'établissement des premiers biomarqueurs	17
1.3.2 Influence de la politique	19
1.4 Sémiologie et diagnostic de la maladie d'Alzheimer.....	20
1.5 Formes et facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer.....	21
1.5.1 Forme familiale	21
1.5.2 Forme sporadique	21
1.5.3 Facteurs de risque.....	21
1.6 Biomarqueurs	22
1.7 Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.....	23
1.7.1 Hypothèse cholinergique	23
1.7.2 Hypothèse de la protéine Tau	23
1.7.3 Hypothèse de la cascade amyloïde	24
1.8 Essais thérapeutiques en cours	26
2. LE PEPTIDE AMYLOÏDE β	27
2.1 Généralités sur les amyloïdes	27

2.2 De la protéine précurseur de l'amyloïde au peptide amyloïde β	28
2.3 Du peptide amyloïde β aux plaques amyloïdes	31
2.4 Les espèces oligomériques du peptide A β	36
2.5 Le peptide A β et les lipides	37
3. LES LIPOSOMES.....	40
3.1 Définition	40
3.2 Composition des liposomes.....	41
3.2.1 Les phospholipides	41
3.2.2 Les stérols.....	44
3.3 Principales techniques de préparation	45
3.3.1 Méthode de réhydratation de film lipidique	45
3.3.2 La méthode de congélation-décongélation (Freeze-thaw method)	46
3.4 Propriétés.....	47
3.4.1 Propriétés physico-chimiques	47
3.4.2 Propriétés liées à la conservation des liposomes.....	48
3.4.3 Propriétés liées à l'usage pharmacocinétique.....	48
3.5 Applications	48
3.6 Les liposomes comme outil de screening pour le Drug Design : application au projet de thèse.....	49
3.6.1 Utilisation des liposomes pour déterminer la lipophilie des composés	50
3.6.2 Détermination du coefficient de partage par la technique de chromatographie artificielle de membrane immobilisée (IAM).....	52
3.6.3 Utilisation des liposomes pour étudier la toxicité membranaire et/ou l'activité pharmacologique de composés.....	53
3.6.4 Utilisation des liposomes comme outil de Drug Discovery : application au sujet de thèse.....	55
3.6.7 Principes et méthodes employées.....	59
II. RESULTATS - DISCUSSION.....	71

1. INTERACTIONS MOLECULES/MEMBRANES	71
2. INTERACTIONS A β /MEMBRANES	99
3. INTERACTIONS MOLECULES/A β /MEMBRANES	127
4. DISCUSSION GENERALE	223
4.1 Objectif 1 : Etude des interactions molécules/membranes.....	223
4.2 Objectif 2 : Etude des interactions peptide A β /membranes	227
4.2.1 Approches méthodologiques	227
4.2.2 Résultats et perspectives.....	232
4.3 Objectif 3 : Etude des interactions molécules/A β /membranes.....	233
4.3.1 Prise en considération de quelques limites des méthodologies utilisées.....	233
4.3.2 Résultats et perspectives.....	236
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	243
IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	247

AVANT-PROPOS

Le Centre d'Études et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN) est un laboratoire de drug design fondé en 1974 par le Professeur Max Robba à Caen en Normandie. Le drug design est la conception raisonnée d'un principe actif (PA), il définit l'ensemble des processus mis en place afin d'élaborer ce nouveau PA. Ces processus sont répartis en quatre phases : la phase de recherche, la phase de développement, la phase clinique et la phase de mise sur le marché. Les activités du CERMN s'inscrivent dans la 1ère phase du cycle de vie d'un médicament. Les thématiques de recherche s'organisent autour des neurosciences avec l'élaboration de molécules d'intérêt diagnostique et thérapeutique dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (MA), ainsi que dans le domaine de la cancérologie avec la conception de perturbateurs des interactions protéine-protéine.

Le laboratoire est composé de 4 plateformes : chémoinformatique, chimie médicinale et organique, une chimiothèque et une plateforme de screening et drugabilité. Les activités de synthèse s'appuient sur des travaux de modélisation menés en chémoinformatique. Les molécules sont ensuite synthétisées par la plateforme de chimie médicinale et organique puis sont enregistrées en chimiothèque où elles sont mises à disposition afin d'être valorisées. Finalement elles sont caractérisées au sein de la plateforme screening et drugabilité, c'est au sein de cette dernière que les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés.

Afin d'identifier les hits puis les leads ; les molécules synthétisées au sein du laboratoire font l'objet de tests pour déterminer leurs activités biologiques mais aussi leurs propriétés physico-chimiques. Elles peuvent aussi faire l'objet de formulations galéniques afin d'améliorer la biodistribution de certains composés. Un des axes de recherche concernant la MA est l'étude des interactions entre des petites molécules et le peptide amyloïde- β ($A\beta$). Ce peptide est historiquement l'une des premières cibles d'intérêt thérapeutique identifiées.

En effet, lors du développement de cette pathologie, l'assemblage du peptide $A\beta$ en fibres, notamment la forme $A\beta_{1-42}$, est au cœur d'une cascade d'événements moléculaires pouvant provoquer la mort neuronale. La toxicité des amyloïdes est corrélée à l'existence de diverses structures intermédiaires qui se forment durant l'agrégation du peptide en fibres. Ces plaques sont impliquées dans la formation de dépôts dans le cerveau des patients atteints de la MA. Même si les mécanismes menant à cette agrégation ne sont pas encore tous connus à ce jour, les enjeux sociaux et économiques mondiaux sont tels que la MA présente des défis capitaux pour découvrir, concevoir et développer des molécules à visée thérapeutique.

L'agrégation du peptide A β est notamment influencée par une interaction spécifique avec les membranes. Toutefois, l'ensemble de ces données n'est pas systématiquement pris en compte par les équipes de chimistes médicaux dans l'évaluation et le développement des molécules d'intérêt. Il serait néanmoins nécessaire de coupler les différentes informations mécanistiques pour faciliter l'identification de hits, voire de leads d'intérêt. Pour cela, la plateforme Screening & Drugabilité a décidé de mettre en place un test multiparamétrique simple qui permettra d'obtenir de façon précoce des données sur les interactions entre le peptide et les molécules en absence et en présence de mêmes de membranes biologiques.

Des liposomes utilisés en tant que membranes biomimétiques ont donc été proposés comme plateformes de caractérisation de nouveaux composés d'intérêt thérapeutique pour la MA.

Co-dirigée et co-encadrée par le Professeur Aurélie Malzert-Fréon et le Docteur Marc Since, cette thèse a pour but de présenter les liposomes comme nouvel outil pouvant contribuer au screening de molécules à un niveau précoce du drug discovery.

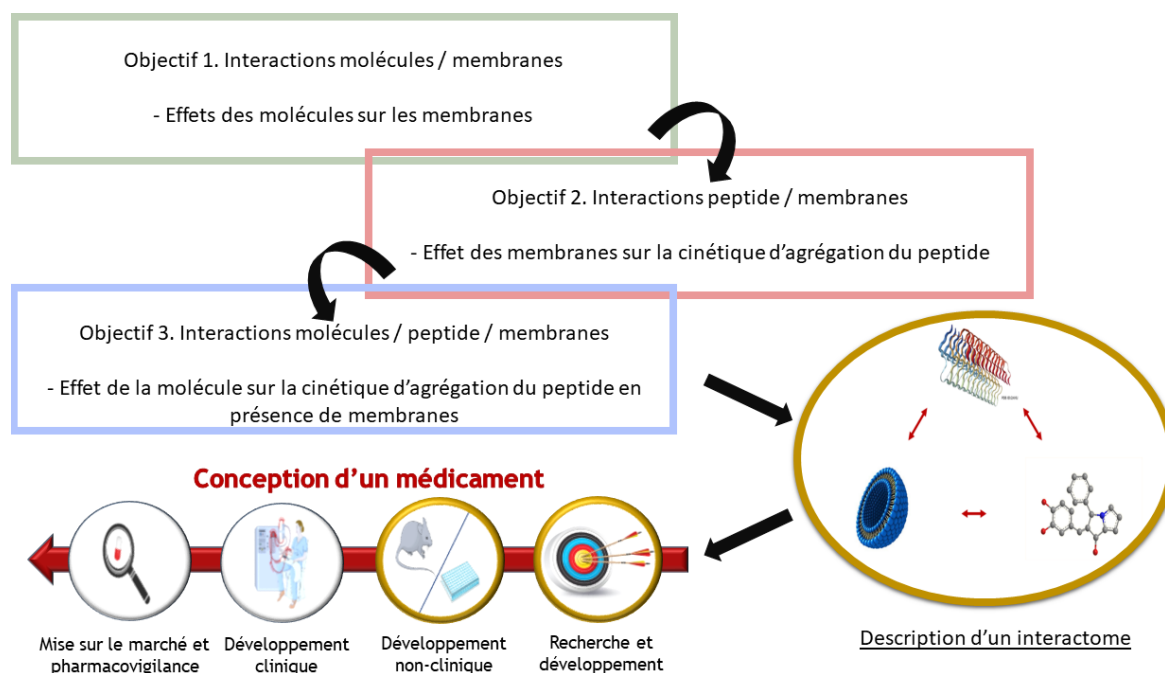


Figure 1. Projet de thèse

Les données bibliographiques concernant la MA représentent un axe vaste au niveau de la recherche avec environ 104000 articles recensés à propos de la MA, 35000 articles sur le peptide A β et 56000 articles à propos des liposomes (données PubMed). Ce manuscrit aura donc pour objectif de présenter les aspects majeurs de cette maladie et du peptide comme champs d'application du sujet de thèse.

RESUME

L'étude des interactions moléculaires au niveau des membranes biologiques est un enjeu capital pour le développement et le screening de nouvelles molécules médicamenteuses. La MA est la forme de démence sénile la plus répandue dans le monde et représente le principal problème socioéconomique en matière de soins de santé. L'apparition et la progression de cette maladie neurodégénérative sont associées à l'agrégation du peptide A β . Une stratégie thérapeutique contre la MA consiste à développer des molécules capables d'interférer à des étapes spécifiques de l'agrégation du peptide. Pour les identifier, des méthodes expérimentales sont nécessaires pour suivre et caractériser le peptide A β au cours de son processus de fibrillation. Ces méthodes doivent être suffisamment simples pour rester compatibles avec une démarche de drug discovery. Dans le présent travail de thèse, nous avons proposé de combiner des méthodes expérimentales pour permettre une caractérisation multiparamétrique de modulateurs potentiels de la fibrillation du peptide A β_{1-42} , en y intégrant des liposomes de composition définie, comme membranes neuronales biomimétiques. Il est en effet établi que les lipides neuronaux sont un facteur important dans la formation des fibres amyloïdes et leur toxicité. Les liposomes ont été formulés par la méthode de réhydratation de film lipidique, et leurs propriétés physico-chimiques caractérisées par RMN, DLS, potentiel ζ . La détermination expérimentale du coefficient de partage de composés d'intérêt a pu être réalisée par spectrophotométrie, y compris de façon originale, par fluorescence, en utilisant ces liposomes, dans des tests miniaturisés. Des études cinétiques de l'agrégation du peptide A β_{1-42} ont été effectuées en présence de liposomes. La fluorescence de la ThT a été mesurée pour suivre la voie de la fibrillation du peptide A β , utilisé dans sa forme sauvage ou celle d'un mutant oligomérique, l'oG37C. Une analyse de fuite d'un fluorophore à partir des liposomes, appuyée par des mesures en DLS, a été réalisée afin d'évaluer l'impact des interactions entre le peptide et les membranes pour prévoir tout effet de déstabilisation. Les fibres toxiques formées par A β étant principalement organisées en feuillets β , les données ont été corrélées à l'analyse de la structure secondaire du peptide par spectroscopie ATR-FTIR. Après avoir mis en œuvre cette approche sur différentes molécules modèles et un hit d'intérêt potentiel dans le traitement de la MA, l'ensemble de ce travail a abouti à un test multiparamétrique permettant la caractérisation de l'interactome molécules/A β /membranes et la discrimination de modulateurs de l'agrégation du peptide A β_{1-42} . Cette approche pourra être avantageusement transposée à d'autres maladies amyloïdes.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, peptide amyloïde bêta, liposomes, drug discovery

ABSTRACT

The study of molecular interactions at the level of biological membranes is a key issue for the screening and the development of new drugs. Alzheimer's disease (AD) is the most common form of senile dementia in the world and is the leading socio-economic problem in health care. The appearance and progression of this neurodegenerative disease are associated with the aggregation of the amyloid- β peptide ($A\beta$). A therapeutic strategy against AD consists in the development of molecules able to interfere with specific steps of $A\beta$ aggregation. To identify such compounds, experimental methods are required to monitor and characterize the $A\beta$ peptide during its fibrillation process. These methods must be simple enough to remain compatible with drug discovery.

In this PhD project, we have proposed to combine experimental methods to allow a multiparametric characterization of potential $A\beta_{1-42}$ fibrillation modulators, by integrating liposomes of defined composition as biomimetic neuronal membranes. It is indeed established that neuronal lipids are an important factor in the formation of amyloid fibers and their toxicity. The liposomes were formulated by the lipid film rehydration method, and their physicochemical properties characterized by NMR, DLS, ζ potential. The experimental determination of the compounds partition coefficient could be carried out by spectrophotometry, including in an original way, by fluorescence, these liposomes, in miniaturized tests. Kinetic studies of $A\beta_{1-42}$ peptide aggregation were performed in the presence of liposomes. The ThT fluorescence was monitored to follow the $A\beta$ peptide fibrillation pathway, used in its wild form or with an oligomeric mutant, oG37C.

A fluorophore leakage analysis from liposomes, supported by DLS measurements, was performed to evaluate the impact of peptide/membranes interactions to predict any destabilization effects. The toxic fibers formed by $A\beta$ being mainly organized in β sheets, the data were correlated with the analysis of the peptide secondary structure by ATR-FTIR spectroscopy. After the implementation of this approach on different model molecules and a hit of potential interest in the AD treatment, all of this work has resulted in a multiparametric test allowing the molecules/ $A\beta$ /membranes interactome characterization and the discrimination of $A\beta_{1-42}$ peptide aggregation modulators. This approach may be advantageously transposed to other amyloid diseases.

Key words : Alzheimer's disease, amyloid beta peptide, liposomes, drug discovery

LISTE DES TABLES

Tableau 1. Echelle de détérioration globale de Reisberg

Tableau 2. Principaux biomarqueurs de la MA

Tableau 3. Conformations secondaires des peptides et protéines en ATR-FTIR

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Projet de thèse

Figure 2. Evolution de la MA au niveau mondial

Figure 3. Processus de formation des dégénérescences neurofibrillaires

Figure 4. Hypothèse de la cascade amyloïde

Figure 5. Composés participants aux essais cliniques de la MA au 12 février 2019

Figure 6. Illustration des caractéristiques communes des amyloïdes : exemple du fibrinogène

Figure 7. Représentation de l'organisation structurale des amyloïdes

Figure 8. Clivage de l'APP par les sécrétases

Figure 9. Clivage de l'APP par MT5-MMP

Figure 10. Effets physiologiques et pathologiques liés au peptide A β

Figure 11. Séquence du peptide A β

Figure 12. Représentation schématique du processus d'agrégation de protéines amyloïdes

Figure 13. Représentation de la nucléation des amyloïdes

Figure 14. Nucléation primaire et secondaire

Figure 15. Structuration du peptide A β

Figure 16. Hiérarchisation du peptide A β

Figure 17. Processus d'agrégation du peptide A β : *on-pathway* vs *off-pathway*

Figure 18. Structure du ganglioside GM1

Figure 19. Représentation d'un phospholipide

Figure 20. Classification des liposomes

Figure 21. Structure des glycérophospholipides

Figure 22. Représentation des différents états physiques adoptés par une bicouche lipidique en phase aqueuse

Figure 23. Représentation des différentes organisations possibles des phospholipides

Figure 24. Structure du cholestérol. Disposition du cholestérol au sein des membranes

Figure 25. Représentation de la méthode de Bangham

Figure 26. Représentation de la dynamique des lipides

Figure 27. Processus de conception d'un médicament

Figure 28. Sélection d'un outil de mesure de la lipophilie

Figure 29. Représentation schématique de la voie des antibiotiques

Figure 30. Représentation du processus d'agrégation amyloïde et des interactions avec la membrane

Figure 31. Schéma de principe de lecture d'un échantillon en spectroscopie UV-visible

Figure 32. Représentation du diagramme de Jablonski

Figure 33. Principe du *Liposome Leakage Assay*

Figure 34. Polarisation de la lumière et photosélectivité

Figure 35. Principe de l'ATR-FTIR

Figure 36. Détermination de la taille par diffusion dynamique de la lumière

Figure 37. Représentation graphique du potentiel ξ

Figure 38. Fichier de calcul des concentrations lipidiques après dosage RMN

Figure 39. Suivi cinétique de l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$

Figure 40. Spectre ATR-FTIR du signal brut de l'oG37C avec des liposomes et le blanc correspondant

Figure 41. Spectres d'absorption des molécules

Figure 42. LUVs PCG₂₂₆ en coloration négative

ABBREVIATIONS

sAPP : *Secreted Amyloid Protein Precursor*

A β : Amyloïde β

ApoE : Apolipoprotéine E

AA : *Alzheimer's Association*

ADMET : Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination, Toxicité

AICD : *Amyloid Protein Precursor Intracellular Domain*

APP : *Amyloid Protein Precursor*

ATR-FTIR : *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform InfraRed*

CERMN : Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie

CF : Carboxyfluoresceine

CIM : Classification statistique Internationale des Maladies

CPP : *Critical Packing Parameter*

CTF : *C-Terminal Fragment*

DLS : *Dynamic Light Scattering*

DMPC : 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DPH : 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene

DPPC : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DPPG : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

DSM : Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux

EHPAD : Etablissement d'Hébergement pour Personnes Agées Dépendantes.

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

FDA : *Food and Drug Administration*

FTIR : *Fourier Transform InfraRed*

GUV : *Giant Unilamellar Vesicle*

IAM : *Immobilized Artificial Membrane*

ILC : *Immobilized liposome chromatography*

ISO : *International Organization for Standardization*

IWG : *International Working Group*

LLA : *Liposome Leakage Assay*

LUV : *Large Unilamellar Vesicle*

MA : Maladie d'Alzheimer

MLV : *MultiLamellar Vesicle*
MMSE : *Mini Mental State Examination*
MND : Maladies NeuroDégénératives
MT5-MMP : *Membrane-Type 5-Matrix MetalloProteinase*
MTDL : *MultiTarget-Directed Ligand*
MVV : *MultiVesicular Vesicle*
NIA : *National Institute on Aging*
OLV : *OligoLamellar Vesicle*
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PiB : Pittsburgh composé B
PA : Principe Actif
PdI : *Polydispersity Index*
PC : Phosphatidylcholine
PSEN : Préséniline
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SUV : *Small Unilamellar Vesicle*
TAU : *Tubule Associated Unit*
THT : Thioflavine T
TMA-DPH : N,N,N-Trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl)phenylammonium p
toluenesulfonate
TMSP : l'acide 2,2-diméthyl-2-silapentan-5-oïque

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LA MALADIE D'ALZHEIMER

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la démence est un syndrome, généralement chronique ou évolutif, dans lequel on observe une altération de la fonction cognitive (capacité d'effectuer des opérations de pensée), plus importante que celle que l'on pourrait attendre du vieillissement normal. Elle affecte la mémoire, le raisonnement, l'orientation, la compréhension, le calcul, la capacité d'apprentissage, le langage et le jugement. La maladie d'Alzheimer (MA) est la démence la plus connue à ce jour. C'est une pathologie neurodégénérative complexe qui entraîne une perte neuronale et un dysfonctionnement des connexions entre les neurones. Le développement de cette maladie se fait par étapes et peut varier considérablement d'un individu à un autre. Pour décrire ce développement, 7 stades ont été décrits par le docteur Barry Reisberg en 1982, chef de clinique de la *New York University School of Medicine's Silberstein Aging and Dementia Research Center*.

Stade 1	Aucun symptôme
Stade 2	Symptômes légers (perte de mémoire récente, difficulté à prendre des décisions) sans déclin mesurable aux tests neuropsychologiques
Stade 3	Symptômes légers avec déclin mesurable aux tests neuropsychologiques, mais sans entrave importante aux activités de tous les jours
Stade 4	Démence légère (capacité de conduire une automobile à condition d'être accompagné)
Stade 5	Démence modérée (choix des vêtements fait par une autre personne ; déplacements effectués à pied dans des endroits familiers seulement ; gestion des finances personnelles effectuée par une autre personne)
Stade 6	Démence sévère (doit être lavé et habillé par une autre personne ; ne peut rester seul)
Stade 7	Démence très sévère à terminale (incapacité de marcher de façon sécuritaire ; difficulté à avaler)

Tableau 1. Echelle de détérioration globale de Reisberg¹

1.1 Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer

Durant ces dernières décennies, les avancées scientifiques ont permis à l'homme d'améliorer ses conditions de vie et donc par la même occasion son espérance de vie. De ce fait, la part de personnes âgées dans les populations augmente et avec elle la nécessité d'approfondir la compréhension et de mieux lutter contre l'impact des maladies associées au vieillissement.

I-1. LA MALADIE D'ALZHEIMER

De nos jours la MA reste la plus fréquente des maladies neurodégénératives dans le monde. En 2015, il était estimé que 900 000 personnes étaient atteintes de la MA en France et que ce nombre devrait atteindre les 1,3 million en 2020. Ces estimations pourraient être d'autant plus élevées qu'1 cas sur 3 serait diagnostiqué (<https://www.francealzheimer.org/>).

Plus récemment, selon le *World Alzheimer Report* de 2018, le nombre de personnes déclarées comme étant atteintes de démence pourrait tripler d'ici 2050 au vu de la croissance rapide du nombre de malades avec 1 nouveau cas toutes les 3 secondes (Figure 2).

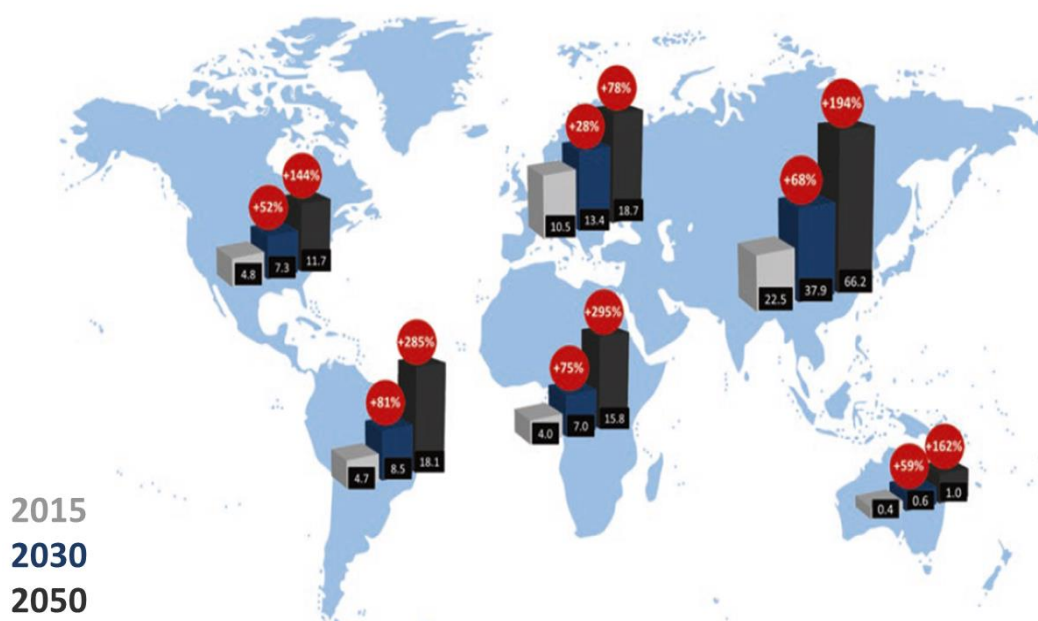


Figure 2. Evolution de la MA au niveau mondial²

Une telle progression à l'échelle mondiale ne représente pas uniquement un défi pour la recherche moderne mais également des enjeux socio-économiques.

1.2 Enjeux socio-économiques

L'augmentation de la part de personnes atteintes de la MA au sein de la population nécessite la prise en compte de nombreux facteurs allant au-delà de la nécessité de trouver des solutions thérapeutiques.

Les aspects sociaux et économiques font également partie notamment des préoccupations majeures. Par exemple, la détérioration progressive des capacités du malade est ressentie par les proches et le personnel aidant qui accompagnent au quotidien le patient.

Les conséquences peuvent également s'exprimer au point de vue relationnel chez les jeunes malades qui sont souvent amenés à abandonner leur activité professionnelle et à devenir dépendants de leur entourage : un exemple commun est celui des conjoints qui doivent adapter leur activité professionnelle (congés plus fréquents, passage à mi-temps, arrêt de l'activité professionnelle), ce qui peut mener à une désocialisation rapide.³

De nouvelles branches professionnelles ont également vu le jour afin d'améliorer la prise en charge et l'accompagnement des malades : coordinateurs, agents spécialisés en EHPAD ou encore les Alzamis (intervenant psycho-social, métier créé en Normandie).⁴

L'impact de la maladie se fait donc à plusieurs niveaux sociaux qu'ils soient relationnels, privés ou professionnels et doit être pris en compte avec l'augmentation attendue du nombre de malade dans les années à venir (Figure 2).

Les dépenses engendrées par la MA ne se limitent pas à la recherche ou aux soins directs des patients. En France, le coût de la prise en charge annuelle par les familles s'élève à environ 12 146 € par famille, les dépenses les plus importantes étant dues aux hospitalisations faisant suite aux complications telles que les chutes ou la malnutrition (<https://www.francealzheimer.org>). En 2016 les coûts médicaux et paramédicaux de la maladie étaient évalués à 5,3 milliards d'euros par an. A cela s'ajoutent les coûts de l'aide informelle estimé à 14 milliards d'euros par an et du médico-social estimé à 13 milliards d'euros par an pour un coût global estimé à 32 milliards d'euros. Les dépenses à la charge du patient sont également amenées à augmenter : en 2018, l'assurance-maladie a cessé de rembourser les traitements disponibles (Aricept[®], Ebixa[®], Exelon[®], Reminyl[®]) à cause du rapport bénéfice/risque trop peu élevé.⁵ A l'échelle mondiale les frais liés à la MA étaient estimés à 818 milliards de dollars US en 2015 (1.1% du PIB mondial) et devraient atteindre les 2 000 milliards de dollars US en 2030.⁶

1.3 Un enjeu scientifique majeur

1.3.1 Historique : De la découverte à l'établissement des premiers biomarqueurs

Introduit en 1984, le terme de « probable cas de maladie d'Alzheimer » désigne une démence amnésique, diagnostiquée cliniquement pour laquelle il n'existe aucune preuve d'une autre étiologie.⁷ Toutefois, il a fallu de nombreuses années et des avancées en matière de recherche scientifique afin que les symptômes cliniques déjà identifiés soient associés à un processus pathologique.

I-1. LA MALADIE D'ALZHEIMER

1901 : Admission d'une patiente de 51 ans, Auguste Deter, dans une institution pour malade mentaux et épileptiques en Allemagne. Elle fut examinée par un jeune neurologue allemand du nom d'Alois Alzheimer et fut considérée comme un cas de démence présénile du fait de son jeune âge, inhabituel pour des symptômes de démence.

1906 : Le docteur Alois Alzheimer constate une grande atrophie du cortex cérébral sur une coupe du cerveau de la patiente décédée et révèle au microscope la présence des plaques amyloïdes et des enchevêtrements neurofibrillaires.⁸

1910 : Emil Krapelin, ancien patron d'Alois Alzheimer, propose le terme de « maladie d'Alzheimer » et inclut la description du cas d'Auguste Deter dans la huitième édition de son livre intitulé *Psychiatrie*.

1978 : Le *National Institute on Aging* (NIA), l'*Alzheimer's Association* (AA) et Pfizer s'associent afin de lancer le premier essai clinique d'une molécule visant à traiter les symptômes de la MA.

1984 : Identification du peptide amyloïde β comme composant des plaques amyloïdes par George Glenner et Cai'ne Wong.⁹

1986 : Identification de la protéine Tau comme composant principal des enchevêtrements neurofibrillaires.^{10,11}

1987 : Identification du premier gène associé aux formes rares et héréditaires de la maladie d'Alzheimer. Ce gène situé sur le chromosome 21 code la protéine précurseur de l'amyloïde (APP).¹²

1993 : Identification du premier gène qui augmente le risque de développer la MA : ApoE-E4, une forme du gène de l'apolipoprotéine-E (ApoE) sur le chromosome 19.¹³

La *Food & Drug Administration* (FDA) approuve le premier médicament contre la maladie d'Alzheimer, Cognex[®] (à base de Tacrine).

1995 : Premier modèle de souris transgénique à avoir développé une pathologie cérébrale de type Alzheimer.¹⁴

1999 : Essais de vaccinations sur la souris → l'injection du peptide A β à des souris transgéniques empêche les animaux de développer des plaques et d'autres modifications cérébrales analogues à celles d'Alzheimer.¹⁵

2004 : Premier rapport public sur un agent d'imagerie appelé Pittsburgh composé B (PiB), une avancée potentielle majeure dans la surveillance et la détection précoce de la maladie.¹⁶

2013 : Collaboration internationale révèle 11 variations génétiques associées à un risque accru de développer la MA.¹⁷

2019 : Mise en place d'un test de dépistage sanguin par la start-up Alzohis, le Nora test, basé sur la détection de l'adrénaline, la noradrénaline et la dopamine (<https://www.alzohis.com/fr/>).

1.3.2 Influence de la politique

Un siècle après sa découverte, la MA représente un axe majeur de la recherche médicale et paramédicale. Cela n'a pourtant pas toujours été le cas. En effet, plusieurs décennies après les travaux d'Alois Alzheimer les symptômes connus étaient associés au processus de vieillissement normal. Toutefois des avancées technologiques comme l'invention du microscope électronique (Max Knoll, Ernst Ruska – 1931) et politiques (1994 : Ronald Reagan, ancien président des Etats-Unis annonce qu'il est atteint de la MA) ont contribué à une prise de conscience générale permettant à la MA de devenir une préoccupation socio-économique majeure.

En France, cette prise de conscience se traduit au travers de programmes politiques tels que le « Plan Alzheimer 2008-2012 »¹⁸ faisant suite à la requalification de la MA en tant que grande cause nationale en 2007. Ce plan a notamment contribué au développement des établissements et services médico-sociaux et a été suivi par le « Plan Maladies Neurodégénératives 2014-2019 »¹⁹ qui inclut en plus de la MA, d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson.

A l'échelle mondiale, une initiative commune a été décidée par le sommet du G8 qui a eu lieu en 2013 au Royaume-Uni pour lutter contre la MA et trouver un traitement curatif d'ici 2025. Ces différents projets se traduisent notamment par des investissements financiers : 470 millions d'euro pour le Plan MND 2014-2019 ou encore l'augmentation des fonds dédiés à la recherche contre la MA.

Au-delà de l'investissement des fonds pour la recherche ou encore l'accompagnement des malades (structures, aidants, soins), ce type de projet permet aussi d'améliorer le diagnostic de la MA qui même de nos jours, reste compliqué du fait de l'étroite frontière entre le vieillissement normal et les symptômes de la MA.²⁰

1.4 Sémiologie et diagnostic de la maladie d'Alzheimer

La MA est aussi appelée maladie des 4A, car elle se traduit cliniquement par une Amnésie (troubles de la mémoire), une Aphasie (troubles du langage), une Agnosie (déficit de la capacité de reconnaissance des personnes ou des objets) et une Apraxie (incapacité à effectuer des gestes).

Les symptômes de la MA apparaissent de façon progressive et s'amplifient avec l'évolution des sept stades de l'échelle de Reisberg (Tableau 1). Toutefois, des variations sont observées d'un individu à autre,²¹ ce qui, ajouté au fait que ces symptômes peuvent être confondus avec le vieillissement normal ou encore d'autres maladies ou démences apparentées, rend le diagnostic de cette maladie complexe. Avant 2007, le diagnostic de certitude était effectué en post-mortem par le biais de l'étude anatomo-pathologique du cerveau. Grâce aux progrès de la recherche, il est désormais possible d'effectuer un diagnostic plus précoce de la MA. Celui-ci se fait notamment en suivant les indications de manuels de références comme le *Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux* (DSM-V) ou la *Classification statistique internationale des maladies et des problèmes de santé connexes* (CIM-10) de l'OMS.

Le diagnostic de la MA peut être séparé en 2 grandes étapes, la première consistant à effectuer un bilan neurologique chez le patient en utilisant des questionnaires tels que le *Mini Mental State Examination* (MMSE). Dans un second temps, des analyses biologiques sont réalisées (imagerie, dosage de biomarqueurs) afin de trouver des signes spécifiques de la maladie.

1.5 Formes et facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer

A ce jour, 2 formes de la MA sont identifiées, une forme familiale et une forme sporadique. Toutefois certains chercheurs pensent qu'il pourrait exister d'autres formes ou sous-formes de la MA,²² ce qui pourrait notamment contribuer à la complexité vis-à-vis de la compréhension ou de la mise en place d'un traitement efficace contre cette maladie.

1.5.1 Forme familiale

La forme familiale est héréditaire, génétique et obéit aux lois de Mendel²³ (mode autosomique dominant).

L'apparition précoce (<60 ans) de la maladie chez certaines familles a notamment permis aux chercheurs de connecter les mutations des gènes codant pour la Protéine Précurseur de l'Amyloïde (APP)²⁴ et les Présénilines 1 et 2 (PSEN1²⁵, PSEN2²⁶) avec le peptide A β trouvé dans les plaques séniles des cerveaux des victimes de la MA. A travers ces mutations génétiques, plusieurs diagnostics (forme préclinique, typique ou atypique de la MA)²⁷ peuvent être établis selon les critères de l'*International Working Group* (IWG-2).

1.5.2 Forme sporadique

La forme sporadique est la forme la plus courante puisqu'elle représente plus de 90% des cas, elle est principalement due au vieillissement. Celle-ci se manifeste donc plus tardivement (>60 ans) et son occurrence peut dépendre de prédispositions génétiques (altération d'un allèle codant pour l'apolipoprotéine E²⁸, ou altération de mécanismes épigénétiques^{29,30}) mais également de facteurs de risque liés à l'environnement et au mode de vie.

1.5.3 Facteurs de risque

Afin d'identifier les causes de la MA, des études ont été menées sur les facteurs influant sur le risque de développer la maladie chez un individu. Ces études ont permis d'identifier différents facteurs de risque autres que les facteurs génétiques abordés dans les chapitres précédents.

Les facteurs non-génétiques peuvent être liés au mode de vie : alcoolémie, tabagisme, manque d'exercice physique mais aussi intellectuel ou encore l'alimentation.^{31,32} L'existence d'autres pathologies est également considérée comme étant un facteur de risque, notamment dans le cas de maladies cardiovasculaires³³ et de diabète.³⁴

1.6 Biomarqueurs

Une étape clé pour le diagnostic, la compréhension des mécanismes mais aussi la mise en place d'un traitement pour la MA est l'identification de biomarqueurs. Les principaux biomarqueurs utilisés de nos jours sont associés à des techniques d'imagerie comme la Tomographie par Emission de Positons (PiB)¹⁶ ou par dosage dans le liquide cérébro-spinal (dosage du peptide A β par test ELISA ou par spectrométrie de masse).³⁵

Le tableau suivant issu de Tammarn, L. *et al.* (2018)³⁶ permet d'avoir une vue d'ensemble des biomarqueurs connus en fonction du processus pathologique pouvant être associé à la MA.

Pathology	Biomarkers		
	CSF	Blood	Brain scan
A β pathology	<ul style="list-style-type: none"> Aβ42 (ELISA, MS) 	<ul style="list-style-type: none"> Aβ42 (Simoa, MS) Pancreatic polypeptide Y IgM Chemokine ligand 13 Interleukin 17 Vascular adhesion protein 1 α2 macroglobulin Apolipoprotein A1 	<ul style="list-style-type: none"> Amyloid PET
Tau pathology	<ul style="list-style-type: none"> P-tau (ELISA, MS) 	<ul style="list-style-type: none"> None 	<ul style="list-style-type: none"> ¹⁸F-AV1451
Axonal degeneration	<ul style="list-style-type: none"> T-tau (ELISA) Neurofilament light (ELISA) 	<ul style="list-style-type: none"> T-tau (Simoa) Neurofilament light (Simoa) 	<ul style="list-style-type: none"> MRI
Synaptic degeneration	<ul style="list-style-type: none"> Neurogranin SNAP25 RAB3A 	<ul style="list-style-type: none"> None 	<ul style="list-style-type: none"> SV2A (¹¹C-UCB-J) FDG
Glial activation	<ul style="list-style-type: none"> Secreted ectodomain TREM2 Chitotriosidase CD14 YKL-40 CCL2 	<ul style="list-style-type: none"> YKL-40 	<ul style="list-style-type: none"> TSPO ¹¹C-R-PK11195 ¹⁸F-DPA-714 ¹¹C-PBR28
TDP43 pathology	<ul style="list-style-type: none"> None 	<ul style="list-style-type: none"> None 	<ul style="list-style-type: none"> None
α -Synuclein pathology	<ul style="list-style-type: none"> α-Synuclein 	<ul style="list-style-type: none"> None 	<ul style="list-style-type: none"> ¹⁸F-BF-227

Tableau 2. Principaux biomarqueurs de la MA³⁶

L'identification de biomarqueurs spécifiques et précoces de la MA reste un axe majeur de la recherche pour deux principales raisons :

- clinique : les signes cliniques de la MA apparaissent tardivement dans l'histoire naturelle de la maladie et l'échec des thérapies existantes ou potentielles est souvent attribué au retard d'inclusion des patients dans les protocoles de traitement.^{37,38}
- physiopathologique : identifier des biomarqueurs spécifiques permettra de mieux comprendre les mécanismes menant aux symptômes cliniques et d'identifier et mieux appréhender d'éventuelles nouvelles cibles thérapeutiques.

1.7 Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

Les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires sont considérées comme étant les lésions les plus spécifiques associés à la MA.³⁹ Toutefois, il est désormais acquis que la MA est une maladie à l'étiologie complexe et différents processus physiopathologiques ont été proposés. Le stress oxydant, l'inflammation, le dysfonctionnement mitochondrial, des troubles du métabolisme des lipides, la perte fonctionnelle des synapses, le déséquilibre métallique et la diminution de l'acétylcholine font notamment partie des processus connus et activement étudiés.⁴⁰⁻⁴² L'étiologie exacte de la MA reste difficile à définir car il est souvent difficile de savoir si les dérèglements physiopathologiques sont des causes ou des conséquences de la maladie. Des hypothèses ont donc été formulées afin d'orienter les axes de recherche thérapeutiques autour de la MA.

1.7.1 Hypothèse cholinergique

L'hypothèse cholinergique est l'une des plus anciennes théories causales de la MA. Elle a été mise en avant car des études ont montré que les cerveaux des patients atteints exprimaient des niveaux d'acétylcholine inférieurs à la normale, un neurotransmetteur impliqué dans la mémoire, l'apprentissage l'activité musculaire et les fonctions végétatives.^{43,44} Les traitements de la MA basés sur l'hypothèse cholinergique (Donépézil, Rivastigmine, Tacrine, etc.) sont des inhibiteurs de la cholinestérase, enzyme qui dégrade l'acétylcholine. Toutefois, des études sur le cerveau de patients atteints d'une déficience cognitive légère ou d'un stade précoce de la MA ont révélé que l'activité de la choline acétyltransférase et/ou de l'acétylcholinestérase n'étaient pas affectées, ce qui a amené certains chercheurs à contester la validité de l'hypothèse.⁴⁵

1.7.2 Hypothèse de la protéine Tau

Les dégénérescences neurofibrillaires sont des lésions intracellulaires majoritairement composées de la protéine Tau (famille des protéines associées aux microtubules). Cette protéine impliquée dans la stabilisation des microtubules est hyperphosphorylée ce qui entraîne son détachement des microtubules et son agrégation au niveau de la partie centrale des neurones (Figure 3).⁴⁶

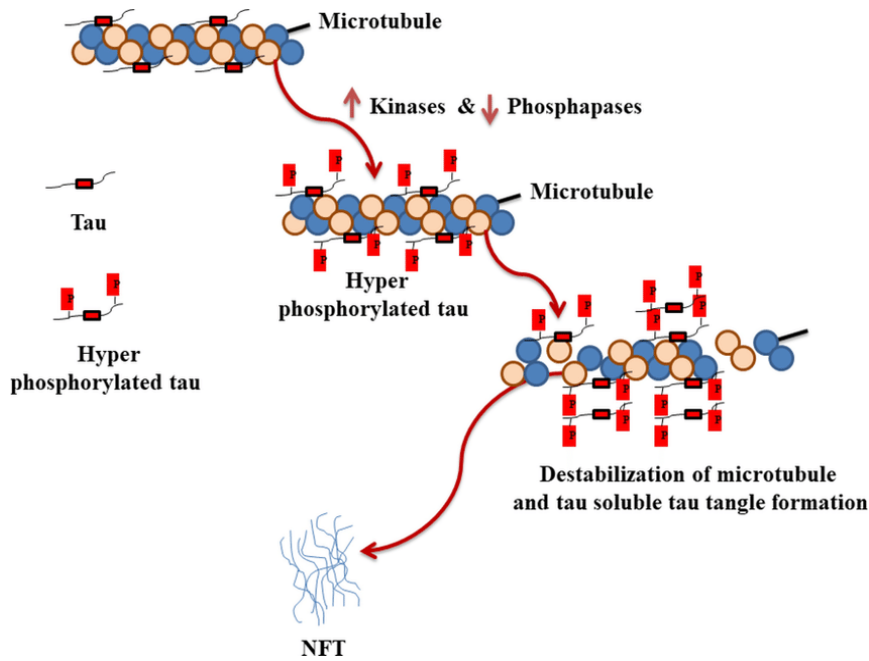


Figure 3. Processus de formation des dégénérescences neurofibrillaires⁴⁷

L'hypothèse que la protéine Tau soit directement impliquée la MA est appuyée par le fait que la pathologie de la protéine Tau est également mieux corrélée avec la progression et la sévérité de la maladie.⁴⁸ Les dégénérescences neurofibrillaires constituent les plaques insolubles intracellulaires de la MA par opposition aux plaques séniles qui sont extracellulaires et composées majoritairement du peptide A β .

1.7.3 Hypothèse de la cascade amyloïde

Selon l'hypothèse de la cascade amyloïde, c'est l'agrégation du peptide A β qui serait toxique pour les neurones. Initialement les fibres formées étaient désignées comme cause directe de la toxicité neuronale, mais il est maintenant admis que ce sont des espèces intermédiaires oligomériques qui sont toxiques pour les membranes des neurones (Figure 4). Cette hypothèse est notamment appuyée par de nombreux mécanismes sous-jacents, liés à l'agrégation du peptide : dérèglement de l'homéostasie calcique entraînant la mort par nécrose ou apoptose, une réaction inflammatoire concomitante mais aussi le déclenchement de la formation des enchevêtrements neurofibrillaires (Figure 4). Cette hypothèse est de nos jours très souvent discutée du fait de l'inefficacité des traitements basés sur cette approche.^{49,50}

Toutefois, cette hypothèse reste d'actualité car elle reste la source de nombreuses approches thérapeutiques, le questionnement étant d'avantage dirigé sur l'application des potentiels traitements issus de ces projets de recherche et sur la complexité du processus amyloïde.

I-1. LA MALADIE D'ALZHEIMER

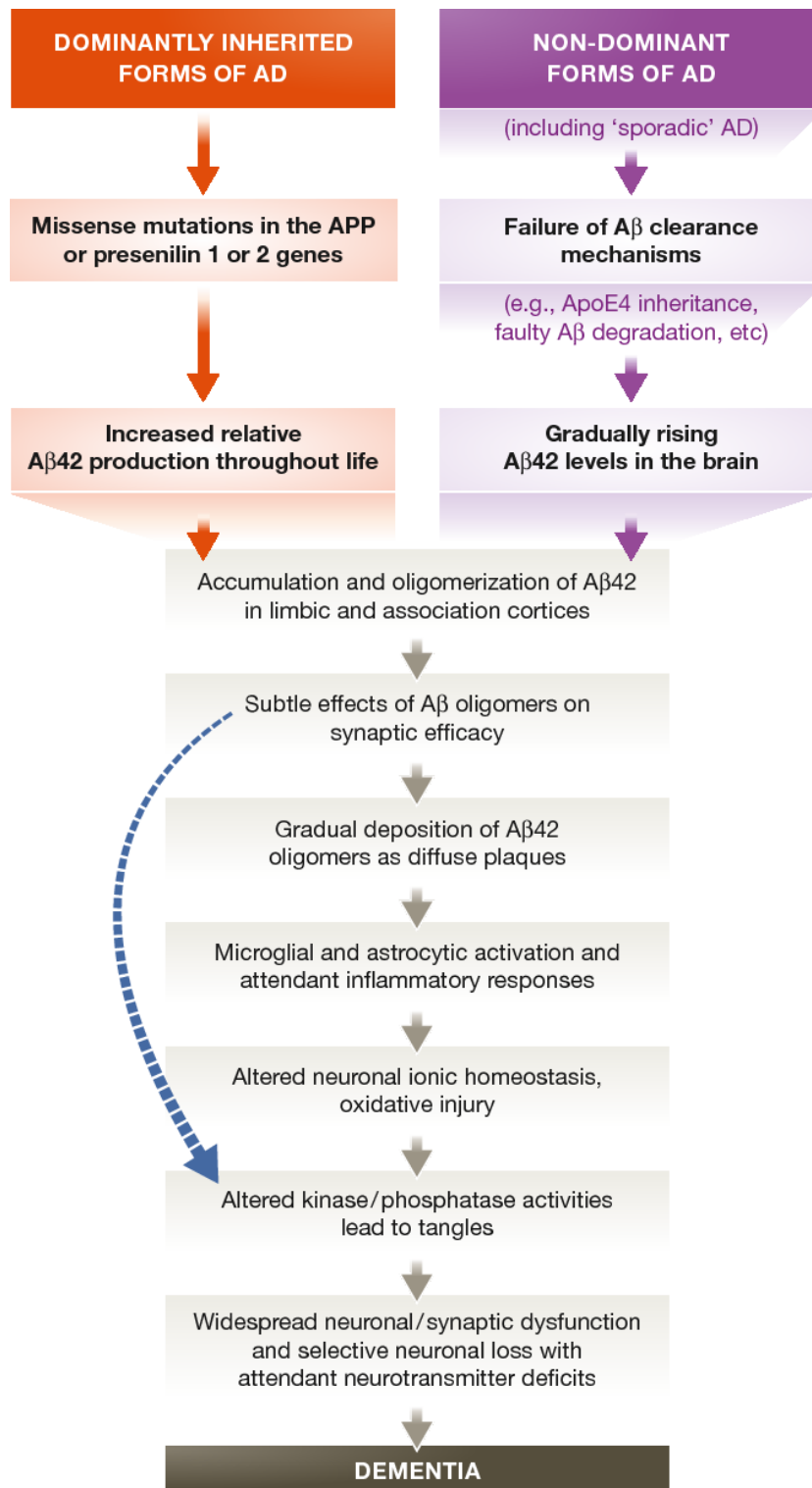


Figure 4. Hypothèse de la cascade amyloïde⁵¹

1.8 Essais thérapeutiques en cours

A ce jour, la MA ne bénéficie pas de traitement étiologique, les quatre traitements existant sont symptomatiques. Le Donépézil (Aricept®), la Rivastigmine (Exelon®) et la Galantamine (Reminyl®) agissent sur l'acétylcholine et la Mémantine (Exiba®) agit sur le glutamate. Depuis 2003, aucun nouveau traitement n'a été développé, toutefois de nombreux essais cliniques sont actuellement en cours (Figure 5).

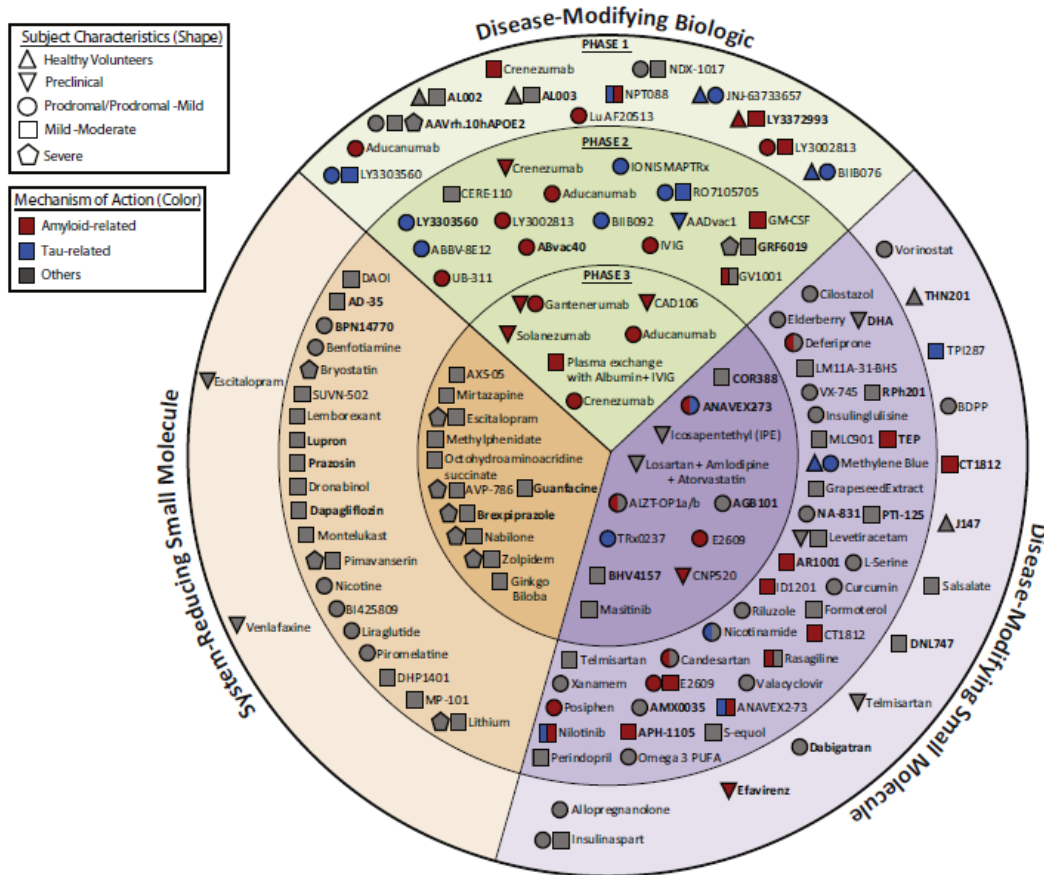


Figure 5. Composés participants aux essais cliniques de la MA au 12 février 2019⁵²

Le pipeline 2019 des composés à visée thérapeutique de la MA montre que 132 agents sont actuellement en essais clinique aux États-Unis. Parmi ces composés, 96 agents (73%) sont des traitements étiologiques dont 17 ciblent la protéine Tau et 38 ciblent le peptide Aβ. Concernant le peptide Aβ, la nature des composés varie, on y retrouve 20 composés de nature biologique (anticorps) et 18 sont des petites molécules. Ce peptide, bien que représentant une des plus anciennes cibles de la MA reste donc à ce jour une cible de choix du point de vue thérapeutique. Par ailleurs, le GV-971, un médicament à cible multiple (antiagrégant, fonction cholinergiques, neuro-inflammation, mitochondrie) est en cours de développement final pour une commercialisation en Chine.⁵³

2. LE PEPTIDE AMYLOÏDE β

2.1 Généralités sur les amyloïdes

Les amyloïdes désignent un groupe de protéines et de peptides solubles ayant la capacité de s'agréger sous la forme de dépôts insolubles. La présence de tels dépôts au sein des tissus biologiques caractérise les maladies connues sous le nom d'amyloïdoses (ou amyloses). La symptomatologie de ces maladies dépend des organes et tissus atteints qui peuvent être variés : cœur, rein, foie, tube digestif, œil, nerfs périphériques ou encore le système nerveux central.

A ce jour, 36 protéines amyloïdes ont été recensées chez l'homme, certaines étant associées à des pathologies neurodégénératives, notamment la maladie de Parkinson et la MA.⁵⁴ Le terme amyloïde a été employé pour la première fois par le médecin Rudolf Virchow en 1854 après avoir utilisé de l'iode puis de l'acide sulfurique pour colorer des corps d'aspect macroscopique anormaux.⁵⁵ Cette coloration supposée révéler la présence d'amidon, poussa Virchow à employer le terme amyloïde : du grec *amylo* pour « amidon » et *-ïde* pour « semblable à ».

Les amyloïdes partagent des caractéristiques communes du point de vue morphologique et structural. Ils sont capables de fixer les mêmes colorants comme le rouge Congo (Figure 6.a), possèdent une structure secondaire majoritairement en feuillets- β , sont très résistants à la dégradation et possèdent la propriété de biréfringence de la lumière avec un aspect vert-pomme caractéristique en présence d'amyloïdes (Figure 6.b).

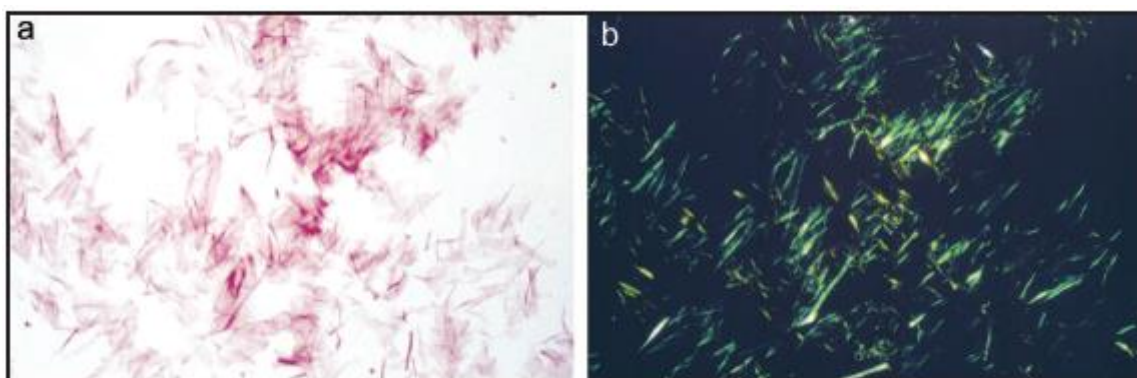


Figure 6. Illustration des caractéristiques communes des amyloïdes : exemple du fibrinogène (a) Visualisation en microscopie optique de la coloration au rouge Congo, (b) observation de la biréfringence vert-pomme en lumière polarisée.^{56,57}

La structuration majoritaire des amyloïdes est appelée structure cross- β , constituée de fibres d'environ 10 nm de diamètre de protéine non ramifiées, organisées en feuillets- β perpendiculaires à l'axe de la fibre (Figure 7).^{58,59}

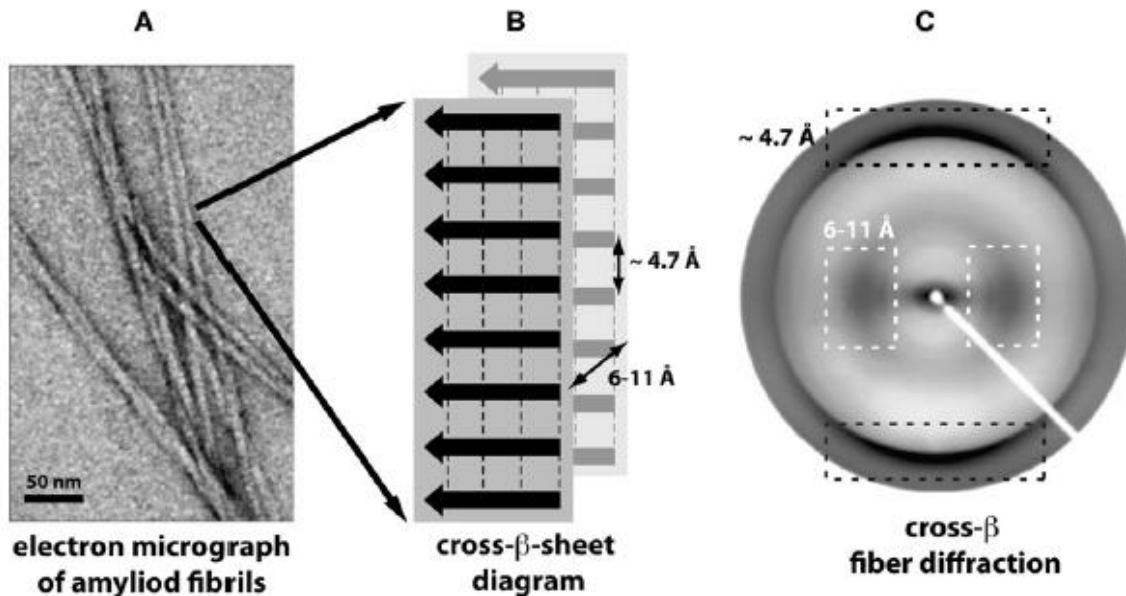


Figure 7. Représentation de l'organisation structurale des amyloïdes (a) Visualisation en microscopie électronique de fibres amyloïdes, (b) Représentation de l'arrangement des fibres en cross- β (liaisons H du squelette en pointillés), (c) Diagramme de diffraction typique des fibres amyloïdes.⁵⁹

2.2 De la protéine précurseur de l'amyloïde au peptide amyloïde β

Dans la MA, les plaques séniles constituant les lésions extraneuronales sont majoritairement composées du peptide A β . C'est un peptide qui provient du clivage séquentiel de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) par des enzymes.

L'APP est une protéine transmembranaire de type I : intégrée avec un seul domaine transmembranaire. Les fonctions de l'APP ne sont pas totalement connues à ce jour, mais les travaux menés dans cette optique soulignent particulièrement des fonctions synaptotrophes et neuroprotectrices.^{60,61} Allant de 695 à 770 acides aminés, elle est retrouvée exprimée dans tout le corps humain, mais majoritairement dans le cortex cérébral.

Au niveau du cortex, il existe une famille d'endonucléases, les sécrétases, qui réalisent des coupures sur des sites spécifiques de la séquence de l'APP. Ce clivage aboutit à la formation d'espèces différentes en fonction des voies empruntées.

Il existe deux voies majoritaires : la voie amyloïde et la voie non-amyloïde (Figure 8).

I-2. LE PEPTIDE AMYLOÏDE β

Dans la *voie non-amyloïde*, l'APP est d'abord clivée par une α -sécrétase pour donner un fragment soluble N-terminal (sAPP α) et un fragment C-terminal (CTF α) (Figure 8). Le fragment C-terminal est retenu dans la membrane où la γ -sécrétase agit pour donner un fragment N-terminal soluble (P3) et un fragment C-terminal lié à la membrane (AICD ou domaine intracellulaire de l'APP).

Dans la *voie amyloïde*, l'APP est d'abord clivée par une enzyme différente, la β -sécrétase, ce qui donne un fragment N-terminal soluble (sAPP β) et un fragment C-terminal lié à la membrane (CTF β). Le fragment C-terminal est retenu dans la membrane où la γ -sécrétase agit, donnant un fragment C-terminal lié à la membrane (AICD) identique à celui de la voie non-amyloïde, et un fragment soluble N-terminal : le peptide A β .⁶²

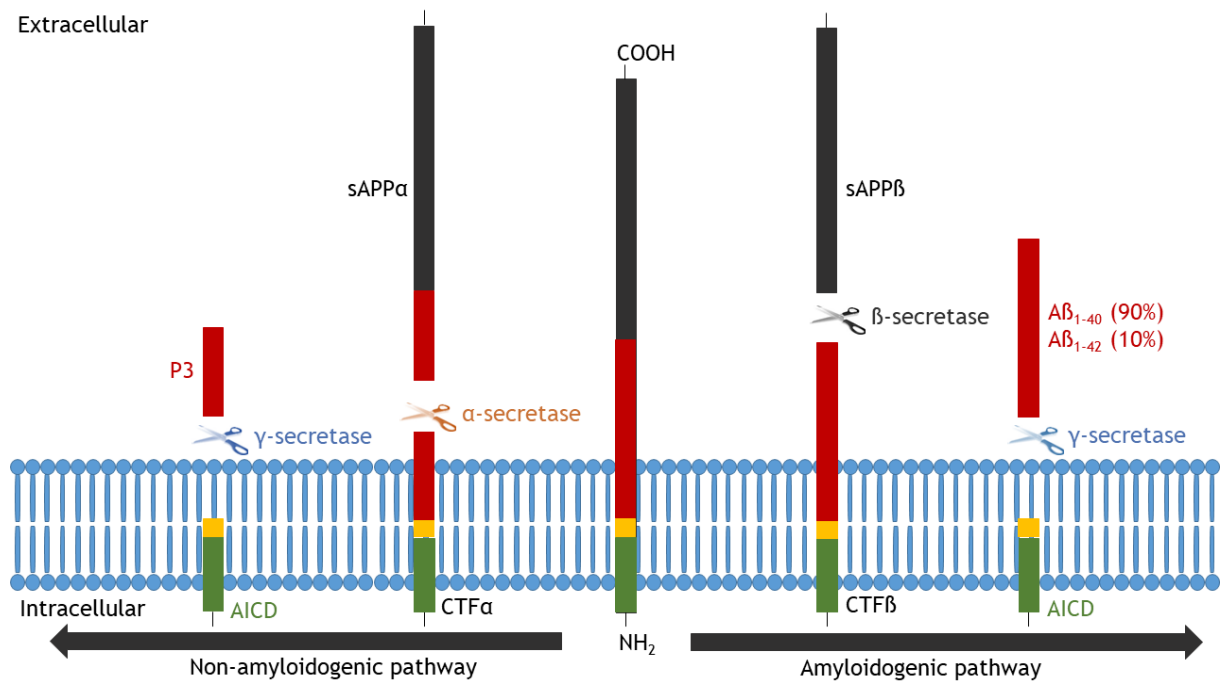


Figure 8. Clivage de l'APP par les sécrétases

Depuis 2015, la contribution de la protéase MT5-MMP dans le développement de la maladie d'Alzheimer sur le modèle de souris 5xFAD a été démontrée.^{63,64} Ce modèle exprime cinq mutations : les mutations Suédoise (K670N, M671L), Florida (I716V) et London (V717I) qui touchent l'APP et les mutations M146L et L286V qui touchent PSEN1.⁶⁵ Ces souris expriment de façon précoce et agressive des phénotypes associés à la MA, notamment une production accrue de plaques amyloïdes. La protéase MT5-MMP (η -sécrétase) peut cliver l'APP au niveau du site de clivage η , en amont du site de clivage de la β -sécrétase (Figure 9).

I-2. LE PEPTIDE AMYLOÏDE β

Par suite l'action de l' α -sécrétase ou de la β -sécrétase libère un fragment $A\beta$ allongé en N-terminal ($A\eta$ - α ou $A\eta$ - β) (Figure 9).⁶⁶ La découverte de cette voie apporte un nouvel axe de recherche pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques, mais aussi thérapeutiques. En effet, cette nouvelle voie constitue une nouvelle cible pour la recherche de composés pouvant interagir à ce niveau afin de voir quelles conséquences il pourrait y avoir vis-à-vis du développement de la MA.

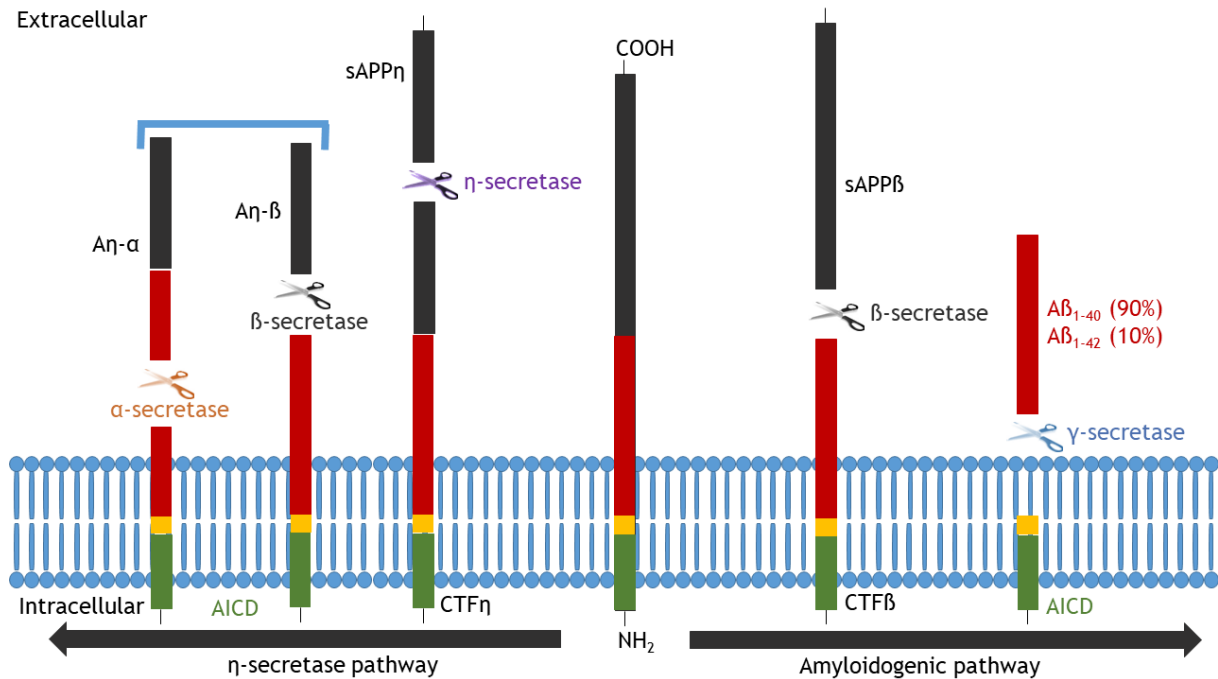


Figure 9. Clivage de l'APP par MT5-MMP

Il a été notamment démontré que lorsque l' $A\eta$ - α pouvait réduire la potentialisation des tranches d'hippocampe *ex vivo*.⁶⁷

Le peptide $A\beta$ est majoritairement produit sous la forme $A\beta_{1-40}$ dans les conditions physiologiques, toutefois, dans le cadre de la MA, le ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ est dérégulé amenant à une proportion beaucoup plus importante d' $A\beta_{1-42}$.⁶⁸ Les autres formes restent étudiées, notamment la forme $A\beta_{1-43}$ qui semble également avoir un rôle important, car avec la forme $A\beta_{1-42}$ elle est retrouvée au cœur des dépôts amyloïdes.⁶⁹ La forme $A\beta_{1-42}$ reste la forme prédominante de la MA, notamment en tant que composant majoritaire des plaques amyloïdes.

2.3 Du peptide amyloïde β aux plaques amyloïdes

Le peptide $A\beta$ est le marqueur le plus connu et le plus caractéristique de la MA. Sa taille peut varier de 39 à 43 acides aminés, mais les isoformes majoritaires sont $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$.

Tout d'abord considéré comme étant un peptide toxique, il est désormais accepté par la communauté scientifique que ce peptide possède des fonctions physiologiques. En effet, il a été suggéré qu'à faible concentration, $A\beta$ pourrait agir comme agent trophique et comme modulateur de l'activité synaptique.^{70,71} $A\beta$ pourrait également jouer le rôle d'antioxydant en raison de sa capacité à chélater les cations métalliques de cuivre fer et Zinc.^{72,73} De façon plus générale, il semblerait que les effets physiologiques et pathologiques du peptide soient directement opposés (Figure 10) et que le facteur principal soit l'augmentation de concentration en peptide qui elle-même serait due à un déséquilibre de la balance entre la production et la clairance du peptide dans le cadre de la MA.⁷⁴

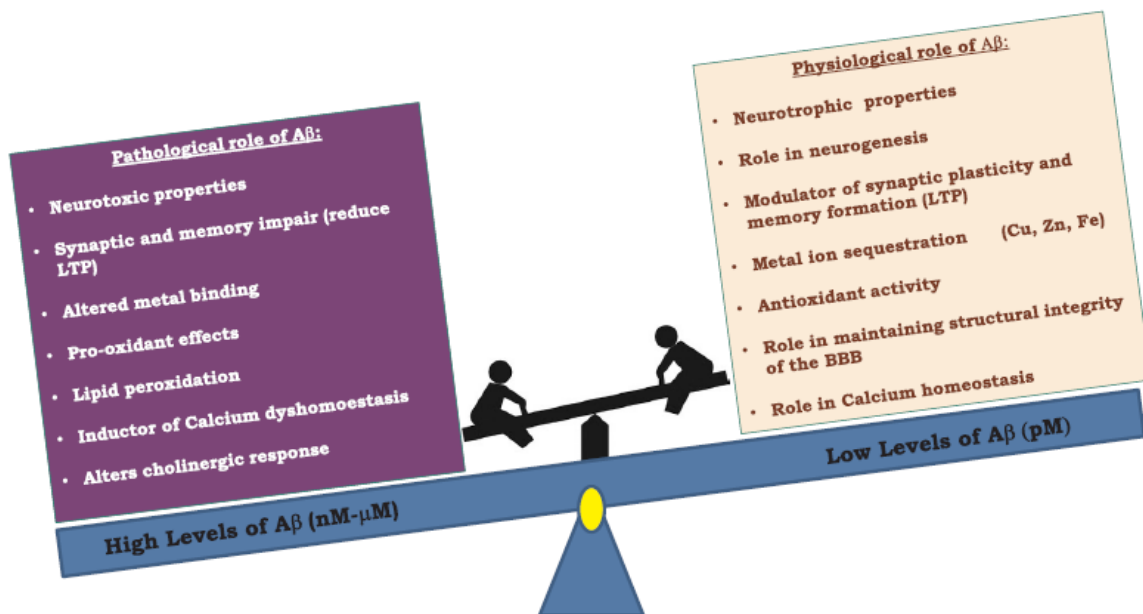


Figure 10. Effets physiologiques et pathologiques liés au peptide $A\beta$ ⁷⁵

Comme son nom l'indique le peptide $A\beta$ est un amyloïde, et du fait de son origine membranaire qui lui confère une grande hydrophobicité (Figure 11), il possède une grande propension à s'auto-agrégé.⁷⁶



Figure 11. Séquence du peptide A β

L'agrégation du peptide A β suit la cinétique classique des amyloïdes :

- une *phase de nucléation* où des noyaux se forment à partir d'espèces monomériques,
- une *phase d'élongation* avec formation d'espèces intermédiaires, notamment des espèces oligomériques,
- avant d'aboutir à la formation des *fibres amyloïdes* (Figure 12).

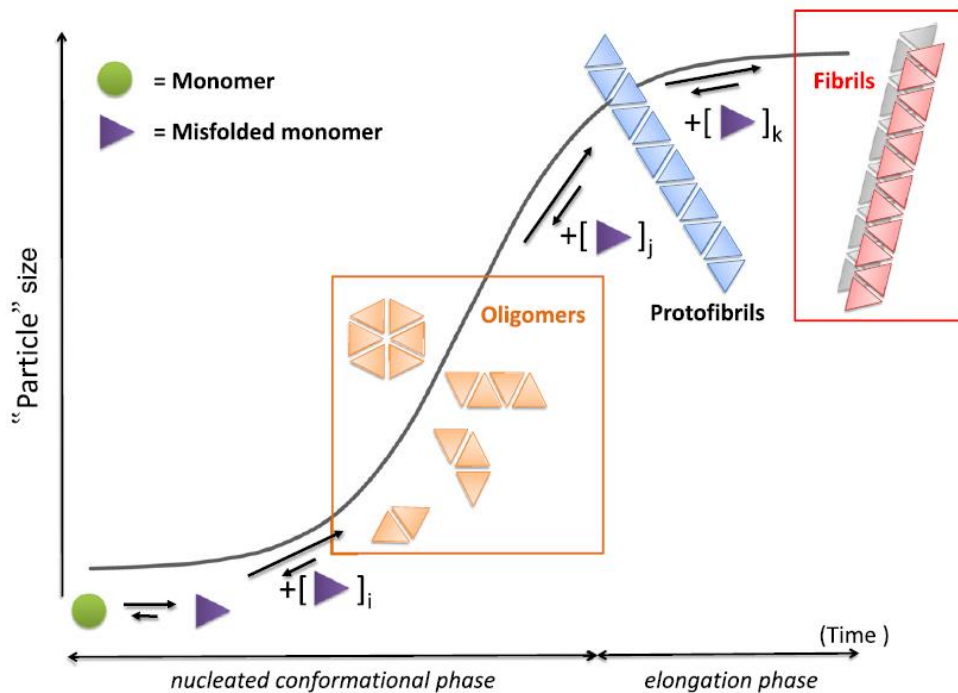


Figure 12. Représentation schématique du processus d'agrégation de protéines amyloïdes⁷⁷

La nucléation, également appelée phase de latence, étant thermodynamiquement défavorable, est considérée comme l'étape limitante de cette réaction.⁷⁸ Le processus de nucléation est décrit comme pouvant se faire en une ou plusieurs étapes. Dans le cas de la nucléation en une étape, l'évolution de la taille des agrégats et les changements structuraux se font en synergie.

I-2. LE PEPTIDE AMYLOÏDE β

En revanche, dans le cas de la nucléation en plusieurs étapes l'agrégation précède les modifications conformationnelles du peptide (Figure 13.a). Le niveau d'énergie de chaque espèce ainsi que la hauteur des barrières énergétiques sont provisoires et varient selon les conditions environnementales et propriétés physiques de la protéine (Figure 13.b).⁷⁹

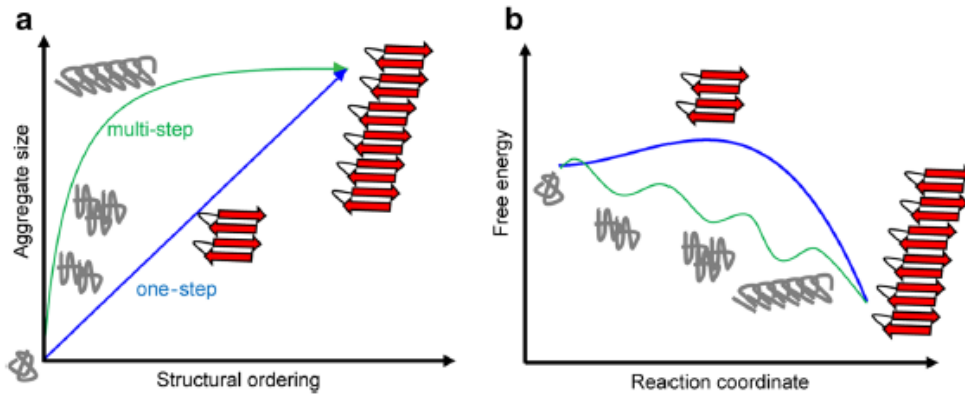


Figure 13. Représentation de la nucléation des amyloïdes⁷⁹

La complexité des mécanismes moléculaires de la nucléation se retrouve à un second niveau avec la notion de nucléation primaire et secondaire. La *nucléation dite primaire* est une réaction qui n'inclut que les monomères alors que pour la *nucléation secondaire* la formation de noyaux à partir de monomères est catalysée par des agrégats existants du peptide (Figure 14).

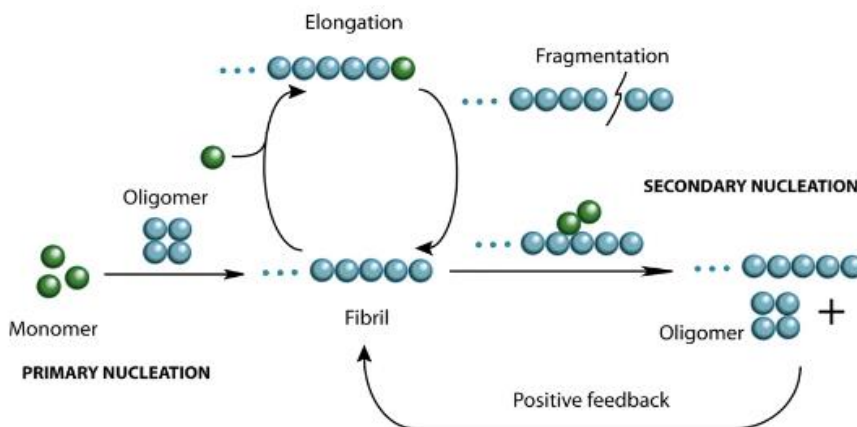


Figure 14. Nucléation primaire et secondaire⁸⁰

I-2. LE PEPTIDE AMYLOÏDE β

La nucléation secondaire semble jouer un rôle primordial dans la MA comme étant le principal processus contribuant à l'agrégation du peptide A β .^{81,82} En effet, la prolifération des agrégats dans la MA pourrait être liée à l'amplification autocatalytique due à la nucléation secondaire.⁸³ Des analyses de données expérimentales ont démontré que la nucléation primaire, la nucléation secondaire, l'élongation et la fragmentation influent fortement sur la durée de la phase de latence. L'élongation est une étape qui elle est thermodynamiquement favorable.⁸⁴

Etant un amyloïde, la signature caractéristique de l'agrégation du peptide A β est la conformation en feuillets β . Celle-ci a été résolue par de nombreuses techniques d'analyse structurale telles que le dichroïsme circulaire,⁸⁵ la microscopie,⁸⁶ la diffraction aux rayons X,⁸⁷ la résonance magnétique nucléaire⁸⁸ ou la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).⁷⁷ Cette structuration se fait notamment au niveau des zones hydrophobes centrales et C-terminales du peptide. Elles sont séparées par une boucle permettant le repliement et les interactions hydrophobes entre les chaînes latérales du peptide (Figure 15.a).⁸⁹

Le processus de structuration s'exécute par transition de la conformation hélice α vers les feuillets β : en effet, des études ont montré que le peptide adopte une conformation en hélice dans les solvants organiques et une conformation en feuillets dans les solvants aqueux.⁹⁰ Cette transition pourrait donc avoir lieu lorsque le peptide est libéré de la membrane après coupure par la γ -sécrétase, permettant le dépliement de la partie intramembranaire.

Les deux segments lipophiles peuvent alors interagir *via* les chaînes latérales des acides aminés former les feuillets β (Figure 15.b-c).⁹¹

I-2. LE PEPTIDE AMYLOÏDE β

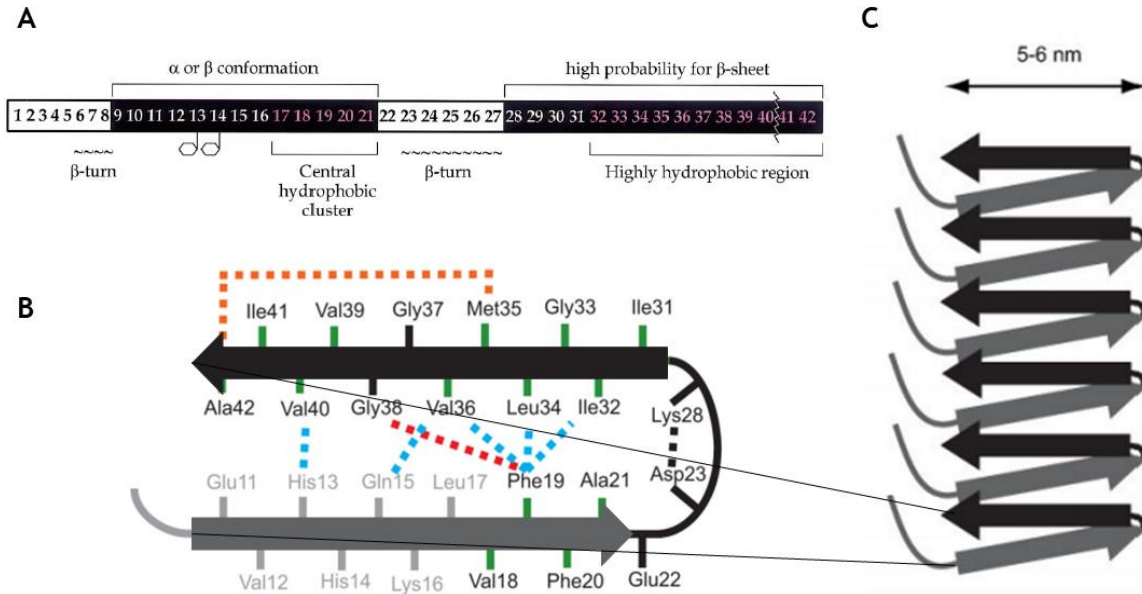


Figure 15. Structuration du peptide A β (modifié d'après Ahmed et al, 2010. et Serpell, 2000.)^{89,90}. (a) Prédiction de structure, 2 principaux groupes de résidus hydrophobes en violet, (b) Structure du peptide A β dans les fibrilles (c), interactions hydrophobes (pointillés bleus, rouges et oranges) et pont salin (pointillés noirs)

Les fibrilles structurées en feuillets β s'organisent pour former des fibres matures qui sont les composantes majeures des plaques séniles (Figure 16). Elles sont formées par un noyau dense d'espèces agrégées A β d'ordre supérieur et un halo périphérique de plus petites structures d'A β .⁹² Ces plaques ont longtemps été considérées comme étant la cause de la neurodégénérescence dans la MA, mais depuis de nombreuses années il est désormais accepté que ce sont des espèces intermédiaires qui sont responsables de la toxicité neuronale : les oligomères.^{93,94}

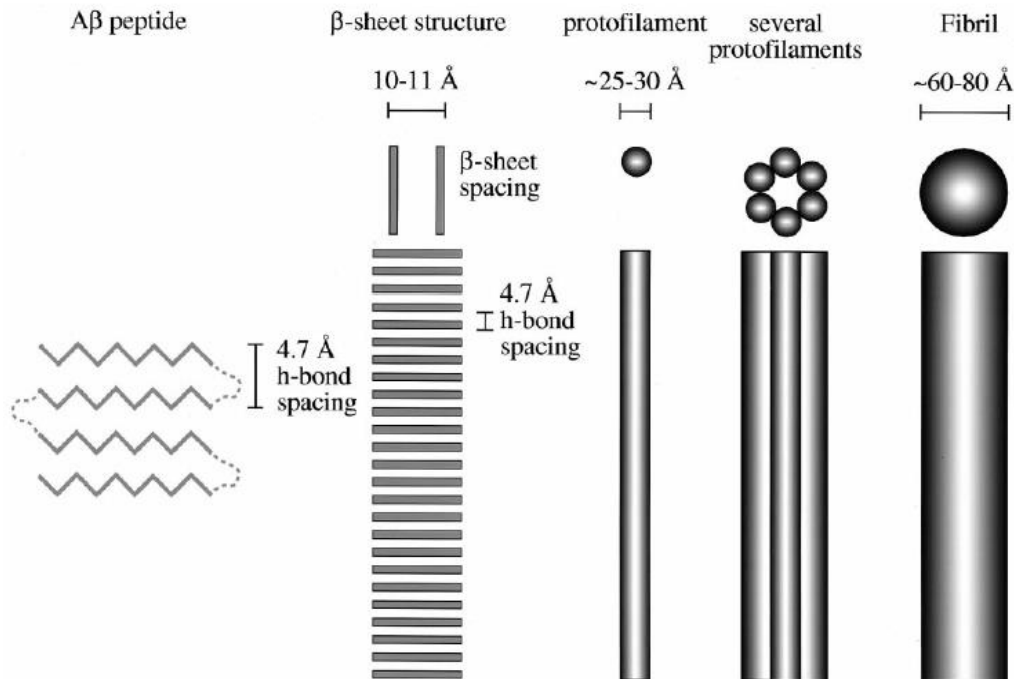


Figure 16. Hiérarchisation du peptide $A\beta^{90}$

2.4 Les espèces oligomériques du peptide $A\beta$

Les espèces oligomériques peuvent contenir de 2 à 28 monomères. Leur toxicité peut s'exprimer dès la forme dimérique pour laquelle il est possible d'observer des effets synaptotoxiques et des effets sur la dérégulation de la protéine Tau.⁹⁵⁻⁹⁷ La relation entre le peptide $A\beta$ et la protéine Tau a fait l'objet de nombreuses études qui mettent en évidence un lien entre l'accumulation du peptide $A\beta$ et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. De nombreux mécanismes sont proposés avec notamment l'activation de kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau suite à l'augmentation de l'influx calcique entraîné par la formation de pores par $A\beta$.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Les espèces oligomériques possèdent des propriétés telles que leur toxicité qui évoluent en fonction de leur niveau d'agrégation.¹⁰¹ En effet, il a été démontré que pour les dimères et trimères la structure secondaire était principalement désordonnée et que leur contenu en feuillets β augmentait avec l'augmentation de la taille de l'oligomère.¹⁰² Cette organisation est notamment spécifique car les oligomères adoptent tout particulièrement une organisation en feuillets β antiparallèles qui serait en partie à l'origine de leur toxicité membranaire.^{103,104} *In vitro*, des ratios $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ ont été comparés et l'inhibition de l'activité synaptique ainsi que l'atteinte de la viabilité neuronale ont été les plus fortes en présence d'espèces oligomériques stables.¹⁰⁵

I-2. LE PEPTIDE AMYLOÏDE β

Le mécanisme de formation des oligomères toxiques est une source de clivage scientifique entre deux hypothèses. La première est que les oligomères toxiques se forment lors du processus d'agrégation du peptide en suivant la voie classique des amyloïdes. Les oligomères toxiques seraient des espèces intermédiaires formées avant les protofibrilles : il s'agit de l'hypothèse de formation *on-pathway* (Figure 17). Ces oligomères passeraient par une conformation transitoire riche en feuillets β antiparallèles pour finalement former des fibres riches en feuillets β parallèles.⁷⁷ La seconde, plus souvent plébiscitée, est que les oligomères toxiques seraient des espèces formées par des voies alternatives ce qui mènerait à la formation de plusieurs types d'oligomères : il s'agit de l'hypothèse *off-pathway* (Figure 17). Les espèces intermédiaires se caractériseraient par un temps de demi-vie plus long faisant que la formation des fibres par ce processus serait plus lente.^{104,106-108}

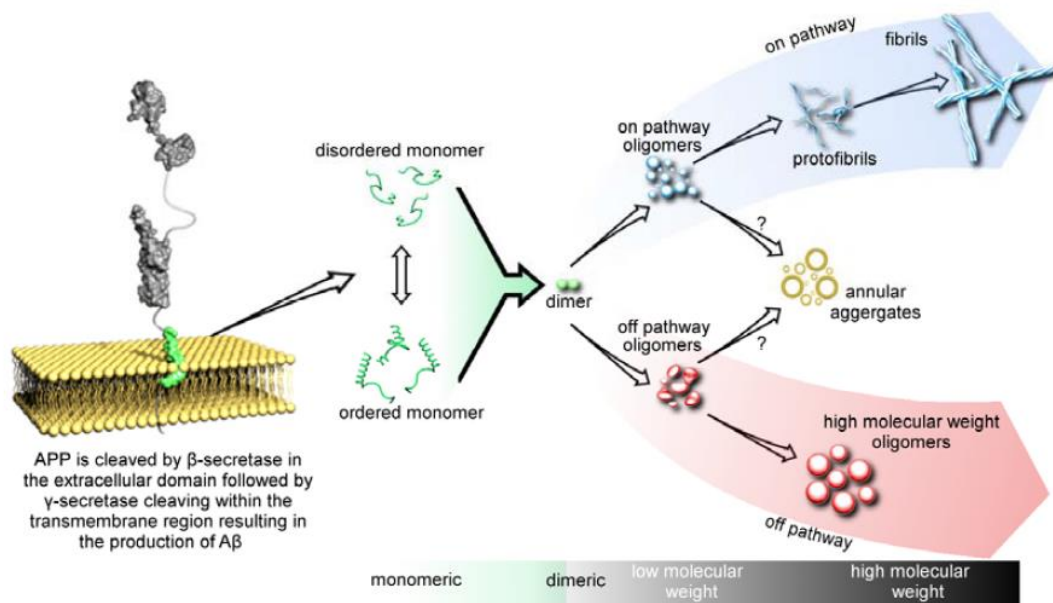


Figure 17. Processus d'agrégation du peptide A β : *on-pathway* Vs *off-pathway*¹⁰⁹

2.5 Le peptide A β et les lipides

Les différentes formes agrégées du peptide, notamment les oligomères, peuvent interagir avec certains microdomaines des membranes environnantes. Au niveau des neurones, le ganglioside GM1 a tout particulièrement été décrit comme étant affiné avec le peptide A β .¹¹⁰⁻¹¹³

I-2. LE PEPTIDE AMYLOÏDE β

Les gangliosides sont des glycosphingolipides composés d'un fragment d'acide sialique hydrophile exposé à l'environnement extérieur et d'un fragment de céramide incorporé à la membrane (Figure 18). Les gangliosides se trouvent majoritairement dans le système nerveux, en particulier le GM1.¹¹⁴

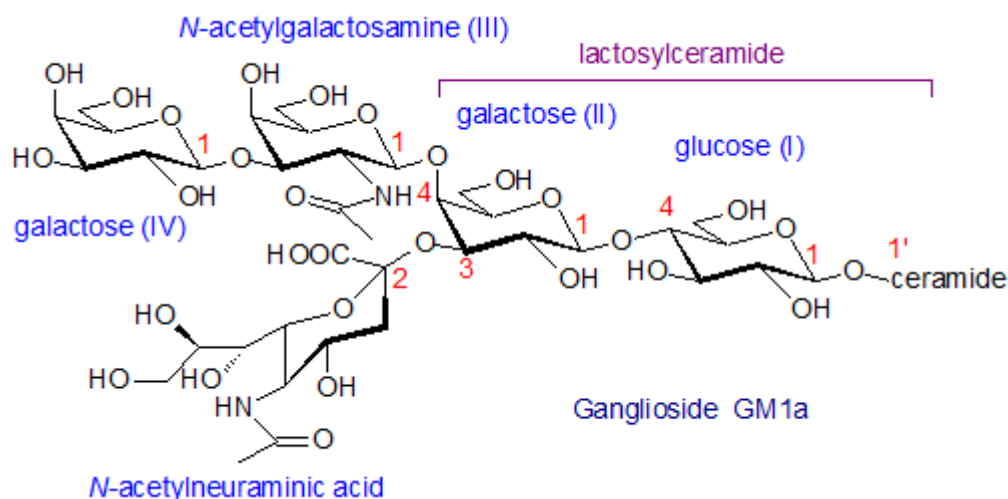


Figure 18. Structure du ganglioside GM1¹¹⁵

Des études ont montré que la quantité de gangliosides était augmentée dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de la MA mais qu'elle était réduite dans le tissu cérébral.^{116,117}

Des monomères d'A β liés au GM1 ont également été identifiés dans des fractions membranaires de cerveaux de MA.¹¹⁸ *In vitro*, l'agrégation du peptide est également modifiée en présence de GM1 avec une accélération du point de vue cinétique et une transition conformationnelle du random vers le feuillet β plus importante.¹¹⁹⁻¹²²

Le cholestérol a également été identifié comme étant un lipide d'intérêt pour la compréhension des mécanismes d'agrégation du peptide A β .^{112,123-125} Le peptide serait essentiellement produit à proximité des radeaux lipidiques^{126,127} zones membranaires enrichies en cholestérol mais également en sphingomyéline également connue pour interagir avec le peptide.¹¹⁰

A ce jour, le GM1, le cholestérol et la sphingomyéline sont les trois principaux lipides d'intérêt décrits comme pouvant agir avec A β . Toutefois, il se trouve que le peptide aurait également tendance à interagir avec les lipides anioniques tels que la phosphatidylsérine ou le phosphatidylglycérol.¹²⁸ Ces interactions entraînent dans la plupart des cas des modifications de la cinétique d'agrégation du peptide.¹²⁹ Les lipides zwitterioniques interagissent également avec le peptide.¹³⁰

I-2. LE PEPTIDE AMYLOÏDE β

Une des grandes difficultés à établir une banque de données comparables provient de l'hétérogénéité des échantillons utilisés. Par exemple, il est possible de trouver des études qui montrent que le peptide n'interagit pas avec les lipides anioniques.¹³¹

Les interactions du peptide avec les membranes dépendent du stade d'agrégation du peptide,¹³² et du fait des différents traitements proposés dans la littérature pour solubiliser et monomériser le peptide (NH₄OH, DMSO, HFIP) des résultats contradictoires peuvent être obtenus. Il est donc essentiel de travailler dans des conditions comparables lorsque des études sont menées sur ce peptide.

3. LES LIPOSOMES

3.1 Définition

Les liposomes sont des vésicules lipidiques artificielles dont la paroi est composée d'une à plusieurs bicouches, le plus souvent de nature phospholipidique avec un cœur aqueux. Les phospholipides étant amphiphiles avec une tête hydrophile et une queue hydrophobe (Figure 19), l'organisation la plus stable en milieu aqueux est une bicouche avec les têtes polaires au contact de l'eau.

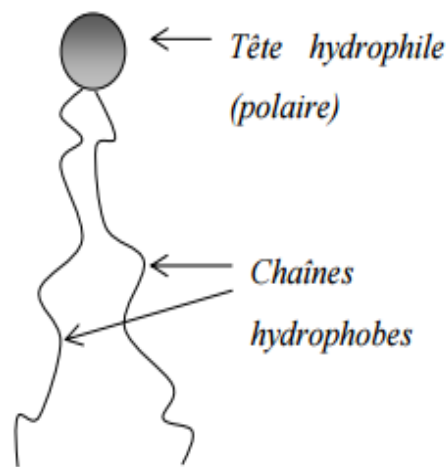


Figure 19. Représentation d'un phospholipide

Les liposomes sont classés en fonction de leur diamètre et du nombre de bicouches qu'ils contiennent (Figure 20). Il est possible de les séparer en 2 grandes classes, les liposomes unilamellaires composés d'une seule bicouche :

- *Small Unilamellar Vesicles*, SUV
- *Large Unilamellar Vesicles*, LUV
- *Giant Unilamellar Vesicles*, GUV

Et les liposomes multilamellaires composés de plusieurs bicouches :

- *OligoLamellar Vesicles*, OLV
- *MultiLamellar Vesicles*, MLV
- *MultiVesicular Vesicles*, MVV

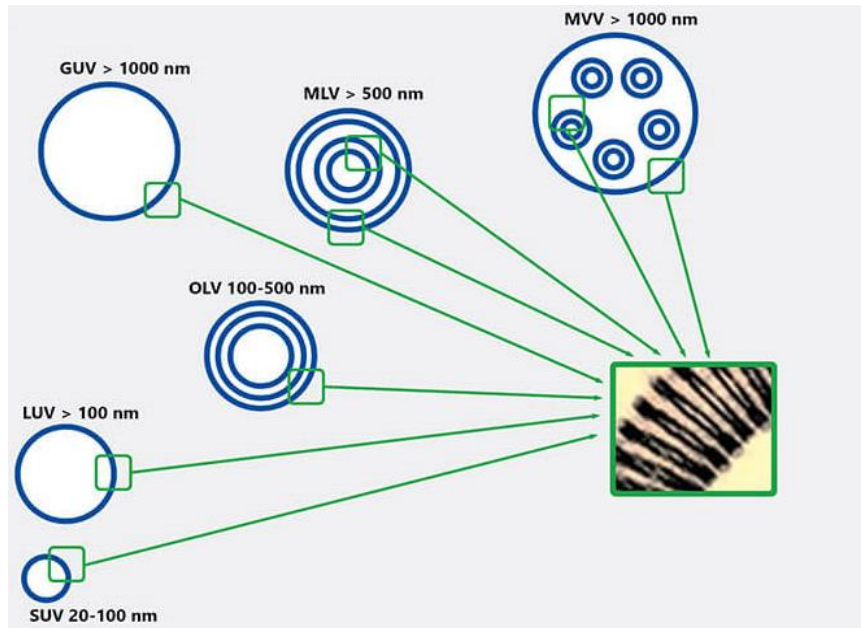


Figure 20. Classification des liposomes
(Modifié par Synthoscare)¹³³

3.2 Composition des liposomes

3.2.1 Les phospholipides

Les phospholipides sont les principaux constituants des liposomes. La majorité des phospholipides utilisés sont les phosphoglycérides, dont la tête s'organise autour d'un résidu glycérol-3-phosphate estérifié par une molécule polaire et les deux queues sont les chaînes aliphatiques : des acides gras. Ils peuvent être d'origine naturelle (soja ou œuf) ou synthétique (Figure 21).

I-3. LES LIPOSOMES

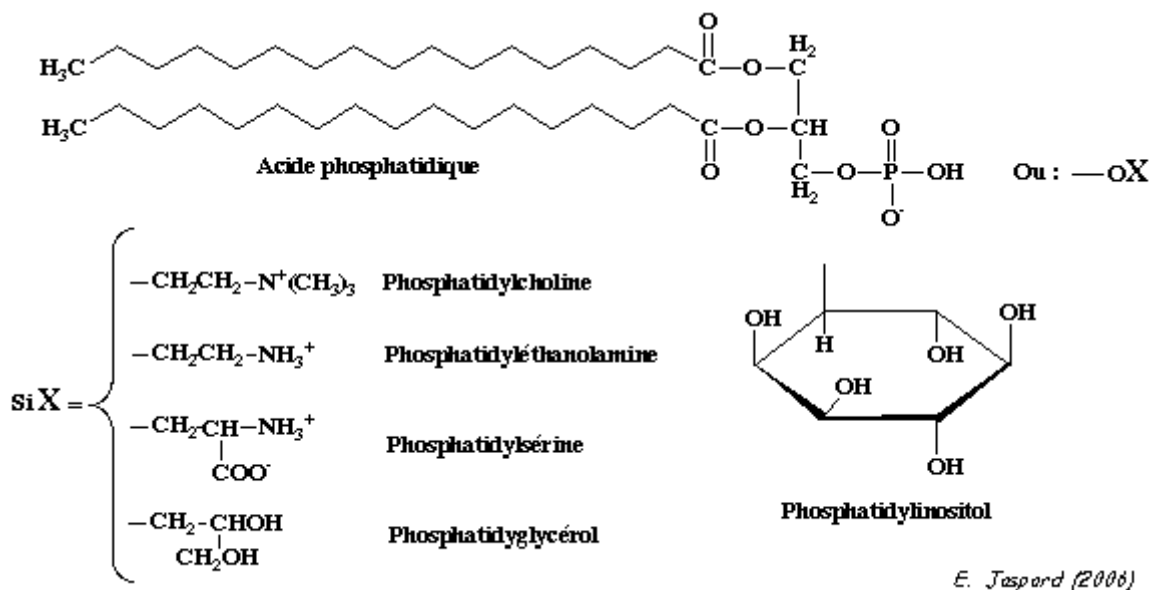


Figure 21. Structure des glycérophospholipides¹³⁴

Les chaînes d'acides gras peuvent être saturées ou insaturées, ce qui confère des propriétés différentes aux bicouches formées. En effet, plus il y a d'insaturations, plus la fluidité et donc la perméabilité des bicouches augmente. Ces insaturations sont surtout retrouvées pour les phospholipides d'origine naturelle.

La fluidité de la membrane est aussi influencée par la température. Les phospholipides sont caractérisés par leur température de transition de phase (T_m) : en dessous de celle-ci les phospholipides s'arrangent en phase ordonnée, dite phase « gel » avec des chaînes parallèles et peu mobiles. Au-dessus de la T_m les phospholipides sont en phase fluide avec un état plus désordonné et une liberté de mouvement accrue pour les chaînes d'acides gras. Cette transition correspond au passage réversible d'un état ordonné ($L\beta$ ou configuration trans) vers un état désordonné ($L\alpha$ ou configuration gauche) *via* un état intermédiaire $P\beta$ (Figure 22). La température de transition de phase dépend de la longueur et de la saturation des chaînes des phospholipides. Pour les phospholipides les plus utilisés la température de transition de phase est comprise entre -2 et 55°C .

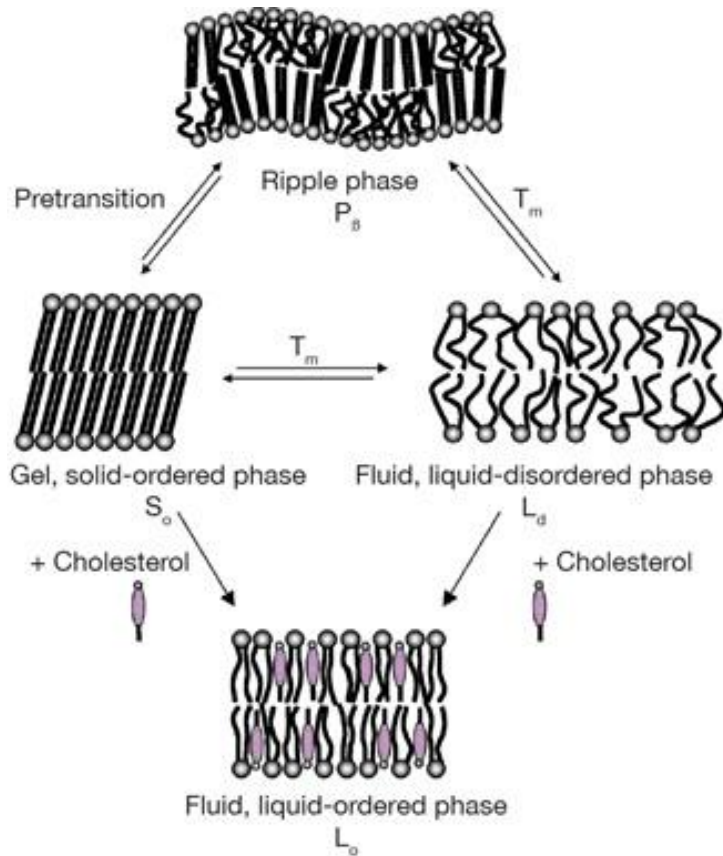


Figure 22. Représentation des différents états physiques adoptés par une bicouche lipidique en phase aqueuse¹³⁵

Une autre propriété des phospholipides, mais plus généralement des lipides amphiphiles, est le *Critical Packing Parameter (CPP)*. En fonction de la valeur de CPP qui dépend de la géométrie des lipides (volume de la partie hydrophobe V , longueur de la chaîne carbonée L_c , surface occupée par la tête polaire a_0), les molécules lipidiques peuvent adopter un arrangement différent lorsqu'elles seront dans un milieu aqueux (Figure 23).

Ceci explique que certaines molécules lipidiques s'organisent spontanément sous forme de micelles comme l'hexadécylphosphocholine (HePC)¹³⁶ et d'autres phospholipides comme la phosphatidylcholine (PC), sous forme de bicouches sphériques.

I-3. LES LIPOSOMES

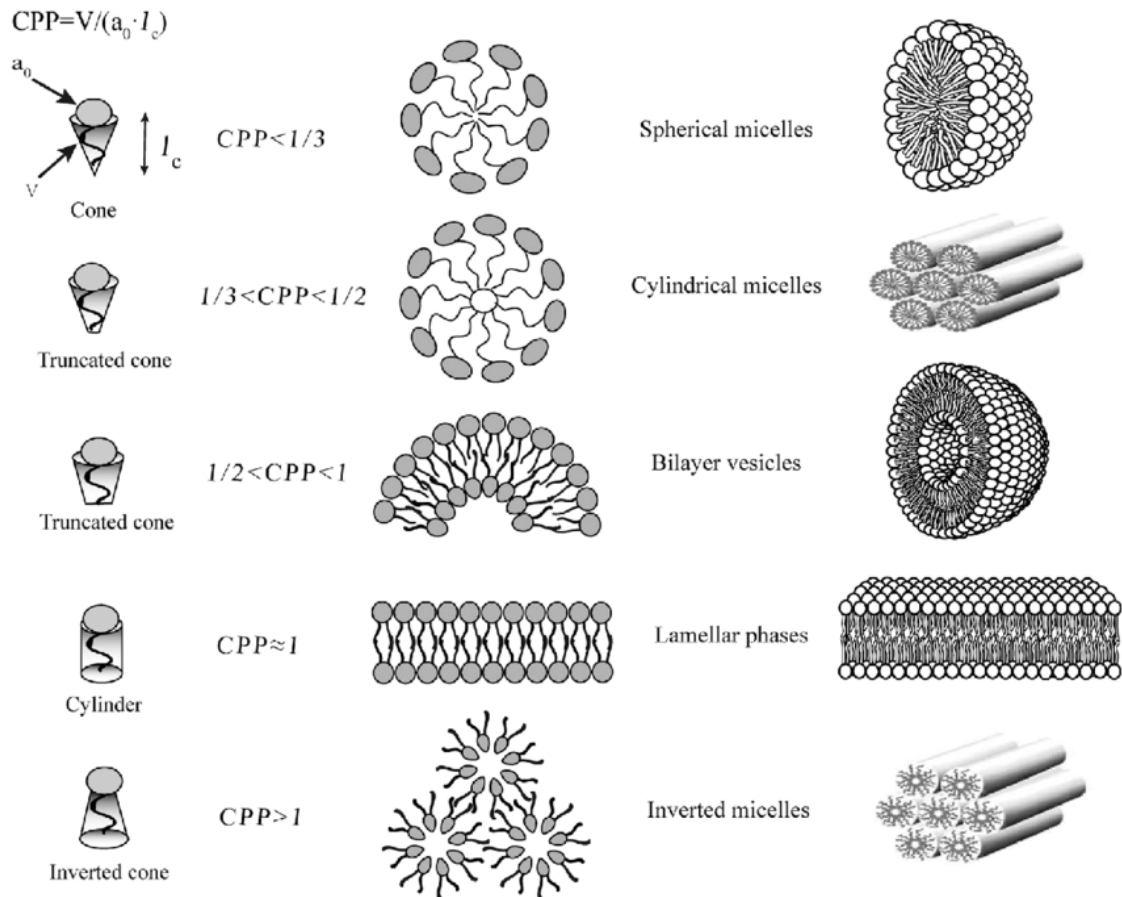


Figure 23. Représentation des différentes organisations possibles des phospholipides

3.2.2 Les stérols

Le stérol le plus utilisé est le cholestérol, en raison de son abondance au sein des membranes biologiques et des propriétés qu'il leur confère. En effet, il diminue la fluidité des membranes car sa structure multicyclique rigide limite le mouvement des chaînes d'acides gras des phospholipides (Figure 24.a). Les molécules de cholestérol s'orientent dans la bicouche avec leurs groupes hydroxyle proches des groupes de tête polaires des molécules phospholipidiques. Dans cette position, leurs anneaux stéroïdes rigides interagissent avec les régions des chaînes hydrocarbonées les plus proches des groupes de tête polaires (Figure 24.b).

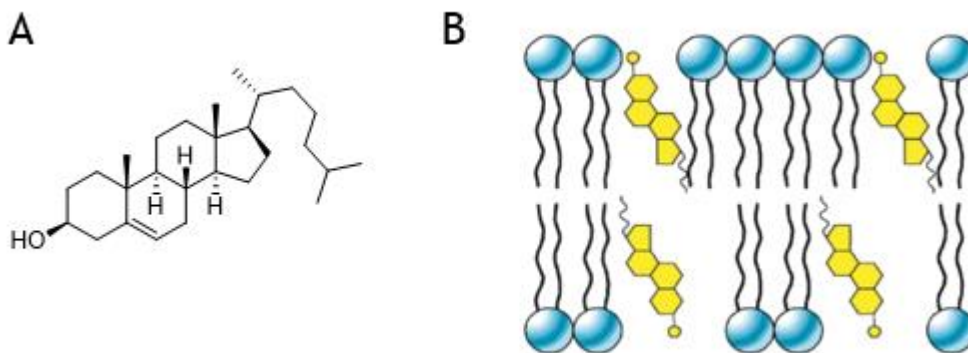


Figure 24. (a) Structure du cholestérol (b) Disposition du cholestérol au sein des membranes

3.3 Principales techniques de préparation

La première préparation volontaire de liposomes a été réalisée en 1965 par le biophysicien Alec Bangham.¹³⁷ Depuis de nombreuses techniques ont pu être développées notamment grâce à l'essor de l'utilisation des liposomes dans le domaine pharmaceutique. Dans ce paragraphe il sera essentiellement présenté les techniques de production de liposomes à petite échelle et non celles utilisées à l'échelle industrielle.

3.3.1 Méthode de réhydratation de film lipidique

Également nommée méthode de Bangham, il s'agit de la méthode la plus courante. Elle consiste à former un film lipidique par évaporation de solvant puis à le réhydrater avec un solvant aqueux afin de former des MLV. Les lipides sont solubilisés dans un solvant organique afin d'obtenir un mélange homogène. Par la suite le solvant est éliminé par évaporation, généralement sous flux d'azote afin d'éliminer la majorité du solvant, puis par séchage sous vide pour éliminer les traces de solvant mais il peut aussi être éliminé directement en utilisant un évaporateur rotatif (Figure 25). Cette évaporation est effectuée avec un mouvement rotatif afin d'augmenter la surface d'évaporation pour former un film fin sur les parois du contenant.

I-3. LES LIPOSOMES

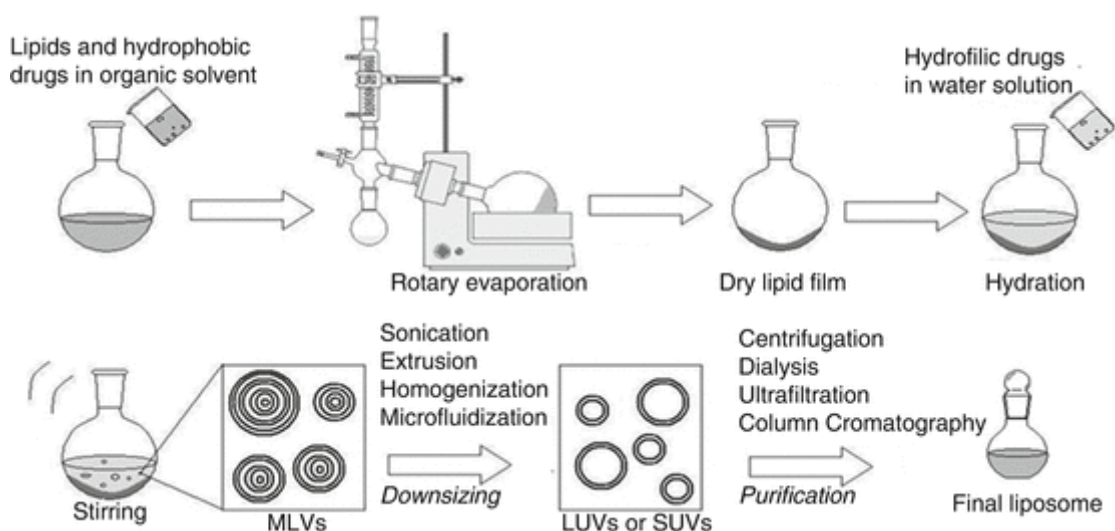


Figure 25. Représentation de la méthode de Bangham¹³⁸

Ce film est composé de plusieurs bicouches superposées. Des MLV se forment spontanément par ajout d'une solution aqueuse dont la température est supérieure à la T_m des lipides utilisés pour former le film. Les bicouches s'hydratent, gonflent et se fluidifient pour former les vésicules multilamellaires avec une distribution de taille hétérogène mais globalement de l'ordre du micromètre. Par la suite il est possible d'appliquer des méthodes dites de *downsizing* comme la sonication ou l'extrusion qui permettent de diminuer la taille et le nombre de bicouches des liposomes formés afin d'obtenir des SUV ou des LUV.¹³⁹

La microfluidisation est également utilisée pour homogénéiser les suspensions de MLV. Elle consiste à séparer la suspension *via* 2 canaux qui vont se rejoindre dans une chambre d'intersection. Les vésicules vont alors s'entrechoquer à grande vitesse et former des vésicules de petite taille homogène. Cette méthode permet notamment la préparation de liposomes en conditions stériles et à grande échelle.¹⁴⁰

3.3.2 La méthode de congélation-décongélation (*Freeze-thaw method*)

Cette méthode consiste à répéter des cycles de congélation d'une suspension de liposomes dans l'azote liquide ($-195,79\text{ °C}$) suivis de décongélation dans de l'eau chaude (en général entre 40 et 60 °C). Plus il y a de cycles, plus la taille et le nombre de bicouches des liposomes diminuent alors que le volume aqueux et l'efficacité d'encapsulation augmentent.¹⁴¹ Cette technique peut être utilisée comme technique finale de production de liposomes mais aussi comme technique intermédiaire de *downsizing* avant une extrusion ou une sonication.¹⁴²

D'autres méthodes existent mais étant moins utilisées et n'ayant pas été mises en œuvre dans le cadre de ce travail elles ne seront pas décrites ici :

- méthode d'élimination du détergent,¹⁴³⁻¹⁴⁵
- méthode d'évaporation en phase inverse,^{133,146}
- méthode d'injection de solvant organique,^{147,148}
- méthode de la double émulsion.¹⁴⁹

3.4 Propriétés

3.4.1 Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des liposomes dépendent essentiellement de leur composition. La fluidité et la perméabilité des liposomes vont augmenter lorsqu'ils seront au-dessus des températures de transition de phase des lipides utilisés mais seront aussi dépendantes de la présence de cholestérol souvent utilisé pour rigidifier les bicouches.¹⁵⁰ Les liposomes peuvent également avoir tendance à s'auto-agréger, phénomène qui est généralement inhibé par l'ajout de phospholipides chargés grâce à la répulsion électrostatique ou également par l'ajout de polymères. De façon plus générale, en plus de la composition, la stabilité des liposomes dépend également du procédé de préparation et de la taille des vésicules.^{151,152}

En effet, plus l'angle de courbure sera faible, plus les liposomes seront stables.¹⁵³ Les liposomes sont des structures dynamiques lorsqu'ils sont en solution. Des échanges ont lieu entre les phospholipides des différentes bicouches d'un même liposome (diffusion transversale) mais également entre liposomes et entre le liposome et les phospholipides restant en solution (Figure 26). Les lipides peuvent également tourner autour de leur axe perpendiculairement au plan de la membrane (diffusion rotationnelle) ou diffuser latéralement dans le feuillet membranaire.¹⁵⁴

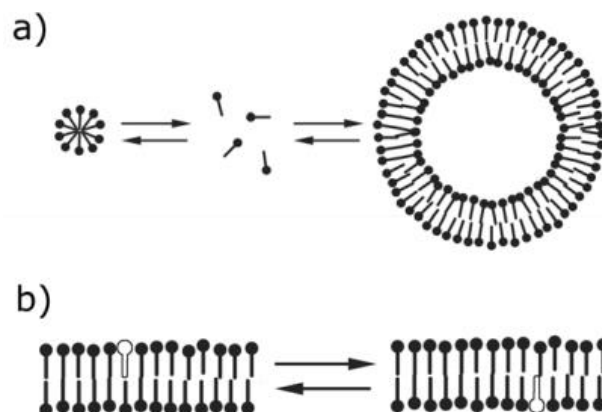


Figure 26. Représentation de la dynamique des lipides.
(a) Echanges entre vésicules et phospholipides libres (b) Flip-flop entre les feuillets membranaires¹⁵⁵

3.4.2 Propriétés liées à la conservation des liposomes

En plus de l'auto-agrégation abordée précédemment, les liposomes peuvent être sujets à des problèmes d'instabilité. Les phospholipides peuvent subir des dégradations chimiques avec l'hydrolyse de leurs fonctions esters et la peroxydation des chaînes d'acides gras insaturés.¹⁵⁵ L'hydrolyse des fonctions esters permet la libération d'un ou deux acides gras et d'un lysophospholipide. Celui-ci peut par la suite s'hydrolyser pour donner l'acide glycérophosphorique. Cette hydrolyse est notamment déclenchée à pH acide ou basique et à forte température.^{156,157} La peroxydation lipidique est un enchaînement de réactions radicalaires aboutissant au clivage de la chaîne hydrocarbonée et la formation des peroxydes. Elle se déclenche en présence d'oxygène, de lumière, de chaleur ou de cations métalliques.¹⁵⁸

3.4.3 Propriétés liées à l'usage pharmacocinétique

Les liposomes offrent une véritable plateforme d'adressage pharmacocinétique permettant de remédier à différents problèmes rencontrés lors de la conception d'un nouveau médicament. De nombreux composés possèdent un faible rapport bénéfice/risque représenté par la fenêtre thérapeutique (écart entre la concentration efficace pour obtenir l'effet thérapeutique et la concentration à laquelle le composé devient toxique). Les liposomes utilisés comme vecteurs permettent notamment une libération programmée dans le temps, il est donc par exemple possible d'obtenir une libération prolongée du composé à une concentration suffisante pour être efficace dans le temps tout en étant non toxique.^{159,160} L'encapsulation du composé au sein du liposome permet également de le protéger du système immunitaire ou d'interactions non spécifiques grâce à la furtivité des liposomes.¹⁶¹ Cette encapsulation peut se faire dans le compartiment aqueux ou au sein de la membrane du liposome en fonction de la lipophilie du composé. Cette ambivalence peut également permettre d'améliorer la solubilité de certains composés.¹⁶²

3.5 Applications

Les liposomes ont été initialement utilisés comme modèle membranaire pour l'étude de la structure et des propriétés des membranes biologiques.¹³⁷ Du fait de leur nature non-toxique, biodégradable et la possibilité de les rendre furtifs, les liposomes ont été rapidement reconnus comme potentiels systèmes de délivrance de médicaments.¹⁶³ En effet, il est possible d'encapsuler des composés hydrophiles dans l'espace aqueux ou lipophiles dans la bicouche phospholipidique.

I-3. LES LIPOSOMES

De nos jours, les avancées technologiques ont permis de développer des liposomes dits de première, deuxième ou troisième génération permettant d'améliorer leur biodisponibilité et le ciblage grâce aux greffages de ligands tels que le polyéthylène glycol.^{164,165} Les liposomes sont donc utilisés pour développer des traitements pour de nombreuses pathologies comme le cancer,¹⁶⁶ la tuberculose,¹⁶⁷ le sida,¹⁶⁸ la malaria¹⁶⁹ ou encore la thérapie génique.¹⁷⁰ En dehors de la recherche fondamentale, les applications des liposomes sont variées et vont de la cosmétologie,¹⁷¹ au textile¹⁷² en passant par l'industrie alimentaire.¹⁷³

3.6 Les liposomes comme outil de screening pour le Drug Design : application au projet de thèse

Le Drug Design décrit la conception rationalisée d'un candidat-médicament en plusieurs étapes. Il se divise en une phase de criblage pour identifier des composés d'intérêt, puis des études précliniques et cliniques afin d'étudier les effets biologiques et la toxicité des composés d'intérêt avant de lancer un nouveau médicament sur le marché (Figure 27).

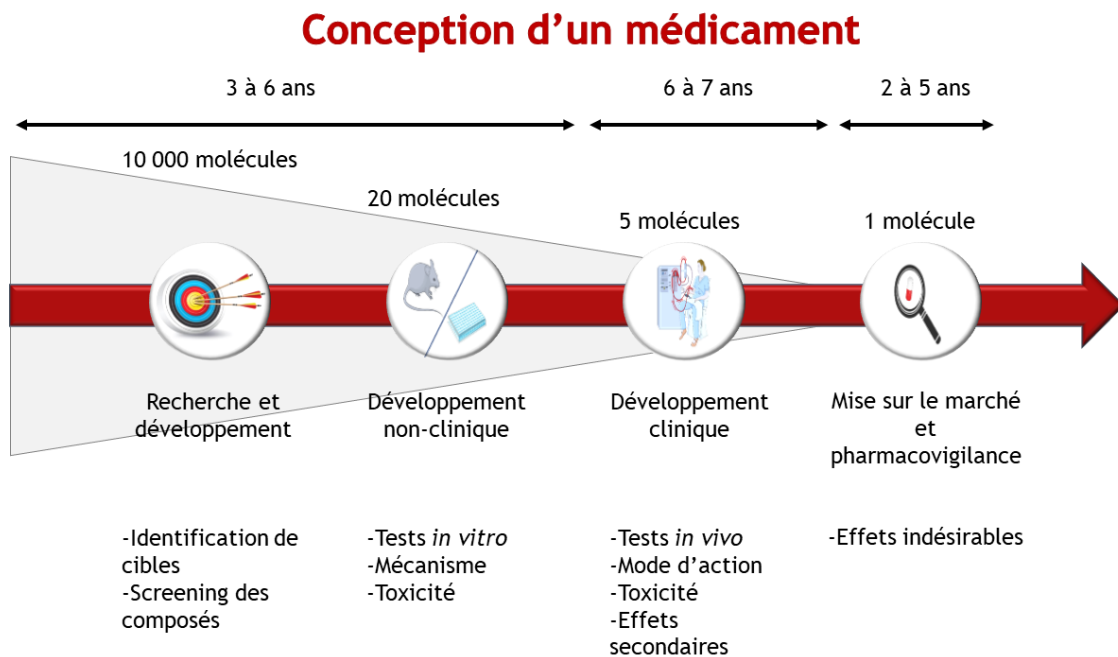


Figure 27. Processus de conception d'un médicament

Durant tout ce processus, les nombreuses études menées permettent de caractériser le composé en recueillant des données concernant ses interactions avec différents environnements (*in silico*, *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*).

La finalité étant l'administration du composé dans l'organisme, celui-ci sera amené à interagir avec les membranes des différents organes, tissus et organites du corps humain. Il est donc nécessaire de recueillir des informations concernant ces interactions le plus tôt possible.^{174,175} Pour cela, de nombreux tests de routine sont pratiqués comme la mesure de la lipophilie des composés avec la détermination du coefficient de partage (logP).¹⁷⁶ Leur utilisation à l'échelle miniaturisée, la possibilité de les produire en grande quantité de façon simple, peu coûteuse et le développement des applications des liposomes présenté dans le paragraphe précédent en font des outils parfaitement adaptés au screening précoce des composés. En effet, au-delà de leur utilisation en tant que vecteurs, ils peuvent notamment servir de modèle membranaire et permettre d'obtenir des informations très tôt dans le processus de drug design, là où des tests cellulaires et des essais *in vivo* seraient trop longs et trop coûteux.

3.6.1 Utilisation des liposomes pour déterminer la lipophilie des composés

La détermination des paramètres ADME (Adsorption, Distribution, Métabolisation, et Elimination) est dorénavant remplacée par l'acronyme ADMET, avec la volonté d'inclure des tests de toxicité à des étapes précoces du développement de nouveaux composés.¹⁷⁷

Un des principaux paramètres étudiés est la détermination de la lipophilie du composé. En effet cette lipophilie, permet notamment de prédire l'affinité du composé avec les membranes et donc la possibilité d'une accumulation dans les membranes cellulaires qui est une possible source de toxicité.¹⁷⁸ La lipophilie est exprimée sous la forme de coefficient de partage entre 2 phases : *n*-octanol/H₂O (logP ou logP_{o/w}).¹⁷⁹ Toutefois, la prédiction exacte du comportement de la molécule en milieu physiologique à partir de ce paramètre souffre de nombreuses limites. En outre, les forces qui gouvernent et influent sur la répartition de la molécule dans l'environnement des membranes biologiques ne sont pas prises en compte lors de la détermination du logP_{o/w}. Ce paramètre s'avère ne pas être adapté pour estimer la partition de molécules polaires ou partiellement chargées alors que 2/3 des molécules développées par les industries pharmaceutiques sont ionisables.¹⁸⁰ C'est dans cette perspective que des chercheurs se sont tournés vers l'utilisation de modèles membranaires tels que les micelles ou les liposomes afin de déterminer le coefficient de partage de molécules.¹⁸¹⁻¹⁸³

L'avantage de leur utilisation réside dans la possibilité de moduler les conditions expérimentales pour mettre en évidence l'influence de certains facteurs tels que la composition lipidique, la température ou l'anisotropie membranaire ce qui n'est pas possible avec le système *n*-octanol/eau.

I-3. LES LIPOSOMES

Magalhães, *et al.* (2010)¹³⁶ a notamment étudié la lipophilie de quatre composés anti-inflammatoires non stéroïdiens avec des micelles d'Hexadécylphosphocholine (HePC) à l'aide d'un protocole de spectrophotométrie dérivée simple permettant d'obtenir des valeurs de coefficient de partage. Une analyse comparative a également été faite entre les liposomes et les micelles composé respectivement de 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphorylcholine (DMPC) et d'HePC par Loureiro, *et al.* (2018)¹⁸¹ La comparaison entre les données obtenues a permis de conclure que les liposomes étaient le meilleur modèle pour accéder à la lipophilie des médicaments. En outre, un arbre décisionnel a été proposé afin de guider la sélection d'un outil d'évaluation de la lipophilie (Figure 28). Ces deux études faisaient essentiellement appel à la spectrophotométrie UV-Visible, toutefois d'autres méthodologies de spectrophotométrie sont utilisables afin de déterminer le coefficient de partage,¹⁸² en particulier la fluorescence.¹⁸⁴

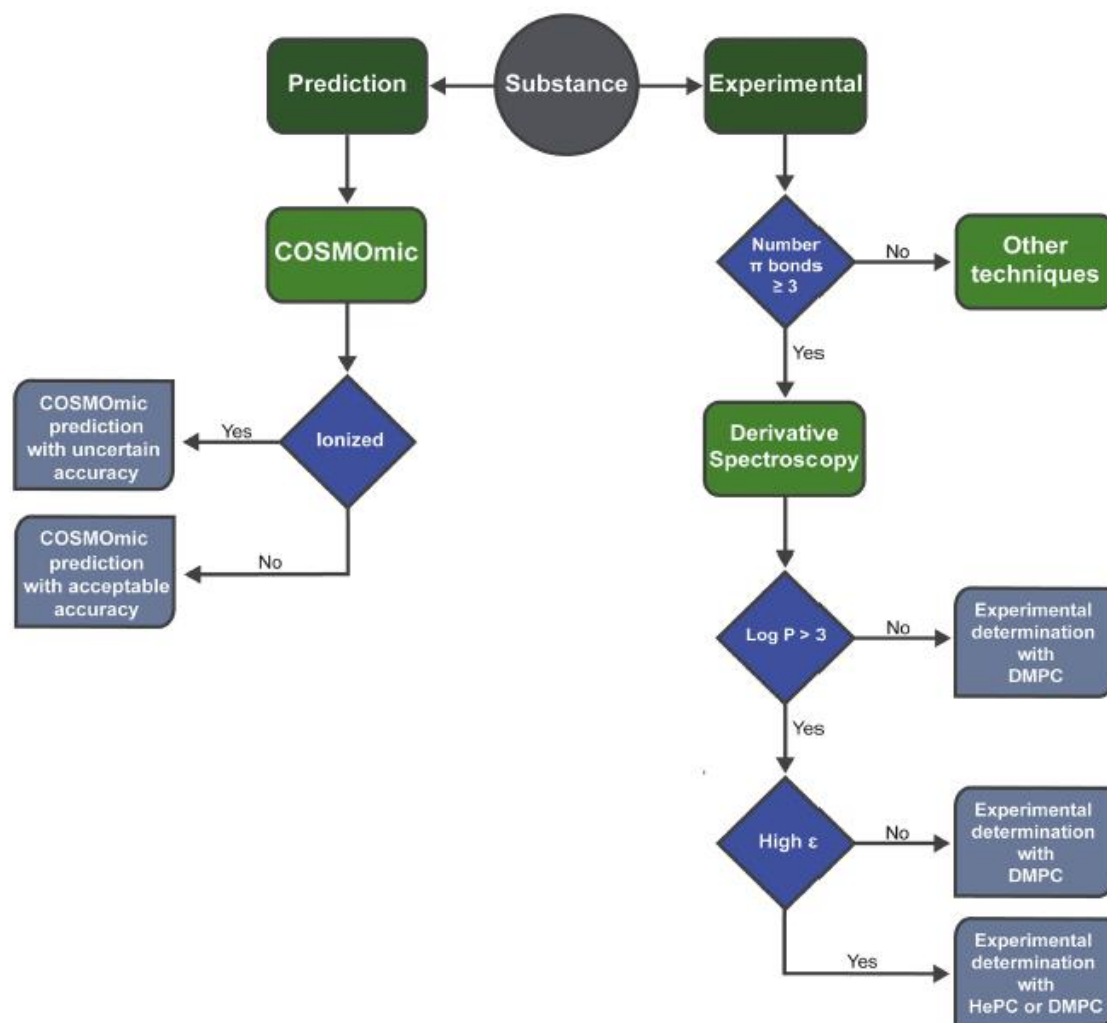


Figure 28. Sélection d'un outil de mesure de la lipophilie¹⁸¹

L'ensemble de ces données a permis au sein de notre unité, la mise en place d'un protocole de détermination du coefficient de partage en présence de liposomes. Après transposition du protocole de Magalhães, *et al.* (2010)¹³⁶ et en y incluant un dosage des phospholipides par une méthode de spectroscopie RMN développée par Hein, *et al.* (2016)¹⁸⁵ il a été possible de déterminer le coefficient de partage du pyridoclast, un candidat-médicament anticancéreux.¹⁸⁶ Ce paramètre a pu être étudié dans différentes conditions et a été déterminé en spectrophotométrie UV-visible mais aussi par la fluorescence.¹⁸³ Cette étude sera présentée dans le premier paragraphe des résultats de ce manuscrit.

3.6.2 Détermination du coefficient de partage par la technique de chromatographie artificielle de membrane immobilisée (IAM)

Cette technique a été proposée par Pidgeon, *et al.* (1995)¹⁸⁷ au screening afin d'évaluer l'absorption des composés notamment au niveau de la barrière gastro-intestinale. Elle a été proposée comme alternative aux approches traditionnelles coûteuses pour prédire la perméabilité de nouveaux composés : des cultures de lignées cellulaires Caco-2.

Le principe est de mesurer le temps de rétention des composés dans la phase mobile en présence d'une phase stationnaire constituée de phospholipides liés de façon covalente à de la silice. La comparaison du temps de rétention avec des molécules standards permet d'obtenir une évaluation de la lipophilie dans des conditions proches des conditions de partition membrane/milieu. Ce paramètre de lipophilie peut ensuite être corrélé à l'absorption intestinale des principes actifs, mais aussi à la toxicité cellulaire, par exemple celle induite par des pesticides.

Les avantages de cette technique sont principalement le débit élevé de données acquises par un système automatisé et la faible quantité de produit consommée. L'exploration reste néanmoins limitée aux compositions en phospholipides disponibles sur le marché. Des colonnes immobilisées avec des liposomes ont également permis d'étudier les interactions avec les membranes et il a été constaté que cette variante, appelée chromatographie sur liposomes immobilisés (ILC), permettait d'obtenir des constantes de liaison plus précises que les méthodes classiques.¹⁸⁸

Ong, *et al.* (1996)¹⁸⁹ a démontré que les coefficients de partage calculés en présence d'une monocouche de DMPC fixé à la silice se corrélaient aux coefficients de partage calculés en présence de liposomes de la même composition.

La chromatographie IAM a permis de prédire le coefficient de partage dans des membranes de liposomes, la perméabilité aux cellules Caco-2, l'absorption intestinale, l'absorption d'acides aminés au niveau du cerveau, les interactions entre les sels biliaires et les membranes et la perméabilité de la peau humaine aux stéroïdes et alcools.¹⁹⁰ Tsopeles, *et al.* (2016)¹⁹¹ présente la chromatographie IAM, en tant que méthode permettant d'estimer des paramètres pharmacocinétiques tels que la diffusion passive et la fixation aux tissus biologiques utiles pour le drug discovery. La toxicité de composés a également été étudiée par le biais de la chromatographie IAM : exemple de l'étude récente de la cytotoxicité d'analogues du Bisphénol A par Russo, *et al.* (2018)¹⁹² ou encore l'étude de l'écotoxicité des pesticides par Stergiopoulous, *et al.* (2019).¹⁹³

Ces dernières années, la chromatographie IAM suscite un intérêt marqué pour le screening de nouveaux composés.^{194,195} L'utilisation en routine d'une telle méthodologie combinée à l'utilisation des liposomes que ce soit de façon directe par ILC ou de façon comparative permettrait entre autre aux différents laboratoires de Drug Design d'obtenir des données comparables¹⁹⁵ afin d'établir des banques de données ADME pour les nouveaux composés.¹⁹⁴ Cette technique représente un intérêt particulier pour l'utilisation de liposomes en tant qu'outils de screening, sa robustesse pour la prédiction des paramètres ADME étant acquise d'une part et le lien avec les coefficients de partage déterminés avec les liposomes d'autre part.

3.6.3 Utilisation des liposomes pour étudier la toxicité membranaire et/ou l'activité pharmacologique de composés

La prédiction de la toxicité des composés est devenue une préoccupation majeure lors de la conception d'un nouveau médicament. Cette toxicité peut notamment s'exprimer par un mécanisme direct sur la membrane cellulaire. D'autre part, des modifications de propriétés physiques de cette membrane peuvent être recherchées afin d'atteindre une activité thérapeutique. Les liposomes offrent ainsi une plateforme permettant d'étudier ces modulations de façon précoce sans avoir recours aux cultures cellulaires.

Les anesthésiques font partie des familles de composés activement étudiés par l'intermédiaire des liposomes. L'étude de Ruokonen, *et al.* (2017)¹⁹⁶ a montré que le coefficient de partage d'anesthésiques pouvait dépendre de la composition des liposomes, notamment en fonction de la quantité de cholestérol présente alors que l'effet de la température était moins significatif. Il a également été démontré que les anesthésiques pouvaient modifier les températures de transition de phase de liposomes composés de DPPC ou DPPG.¹⁹⁷

I-3. LES LIPOSOMES

Ces données montrent que non seulement le profil ADMET de ces composés peut être influencé par les membranes mais qu'en retour les anesthésiques pouvaient modifier les propriétés physicochimiques des membranes.

Efimova, *et al.* (2018)¹⁹⁸ ont étudié le mécanisme d'action d'anesthésiques locaux sur les pores formés par différents agents (polyenes, peptides et polypeptides). En utilisant notamment la technique du *Liposome Leakage Assay*, il a été démontré que les anesthésiques pouvaient réguler les effets toxiques de ces agents en modifiant le stress exercé sur les membranes.

Les antibiotiques sont une famille de composés d'intérêt majeur dans la compréhension des interactions entre des molécules et les membranes. Ce sont des composés qui ciblent souvent les membranes des agents pathogènes et qui doivent franchir de nombreuses barrières avant d'atteindre leur cible (Figure 29). La revue de Pinheiro, *et al.* (2019)¹⁹⁹ axée sur l'étude des interactions entre les antibiotiques et les membranes biologiques souligne l'apport des liposomes afin de mieux caractériser le profil pharmacocinétique des antibiotiques. En effet, il est possible de formuler des liposomes à partir de lipides extraits d'*Escherichia Coli* ou d'utiliser des liposomes afin de mimer les membranes procaryotes riches en phosphatidylglycérol. Ainsi, de nombreux paramètres tels que l'affinité membranaire, la localisation des composés au niveau des membranes et les effets des composés sur les membranes peuvent être étudiés.

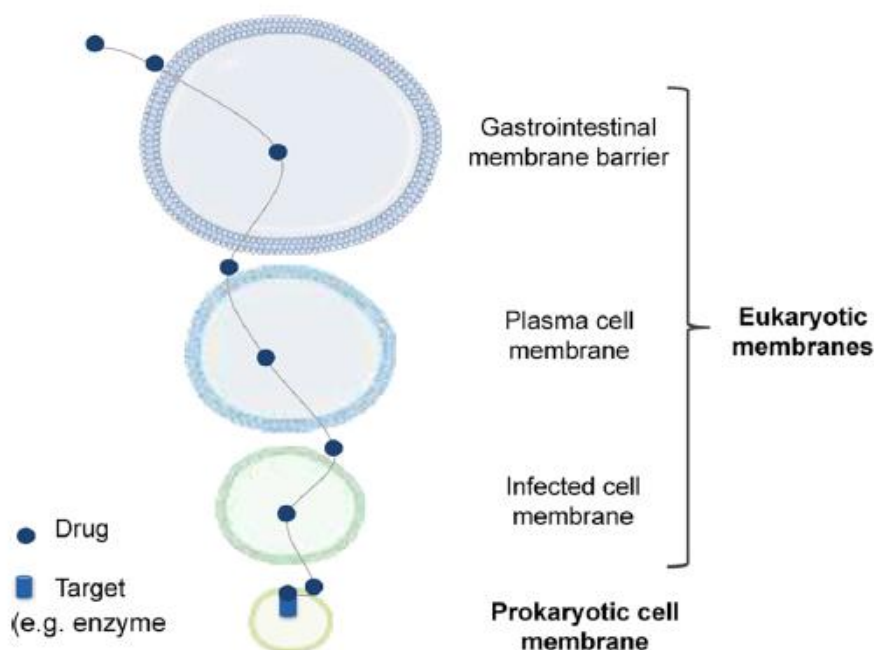


Figure 29. Représentation schématique de la voie des antibiotiques¹⁹⁹

L'ensemble de ces données montre que les liposomes peuvent servir de plateforme pour estimer les paramètres ADMET de composés en cours de développement. De plus, ils permettent d'étudier sur des modèles simples le mécanisme d'action de familles spécifiques dont le mode d'action est dépendant de ses interactions avec la membrane plasmique ou tout autre barrière physiologique.

3.6.4 Utilisation des liposomes comme outil de Drug Discovery : application au sujet de thèse

Ce travail de thèse est mené au sein de la plateforme Screening & Drugabilité du CERMN. Il a pour objectif la mise en place d'un test multiparamétrique pouvant permettre l'identification de molécules visant à moduler l'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂ en prenant en compte les interactions avec les membranes (cf paragraphe 2.4).

En effet, jusqu'ici les approches de développement de médicaments capables d'avoir une action thérapeutique vis-à-vis de la MA et donc des molécules capables d'atteindre les cibles déjà identifiées comme le peptide A β souffrent d'inefficacité voire même de toxicité.²⁰⁰ De nouvelles approches MTDL (*MultiTarget-Directed Ligand*) visent à développer des composés capables d'agir sur plusieurs cibles afin d'obtenir une efficacité thérapeutique accrue tout en diminuant les effets secondaires.²⁰¹ Ces approches sont également explorées au sein de notre laboratoire avec le développement du donécopride présentant à la fois des effets inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et une activité agoniste partielle du récepteur 5-HT₄.²⁰² Plus récemment, une précédente thèse ayant pour objectif de développer des dérivés pléiotropes de la curcumine potentiellement utiles dans le traitement de la maladie d'Alzheimer a permis de mettre en avant le composé MR32741.²⁰³ Ce composé présente en outre une bonne prédiction de paramètres de drugabilité (perméabilité membranaire, faible cytotoxicité, bonne stabilité chimique) et des propriétés pharmacologiques d'intérêt pour le traitement de la MA (effet antioxydant, activité de chélation d'ions métalliques, activité inhibitrice de l'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂). L'inhibition de l'agrégation du peptide A β est une cible activement étudiée que ce soit dans des approches directes, indirectes ou multi-cibles. A ce jour, seul un antiagrégant du peptide A β est en phase d'essais cliniques et comme indiqué précédemment un autre composé est en cours de commercialisation en Chine (cf Figure 5). Jusqu'ici, les traitements anti-A β ont largement échoué à montrer des effets lors des évaluations cliniques, que ce soit sur la forme précoce ou la forme tardive de la MA et les principaux essais de phase 3 ont été arrêtés de façon précoce.²⁰⁴ Toutefois, certains chercheurs pensent qu'il ne faut pas totalement écarter la piste amyloïde mais la redéfinir.

I-3. LES LIPOSOMES

Doig, *et al.* (2017),²⁰⁵ ont notamment mis en avant les probables causes des nombreux échecs de cette approche thérapeutique :

- concentrations de peptide utilisées dans les modèles sont trop élevées (μM vs nM ou moins dans le cerveau humain, bien que les concentrations locales puissent être plus élevées) ;
- faible reproductibilité des expériences ;
- les médicaments peuvent interférer avec la fluorescence des molécules couramment utilisées pour suivre l'agrégation du peptide A β , comme la Thioflavine T (ThT), par un effet de filtre interne ;
- les populations et les conformations des espèces oligomériques toxiques sont mal définies ;
- les images de microscopie peuvent ne pas être suffisamment représentatives des populations peptidiques ;
- les résultats dépendent de l'isoforme d'A β étudié ;
- les petites molécules ne peuvent que faiblement se lier aux monomères d'A β ;
- hétérogénéité des agrégats non fibrillaires ;
- outre l'A β , de nombreuses autres protéines sont impliquées dans la MA, notamment la protéine Tau ;
- les modèles animaux ne sont pas assez représentatifs de la maladie d'Alzheimer ;
- les études de génomique n'ont pas encore révélé tous les gènes impliqués dans la MA ;
- pas de structure à haute résolution d'A β ou de la protéine Tau interagissant avec les acteurs clés de la cellule ;
- les nouveaux métabolites de l'APP tels que A η - α et A η - β ne sont pas encore totalement caractérisés ;
- manque de spécificité de certaines cibles car elles fonctionnent avec plusieurs substrats ;
- manque d'efficacité des composés développés ;
- essais cliniques ciblant l'amyloïde probablement trop tardifs dans le processus de la maladie pour avoir un effet bénéfique.

De notre point de vue, en plus de tous ces éléments, la présence des lipides membranaires n'est pas suffisamment prise en compte lors de la caractérisation des composés visant à inhiber l'agrégation du peptide. De plus, au vu des connaissances acquises vis-à-vis de la physiopathologie du peptide, se concentrer uniquement sur la recherche d'inhibiteurs n'est peut-être pas la solution adéquate. En effet l'existence de plusieurs voies d'agrégation (cf. paragraphe 2.3) implique qu'inhiber une voie pourrait entraîner l'activation ou le renforcement d'autres voies d'agrégation du peptide qui pourraient s'avérer encore plus toxiques.

Il nous paraît plus juste de rechercher des modulateurs de l'agrégation du peptide qui pourraient potentiellement favoriser des voies d'agrégation peu ou pas toxiques. Il est désormais acquis que le peptide A β entretient une étroite relation avec les membranes avant même qu'il ne soit libéré de son précurseur, l'APP (Figure 30). En effet de sa libération après clivage par les sécrétases à la formation des fibres amyloïdes, le peptide A β peut interagir avec les membranes et notamment exercer sa toxicité lorsqu'il est au stade d'espèces agrégatives intermédiaires, les oligomères. Les données bibliographiques relatent de nombreux effets des lipides sur le peptide A β , notamment avec des interactions sur les phases précoces pouvant modifier la nucléation ou activer la formation d'espèces de façon hétérogène (agrégats, oligomères, fibres).²⁰⁶ Les interactions entre A β et les membranes impactent non seulement le processus d'agrégation du peptide, mais également en retour la membrane. En effet, il a notamment été démontré que cette interaction pouvait se traduire par la formation de pores et donc entraîner une perte de l'intégrité membranaire.^{128,207} Il paraît donc primordial de pouvoir inclure un modèle membranaire lors de la caractérisation de composés visant à interagir avec A β .

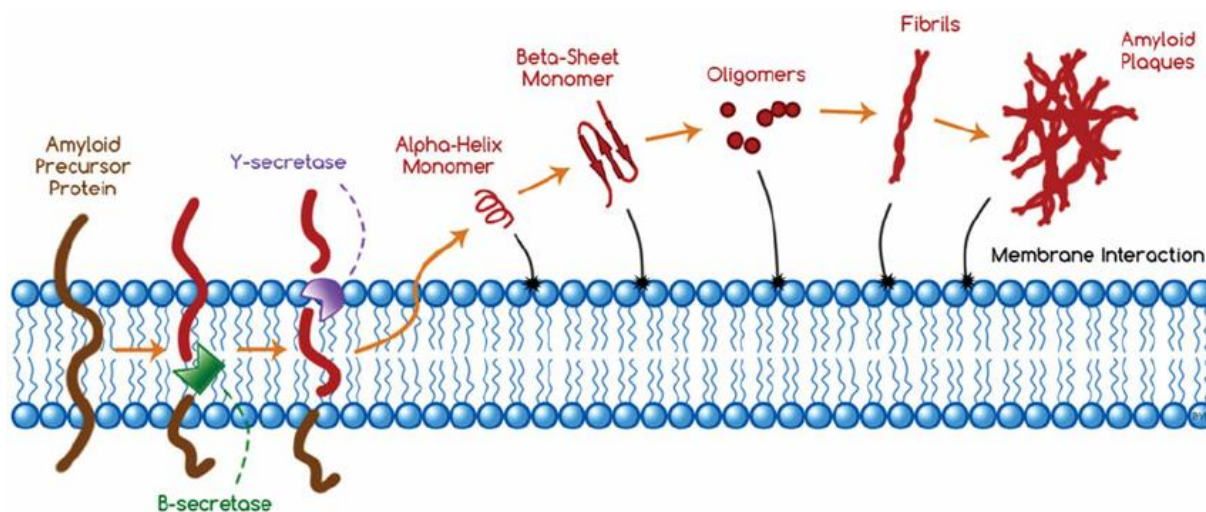


Figure 30. Représentation du processus d'agrégation amyloïde et des interactions avec la membrane²⁰⁸

Dans cette optique, l'introduction de liposomes comme plateforme de screening s'avère être une approche intéressante compte-tenu des possibilités qu'offrent un tel outil. Bien que l'étude des relations entre le peptide A β et les membranes soit un axe majeur de recherche, très peu d'approches dans la littérature prennent en compte le rôle que les membranes pourraient avoir sur des composés visant à interagir avec ce peptide.^{209,210}

I-3. LES LIPOSOMES

Ces travaux montrent toutefois la faisabilité d'une telle approche. La mise au point d'un processus de screening doit pouvoir augmenter le débit de molécules testées. Les liposomes ont déjà permis de mettre en avant de nombreuses spécificités liées à l'interaction du peptide A β avec les membranes. Rangachari, *et al.* (2018)²⁰⁶ a notamment décrit différents paramètres par lesquels les membranes et les lipides peuvent influencer l'agrégation et par conséquent la pathogenèse de la MA.

La répartition de charge, la transition de phase, la rigidité, l'hydrophobicité et la présence de surfactants peuvent activer mais aussi inhiber l'évolution cinétique de l'agrégation. Ces effets cinétiques sont corrélés à des modifications conformationnelles des agrégats pouvant conduire à des populations morphologiquement distinctes et donc ayant des effets pathologiques modifiés.²⁰⁶ Une telle complexité bien que difficile à définir doit pouvoir être incluse dans des approches thérapeutiques afin d'avoir une vision globale des différents effets possibles lors des tests de caractérisation *in vitro*.

Les liposomes permettront d'une part d'étudier les paramètres pharmacologiques des composés grâce à des approches visant à analyser les interactions entre les composés et leurs membranes. Il sera également possible de les utiliser pour caractériser les interactions entre le peptide et les membranes. Finalement, il sera possible de créer un interactome entre le peptide, les molécules testées et les liposomes en utilisant les méthodologies communes aux études des interactions molécules/liposomes et peptide/liposomes afin de caractériser l'effet des molécules en absence et en présence de membranes.

Une autre plus-value apportée par les liposomes sera la possibilité de mimer les membranes neuronales. Comme indiqué précédemment, le ganglioside GM1, la sphingomyéline et le cholestérol sont les principaux lipides d'intérêt indiqués à ce jour au regard des interactions entre le peptide A β et les membranes. L'utilisation des liposomes permettra de proposer un modèle neuronal simplifié, rapide, peu coûteux à produire et permettra de travailler à petite échelle (*i.e* microplaque). De par leur polyvalence, les liposomes fourniront donc une plateforme adaptée au screening précoce de composés dans le cadre du Drug discovery.

Des techniques de spectroscopie et de spectrophotométrie seront utilisées pour caractériser cet interactome. Les principes sur lesquels ces méthodologies se basent et leurs applications dans le cadre de la thèse sont présentées succinctement ci-après.

3.6.7 Principes et méthodes employées

Spectroscopie UV-Visible

Lorsqu'un échantillon est traversé par un rayonnement lumineux, les photons issus du rayonnement transfèrent aux composés analysés une énergie qui excite les molécules, atomes ou ions traversés. L'étude du rayonnement après passage à travers la substance analysée permet d'obtenir des informations sur sa nature. Ce rayonnement met en jeu des photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (200 nm - 400 nm) ou du visible (400 nm - 800 nm).

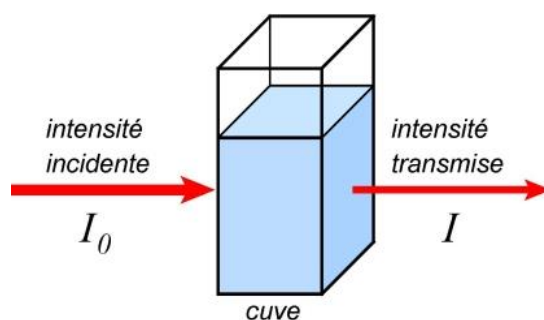


Figure 31. Schéma de principe de lecture d'un échantillon en spectroscopie UV-visible

A partir des intensités incidente et transmise, il est possible de calculer l'absorbance des échantillons.

$$A = \log (I_0 / I)$$

L'absorbance est une grandeur sans unité généralement exprimée par la loi de Beer-Lambert.

$$A = l.C.\epsilon$$

Avec A l'absorbance sans unité, L (cm) la largeur de la cuve de spectroscopie, C (mol.L⁻¹) la concentration de la substance dissoute, et ϵ (L.mol⁻¹.cm⁻¹) le coefficient d'absorption molaire, aussi appelé coefficient d'extinction molaire.

Pour chaque longueur d'onde, l'absorbance est mesurée et les données recueillies sont utilisées pour tracer les variations d'absorbance en fonction de la longueur d'onde, permettant ainsi d'obtenir un spectre UV-visible.

Application : l'estimation de la lipophilie, présentée comme paramètre déterminant du *drug discovery* se fera par détermination du coefficient de partage des composés en présence de liposomes. Cette détermination repose sur des analyses de spectrophotométrie UV-visible dérivée. Celle-ci sera détaillée dans le paragraphe IV.

Spectrophotométrie de fluorescence

Une molécule fluorescente possède la propriété d'absorber un rayonnement lumineux incident la faisant passer d'un état de spin S à un état de spin $S+1$ (excitation) et de restituer rapidement l'énergie absorbée sous forme d'émission de lumière (fluorescence) (Figure 32). Lorsque la molécule se trouve dans un état excité suite à l'absorption d'un photon, elle retourne au plus bas niveau d'énergie de l'état excité par relaxation (transfert d'énergie avec le solvant suite notamment à des collisions). La durée de vie de ces relaxations vibrationnelles non radiatives est de l'ordre de 10^{-12} seconde. La molécule revient ensuite dans l'état fondamental soit par conversion interne ou externe (choc avec d'autres molécules) soit par émission de lumière. Cette émission lorsqu'elle a lieu s'appelle la fluorescence.²¹¹

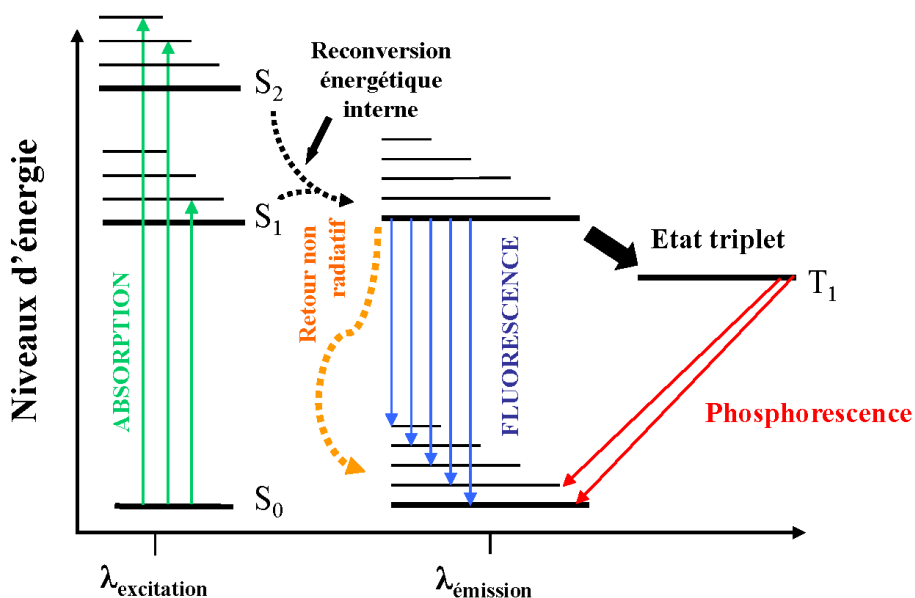


Figure 32. Représentation du diagramme de Jablonski

Application : La première application se fera pour la détermination du coefficient de partage qui en plus d'être déterminé par spectroscopie UV-visible sera déterminé par spectrophotométrie de fluorescence pour les composés bénéficiant d'une fluorescence intrinsèque (cf paragraphe IV). Les aspects cinétiques de l'agrégation du peptide $A\beta$ vont être étudiés par suivi de fluorescence de la thioflavine. Cette sonde existe sous deux formes, la thioflavine T et la thioflavine S. La thioflavine T est un sel de benzothiazole qui en se liant aux structures riches en feuillets β subit une transition du spectre d'émission vers des longueurs d'ondes supérieures (*red shift*) et qui voit également sa fluorescence augmenter.²¹²

La thioflavine S se lie également aux fibres mais pas aux monomères (contrairement à la thioflavine T) et ne produit pas de *red shift*. Le suivi de l'agrégation du peptide A β sera donc fait par suivi de fluorescence de la thioflavine T (ThT) (cf paragraphes V et VI).

Quenching de fluorescence

L'intensité de la fluorescence d'un fluorophore peut être diminuée par son environnement. C'est le quenching de fluorescence. Le quenching par collision a lieu lorsque le fluorophore à état excité est désactivé au contact d'une autre molécule en solution, qui s'appelle le « quencher ». En plus du quenching par collision, l'extinction de la fluorescence peut se produire par d'autres processus. Certains fluorophores peuvent former des complexes non fluorescents avec des molécules appelées « extincteurs ». Il s'agit du quenching statique car il se produit lorsque le fluorophore est à l'état fondamental et ne repose pas sur la diffusion ou des collisions moléculaires. Il peut également se produire des mécanismes non moléculaires, tels que l'atténuation de la lumière incidente par le fluorophore lui-même ou d'autres espèces absorbantes.²¹¹

Application : Le quenching de fluorescence est le principe sur lequel repose la technique de *Liposome Leakage Assay* (LLA). Le principe est d'encapsuler la carboxyfluoresceine (CF) dans des liposomes à une concentration suffisamment élevée pour provoquer un auto-quenching de fluorescence ou effet de filtre interne (> 50 mM).²¹³ Par la suite la mesure de l'augmentation de la fluorescence de la CF par sa dilution dans le milieu extra-liposomal permet de traduire une perméabilisation membranaire (Figure 33). Cette approche sera utilisée afin d'étudier non seulement la toxicité membranaire des composés, mais aussi celle du peptide en absence et en présence des composés (cf chapitres IV, V et VI).

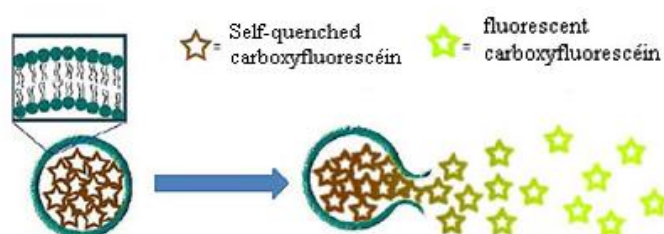


Figure 33. Principe du Liposome Leakage Assay

Anisotropie de fluorescence

Les mesures d'anisotropie de fluorescence sont basées sur le principe d'excitation photosélective de fluorophores par la lumière polarisée. Les fluorophores absorbent préférentiellement les photons dont les vecteurs sont alignés parallèlement au moment de transition du fluorophore (Figure 34). Le moment de transition a une orientation définie par rapport à l'axe moléculaire. Dans une solution isotrope, les fluorophores sont orientés de manière aléatoire. Lors de l'excitation avec une lumière polarisée, on excite sélectivement les fluorophores dont le dipôle de transition d'absorption est parallèle au vecteur électrique de l'excitation. Cette excitation sélective se traduit par une population partiellement orientée de fluorophores et donc par une émission de fluorescence dite polarisée. L'anisotropie est une mesure de la dépolarisation de fluorescence.

L'anisotropie de fluorescence (r) et la polarisation (P) sont définies par les équations suivantes :

$$(1) \quad r = I_{\parallel} - I_{\perp} / I_{\parallel} + 2I_{\perp}$$

$$(2) \quad P = I_{\parallel} - I_{\perp} / I_{\parallel} + I_{\perp}$$

I_{\parallel} et I_{\perp} sont les intensités de fluorescence parallèles (\parallel) et perpendiculaires (\perp) de l'émission de fluorescence polarisée, lorsque l'échantillon est excité avec une lumière polarisée verticalement. L'anisotropie et la polarisation sont les deux expressions d'un même phénomène.²¹¹

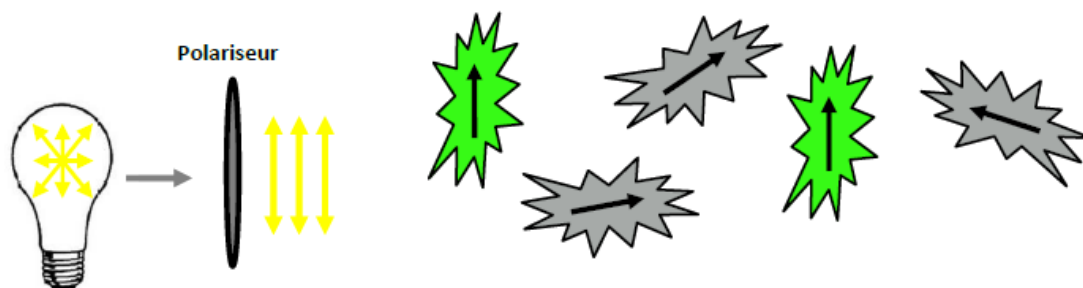


Figure 34. Polarisation de la lumière et photosélectivité

Application : Le 1,6-Diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) et le N,N,N-Triméthyl-4-(6-phényl-1,3,5-hexatrien-1-yl)phénylammonium p-toluenesulfonate) (TMA-DPH) sont des sondes fluorescentes utilisées pour mesurer la fluidité membranaire dans les systèmes de membranes artificielles et vivantes. Leur structure cylindrique leur confère une grande sensibilité à la réorientation résultant des modifications des lipides environnants. Après ajout d'un composé à tester avec des liposomes, plus l'anisotropie de ces sondes est élevée, moins l'environnement est soumis à des mouvements stochastiques donc plus la membrane peut être considérée comme rigide.

La sonde DPH se localise profondément dans les membranes avec un alignement parallèle aux chaînes acyle. Le TMA-DPH est une molécule rigide qui en raison de son caractère amphiphile, est d'une part ancrée à la surface de la membrane, c'est-à-dire entre les têtes polaires des phospholipides, tandis que le motif DPH reste localisé entre les chaînes acyle. L'utilisation de la fluorescence des sondes DPH/TMA-DPH permet donc de localiser les interactions et d'analyser les effets sur la fluidité membranaire (cf chapitre VI).²¹⁴⁻²¹⁷

Spectroscopie Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform InfraRed (ATR-FTIR)

La spectroscopie ATR-FTIR est utilisée afin d'analyser la structure secondaire des peptides et protéines notamment par l'analyse de la bande amide I ($1700-1600\text{cm}^{-1}$) correspondant à la vibration du C=O (élongation) de la liaison peptidique. Afin d'obtenir une réflexion totale, un faisceau de lumière infrarouge (domaine du moyen IR : $4000-200\text{cm}^{-1}$) est envoyé avec un certain angle d'incidence (45°) sur le cristal qui possède un indice de réfraction supérieur à celui de l'échantillon (Figure 35). Il se forme une onde évanescente (onde plane dont l'amplitude diminue exponentiellement avec la distance à la source) qui pénètre en partie dans la surface de l'échantillon en contact avec le cristal ($600-800\text{nm}$). Cela permet d'exciter les niveaux vibrationnels des molécules, mettant ainsi en évidence la présence de certains groupes fonctionnels par la présence de pics spécifiques observables sur le spectre infrarouge.

Le faisceau passe à travers un interféromètre de Michelson. On obtient donc un interférogramme auquel on applique une transformée de Fourier afin de faire apparaître un spectre.

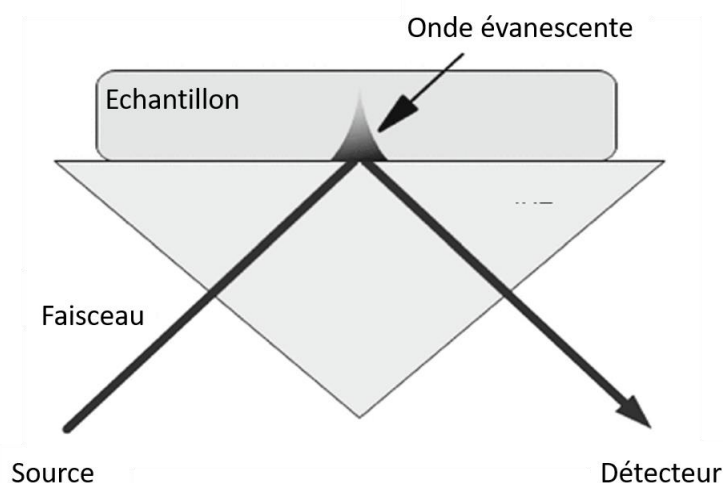


Figure 35. Principe de l'ATR-FTIR (modifié d'après Ruysschaert et Raussens, 2018)²¹⁸

Application : La spectroscopie ATR-FTIR permettra de réaliser une analyse de structure secondaire du peptide, en absence et en présence des modulateurs de l'agrégation du peptide (molécules et liposomes) (cf paragraphe V et VI).⁷⁷

Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Lorsqu'une particule est éclairée par une source de lumière telle qu'un laser, la particule provoque la diffusion de la lumière dans toutes les directions. En solution, les particules ne sont pas statiques, mais sont soumises au mouvement Brownien, principalement dû à l'agitation thermique. En mesurant l'intensité de la lumière diffusée au cours du temps, il est possible de déterminer la vitesse de mouvement des particules (Figure 36). Une des caractéristiques du mouvement Brownien est que les particules de petite taille bougent plus vite que les grosses. En utilisant l'équation de Stokes-Einstein (A) il est possible de relier la vitesse des particules à leur rayon hydrodynamique.

$$(A) R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

Avec R_H le rayon hydrodynamique, K_B la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité du fluide et D le coefficient de diffusion.

Le système NanoZS® (Malvern) est équipé d'un corrélateur numérique. En mesurant l'intensité en un point de la lumière diffusée par les particules et en la comparant à l'intensité de ce même point dans le temps il est possible d'observer une diminution du signal car les particules se déplacent des directions aléatoires (mouvement Brownien). Un détecteur (photomultiplicateur), situé à un angle précis par rapport au faisceau incident, mesure le taux de fluctuation de la lumière diffusée. Cette dernière est directement corrélée à la vitesse à laquelle les objets se déplacent dans le milieu. Plus la vitesse du mouvement brownien est importante et plus l'intensité lumineuse diffusée fluctue rapidement. La fonction d'autocorrélation $G(\Delta t)$ du signal (fluctuation d'intensité) est calculée, elle correspond au degré de cohérence trouvé aux instants t et $t+\Delta t$ pour une particule au même endroit. Plus la particule est petite, plus son mouvement brownien est important et plus ce degré de cohérence va décroître rapidement dans le temps. (Figure 36).²¹⁹

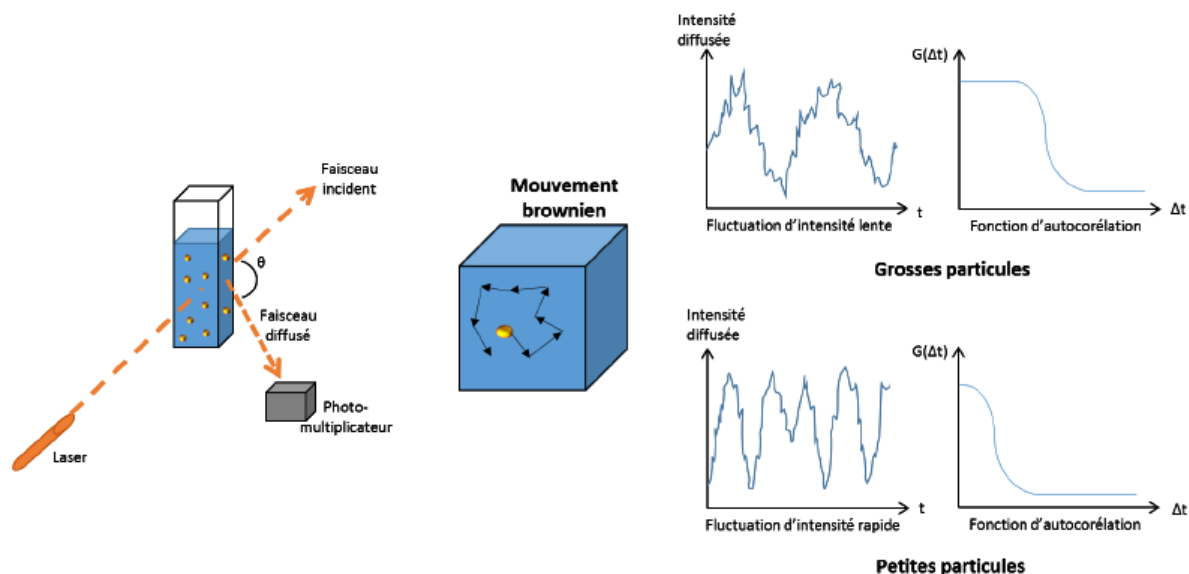


Figure 36. Principe de la DLS²¹⁹

Application : Les mesures de DLS seront utilisées pour déterminer les propriétés granulométriques des liposomes. Elles associent principalement deux valeurs, le diamètre moyen des particules et l'indice de polydispersité (PdI). Ce dernier permet d'estimer l'homogénéité de la taille des particules, il est calculé selon les documents 13321:1996 E et 22412 de l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO). Les échantillons possédant un PdI inférieur à 0,1 sont classiquement considérés comme étant monomodaux, ceux avec un PdI inférieur à 0,2, monodisperses.²²⁰

Determination du potentiel ξ

Le potentiel ξ décrit la charge que la particule porte en solution grâce aux ions qui l'entourent. La présence d'une charge nette à la surface de la particule entraîne une augmentation de la concentration d'ions de charges opposées au voisinage de la surface. Il existe donc 2 couches autour de la particule : une couche interne (couche de Stern) où les ions sont fortement liés par des interactions fortes et une couche diffuse où ils sont moins fermement attachés (Figure 37). Dans la couche diffuse lorsque la particule se déplace, certains des ions se déplacent avec elle. Au-delà d'une certaine limite les ions ne suivent pas la particule, cette limite définit le potentiel ξ .

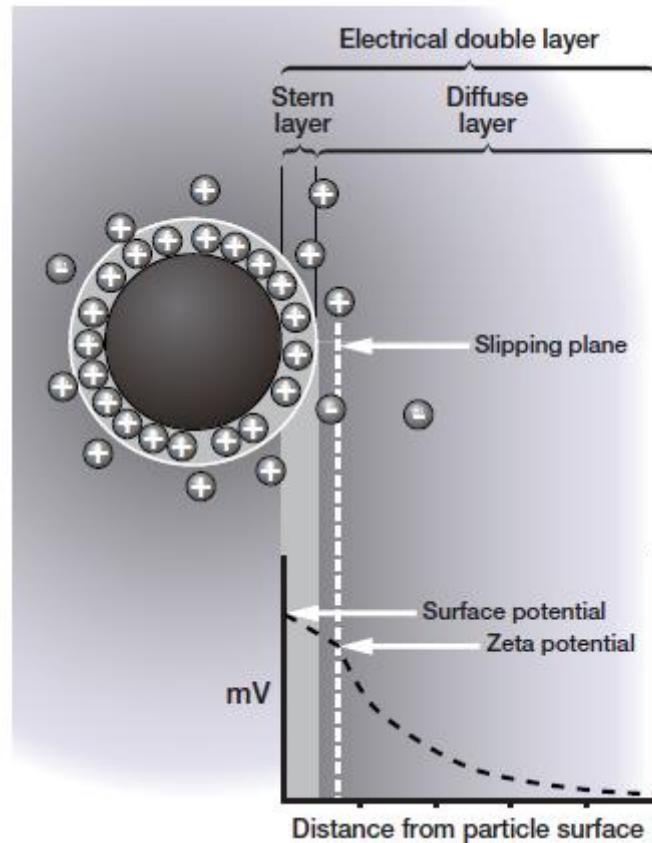


Figure 37. Représentation graphique du potentiel ζ ²²¹

Application : Les mesures permettront de caractériser les charges de surface des différentes formulations liposomales.

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Le protocole suivi est issu de Hein, *et al.* (2016).¹⁸⁵ La quantité de lipides est déterminée à l'aide d'un étalon interne de concentration connue : l'acide 2,2-diméthyl-2-silapentane-5-oïque (TMSP). En mesurant le spectre ¹H de l'échantillon, le déplacement chimique correspondant aux trois groupes méthyle du TMSP sort à 0 ppm alors que celui correspondant aux deux méthyle des chaînes d'acides gras des phospholipides sort environ à 0,9 ppm. L'intégration du signal des chaînes d'acides gras par rapport à celui du TMSP permet d'obtenir la concentration en lipides.¹⁸³

I-3. LES LIPOSOMES

Application : La formule initiale proposée par Hein, *et al.* (2016)¹⁸⁵ a été adaptée pour prendre en compte le rapport molaire du cholestérol et de la phosphatidylcholine :

$$C_{\text{lipid}} = \frac{3 C_{st} V_{st} I_{pL}}{2 V_{pL} I_{st}}$$

Avec C_{st} , V_{st} et I_{st} respectivement la concentration, le volume et l'intensité du standard et I_{pL} et V_{pL} l'intensité et le volume de solution lipidique dans l'échantillon.

(2) La concentration de cholestérol est calculée avec la formule :

$$C_{\text{chol}} = 3 \times 2 \times I_{\text{chol}}$$

(3) Sachant que le rapport molaire est respecté, il est possible de quantifier la quantité totale de lipides :

$$C_{\text{lipid}} = \frac{(\% \text{ lipid})}{(\% \text{ cholesterol})} \times C_{\text{chol}}$$

L'ensemble de ces techniques a contribué à l'élaboration du test paramétrique visant à caractériser *in fine* l'interactome molécules/ $A\beta$ /membranes et la discrimination de modulateurs de l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$, d'intérêt dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

I-3. LES LIPOSOMES

II. RESULTATS - DISCUSSION

II. RESULTATS - DISCUSSION

1. INTERACTIONS MOLECULES/MEMBRANES

Le premier axe du projet de thèse porte sur l'étude des interactions entre petites molécules et membranes biomimétiques. En utilisant des liposomes à base de phosphatidylcholine (PC) comme modèle simplifié de membranes, nous avons entrepris la détermination expérimentale du coefficient de partage (K_p) de molécules connues et d'un lead, potentiel candidat-médicament, le pyridoclast.

Le coefficient de partage est corrélé à la lipophilie des molécules dont la détermination est une étape cruciale dans le développement des molécules à visée thérapeutique. En effet, ce paramètre physico-chimique va directement influencer les étapes d'Absorption, de Distribution, de Métabolisation et d'Élimination (ADME) de la molécule. Il influence également son efficacité, en particulier si la molécule cible des membranes spécifiques ou des cibles insérées dans les membranes (récepteurs, protéines...). Généralement, ce paramètre est exprimé sous la forme de coefficient de partage entre 2 phases : n -octanol/ H_2O ($\log P_{o/w}$). Toutefois, la prédiction exacte du comportement de la molécule en milieu physiologique à partir de ce paramètre souffre de nombreuses limites. En effet les forces qui gouvernent et influent sur la répartition de la molécule dans l'environnement des membranes biologiques ne sont pas prises en compte lors de la détermination du $\log P_{o/w}$.

Ce paramètre s'avère ne pas être adapté pour estimer la partition de molécules polaires ou partiellement chargées alors que 2/3 des molécules développées par les industries pharmaceutiques sont ionisables. C'est dans cette perspective que nous nous sommes tournés vers l'utilisation de modèles membranaires tels que les liposomes afin de déterminer le coefficient de partage des molécules. L'avantage de leur utilisation réside dans la possibilité de moduler les conditions expérimentales pour mettre en évidence l'influence de certains facteurs sur les propriétés membranaires ou à l'inverse l'influence des propriétés membranaires sur certains facteurs. L'effet de paramètres tels que la composition lipidique, la température ou le pH peuvent être pris en compte ce qui n'est pas possible avec le système n -octanol/eau. Lorsqu'elles sont au stade de hit ou de lead, les molécules sont disponibles en faible quantité. Il convient donc de les caractériser finement tout en cherchant à miniaturiser les essais pour en limiter la consommation.

Ainsi, en transposant un protocole décrit dans la littérature, nous avons mis en place puis validé la détermination expérimentale du K_p de composés connus à partir de la caractérisation par techniques spectrophotométriques de leurs interactions avec des liposomes.

De grands liposomes unilamellaires (LUV) d'un diamètre d'une centaine de nm ont été formulés par un procédé d'hydratation du film lipidique couplé à une extrusion sur membranes en polycarbonate. Après validation de la méthode sur un panel de molécules connues, la méthode a été transposée au pyridoclax, lead anticancéreux prometteur et chef de file de molécules inhibitrices d'interactions protéine-protéine, d'intérêt potentiel dans le traitement de maladies neurodégénératives, en combinant différentes techniques de détection (spectroscopie UV-visible et spectroscopie de fluorescence).

L'ensemble de ces résultats a donné lieu à l'article « Microplate Assay for Lipophilicity Determination Using Intrinsic Fluorescence of Drugs: Application to a Promising Anticancer Lead, Pyridoclax », par Smeralda, W.; Since, M.; Corvaisier, S.; Legay, R.; Voisin-Chiret, A.-S.; Malzert-Freon, A., publié dans *Eur. J. Pharm. Sci.* en 2019 (131, 75-83). Il est inséré ci-après.¹⁸³

Microplate assay for lipophilicity determination using intrinsic fluorescence of drugs: application to a promising anticancer lead, pyridoclax

Willy Smeralda¹, Marc Since¹, Sophie Corvaisier¹, Rémi Legay¹, Anne-Sophie Voisin-Chiret¹, Aurélie Malzert-Freon^{1*}

¹Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN), Normandie Univ, UNICAEN F-14000 Caen, France

*corresponding author:

Aurélie Malzert-Fréon, Tel.: +33 231 566819; fax: +33 231 566020. *E-mail address:* aurelie.malzert-freon@unicaen.fr

Keywords: pyridoclax; partition coefficient; liposomes; drug-membrane interactions; drug discovery.

Abbreviations

CF	Carboxyfluorescein
CHOL	Cholesterol
DLS	Dynamic light scattering
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
EPC	Egg phosphatidylcholine
K _p	Partition coefficient
LUVs	Large unilamellar vesicles
SPC	Soybean phosphatidylcholine

1. Introduction

Pyridoclax was recently identified as the lead compound of an oligopyridine family, acting as a promising protein-protein interactions disruptor. Indeed, without being cytotoxic when administered as a single agent, pyridoclax is able to bind to Mcl-1. Hence, by sensitizing ovarian carcinoma cells to Bcl-x_L-targeting strategies, it induces apoptosis in ovarian, and also in lung, and mesothelioma cancer cells when it is administered in combination with Bcl-x_L-targeting siRNA or Bcl-x_L targeting molecules such as ABT-737 or its orally available derivative ABT-263 (Navitoclax) (Gloaguen et al., 2015).

In drug discovery and development, it is fundamental to determine the physico-chemical properties of drugs that will influence their drugability. Considering that lipophilicity will directly influence the absorption, distribution, metabolism and elimination (ADME) processes of a drug as its pharmacodynamics profile, determination of this physicochemical property is a crucial step in course of a drug candidate development (Testa et al., 2000).

Lipophilicity is generally expressed as the *n*-octanol/water partition coefficient of the uncharged solute ($\log P_{o/w}$). From the determination of many drug partition coefficients in isotropic biphasic *n*-octanol/water systems, large data banks have been constituted, now enabling useful *in silico* prediction of a drug's lipophilicity (Avdeef, 2003). However, the ability to precisely predict the behavior of drugs in biological systems from $\log P_{o/w}$ has some limitations since partitioning in biological membranes is not governed by the same physicochemical forces. In *n*-octanol/water systems, not all hydrophobic, H-bond, dipole-dipole and electrostatic interactions between drug and membrane can be considered (Austin et al., 1995). Liposome model membranes are widely used as a better alternative (Peetla et al., 2009). Indeed, they offer both the outer polar surface and the hydrophobic core of natural membranes, and it is possible to adjust their composition to exactly mimic membranes of interest.

Phosphatidylcholine (PC)-based Large Unilamellar Vesicles (LUVs) are often used as models since PC are major lipid components of cell membrane (Bourgau and Couvreur, 2014), and LUVs offer a similar curvature to the cell membrane (Lucio et al., 2010). Cholesterol may be also included since it represents an important component of biological membranes, involved in membrane fluidity, dynamics, structuration (rafts), or membrane fusion (Ambike et al., 2011, Cooper, 1979, Dufourc, 2008, Simons and Ehehalt, 2002, Yang et al., 2016). One advantageous method for the assessment of drug lipophilicity through the determination of its partition coefficient (K_p) using biomimetic membranes is based on spectrophotometry measurements.

With this non-separative method, it is possible to explore the changes in the absorption parameters (molar absorptivity (ϵ), maximum wavelength (λ_{\max}) of absorption) of the solute when it permeates from a polar to an apolar environment (Magalhães et al., 2010). Use of a microplate assay is particularly appealing, since in these conditions, the determination of K_p is rapid, not expensive, and assays being miniaturized, they require only small quantities of drug, that is very important to consider for a characterization work implied in the drug discovery step. Nevertheless, to date, and according to our knowledge, all reported microplate assays have used ultraviolet (UV)-visible spectrophotometry.

Considering that pyridoclastax is a fluorescent molecule maximum absorbing at 285 nm, and maximum emitting at 444 ± 2 nm in aqueous medium, it seems particularly appealing to use this intrinsic fluorescence to study its interactions with membranes.

So, we propose i). to determine K_p of pyridoclastax by transposing a high-throughput microplate assay, ii). to study the influence of the nature of the phospholipids on the experimental values, iii). and to explore the feasibility of the use of intrinsic fluorescence for the K_p determination in a miniaturized assay. Furthermore, as it is established that the use of biomimetic membranes permits also to highlight keys of the action mechanisms of molecules (Hendrich and Michalak, 2003, Pinheiro et al., 2013, Zepik et al., 2008), interactions between pyridoclastax and biomimetic membranes were further studied by a liposome leakage assay.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Soybean, Egg phosphatidylcholine (SPC and EPC, respectively) and 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) were gifts from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Chlorpromazine hydrochloride, diclofenac sodium salt, progesterone, propranolol, cholesterol (CHOL), reagent-grade DMSO, carboxyfluorescein, Triton X-100, Sepharose® CL-4B, and 3-(trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d₄ acid (TMSPP) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). HEPES buffer was obtained from Grosseron (Coueron, France). Sodium chloride was purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Indomethacin was obtained from Alfa Aesar (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Tripentone and Pyridoclastax were synthesized according to the processes previously described (Gloaguen et al., 2015, Lisowski et al., 2004).

2.2. Preparation of liposomes

2.2.1. Formulation of liposomes

Liposomes were formulated according to the adapted method of the thin lipid film hydration (Bangham et al., 1965). Lipid solutions in chloroform/methanol (4:1) were evaporated under nitrogen flow, and left under vacuum for 3-4 h to form a lipid film. This thin lipid film was then hydrated in Hepes buffer (50 mM, NaCl 107 mM, pH 7.4), and vortexed. Rehydrated lipid suspension was subjected to 5 hot/cold cycles from liquid nitrogen to a 40°C water bath (50°C for DPPC). At room temperature for SPC, EPC, and SPC:CHOL, or at 60°C for DPPC-based vesicles, the yielded multilamellar vesicles (MLVs) were then extruded 13 times with a mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama, USA) through polycarbonate membranes with a pore diameter of 100 nm (Avanti Polar Lipids, Inc.) to form LUVs.

2.2.2. Characterization of liposomes by dynamic light scattering

The average hydrodynamic diameter associated with the polydispersity index (PDI) of the formulated LUVs were measured by dynamic light scattering (DLS) using a NanoZS® apparatus (Malvern Instruments SA, Worcestershire, UK). The zeta potential was calculated from the electrophoretic mobility using the Smoluchowski equation, also using a NanoZS® apparatus. The measurements were performed in triplicate at 25°C, after a 1:100 dilution in the Hepes buffer after validation of the absence of the ionic strength influence on the measurements.

2.2.3. Dosage of liposomes by NMR spectroscopy

The lipid concentration of the formulated LUVs was quantified by ¹H NMR spectroscopy (Hein et al., 2016). ¹H NMR measurements were performed at ambient temperature for SPC, and EPC-based LUVS, or at 50°C for SPC:CHOL, and DPPC-based LUVs on a Bruker Avance III spectrometer (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) equipped with a 5 mm probehead operating at 400 MHz. The instrument's standard settings (90° pulse angle, 2.72 s acquisition time, 3 s relaxation delay, 15 ppm spectral width) were used. Locking and shimming was performed on the signal of the exchangeable deuterium atoms of the D₂O/CD₃OD mixtures. 64 scans were performed leading to a total acquisition time of 6 min 20 s. Data processing was performed with Topspin 3.5 After zerofilling to 64k data points, apodization (exponential and Gaussian functions, 1 Hz), Fourier transformation, phase- and baseline correction, the peak areas were determined by integration.

TMSP was used as an internal standard ($\delta = 0$ ppm). For samples with increased amounts of water, presaturation of the water peak ($\delta = 4.79$ ppm) was used to ensure that the dynamic range of the instrument was not exceeded during the measurement.

2.3. Determination of partition coefficient

2.3.1. Determination of partition coefficient by derivative UV-spectrophotometry

The partition coefficients (K_p) of the molecules were determined in presence of LUVs suspensions. 5 μL of each stock compound solution (750 μM in DMSO) was added to Hepes buffer (50 mM, 107 mM NaCl, pH 7.4) with increasing concentrations of phospholipids (0 to 900, 1000 or 4000 μM) to give a final volume of 250 μL . The corresponding reference solutions were identically prepared in absence of molecule. The microplate was incubated in a Biotek Synergy 2 microplate reader (Biotek, Colmar, France) at 37.0 $^\circ\text{C}$ or at 50.0 $^\circ\text{C} \pm 0.1$ $^\circ\text{C}$ for 1 hour with regular homogenization. The absorption spectra were then recorded using 1 nm wavelength interval in the 250-500 nm range at 37 $^\circ\text{C}$.

The corrected absorption spectra of compounds were obtained by subtracting the spectrum of the liposomal solution used at the same concentration. Spectra data recovery was performed using Microsoft[®] Excel[®] 2016. Second derivative spectra were calculated by using a second-order polynomial convolution of 9 points with GraphPad Prism (version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) (Magalhães et al., 2010).

The Nernst partition coefficient in liposome (Ribeiro et al., 2010) is defined as:

$$K_p = \frac{\frac{n_{S,L}}{V_L}}{\frac{n_{S,W}}{V_W}} \quad (1)$$

where $n_{s,i}$ are the number of moles of solute present in the aqueous ($i = W$) and in the lipid ($i = L$) phases. From equation 1, the fraction of membrane-bound solute (X_L) can be related to K_p , at a given experimental concentration in phospholipids ($[L]$), by the following equation:

$$X_L = \frac{n_{S,L}}{n_{S,L} + n_{S,W}} = \frac{K_p \cdot \gamma \cdot [L]}{1 + K_p \cdot \gamma \cdot [L]} \quad (2)$$

where γ is the phospholipid molar volume.

Introducing D_t , the variation of the derivative value of the absorbance spectrum of the molecule at a given λ (nm) and a given concentration of phospholipids (M), X_L can also be defined as follows (Santos et al., 2003):

$$X_L = \frac{D_t - D_w}{D_l - D_w} \quad (3)$$

where D_l corresponds to the derivative value of the absorbance spectrum of the molecule in the lipid phase, and D_w is the derivative value of the absorbance spectrum of the molecule in the aqueous phase.

Upon phospholipid titration, by following the variation of D_t , which changes upon membrane insertion and for which the ensemble average is a linear combination of the contribution of the molecules in the aqueous (D_w) or on the lipid (D_l) phase, the value of K_p can be obtained. Thus, from equation 4, the K_p value of studied molecules were determined after a non-linear regression analysis and a graph plotting performed with GraphPad Prism:

$$D_t = D_w + \frac{(D_l - D_w) \cdot K_p \cdot \gamma \cdot [L]}{1 + K_p \cdot \gamma \cdot [L]} \quad (4)$$

where γ is the phospholipid molar volume, equal to 0.75 L.mol⁻¹ for SPC (Marsh, 2013), 0.69 and 0.70 L.mol⁻¹ for EPC and DPPC, respectively (Nunes et al., 2013). These values may be considered as sensibly stable, also in presence of 20 % (w/w) cholesterol as previously shown for DMPC or DPPC (Gallová et al., 2017, Greenwood et al., 2006). From that, no additional γ was considered for cholesterol in all cases. All experiments were performed in triplicate, by using 3 measurements each time. Data are presented as means \pm standard deviation of the three experiments.

2.3.2. Determination of partition coefficient by fluorescence spectrophotometry

Once after measurements by UV-spectrophotometry, 100 μ L of the well's content was transferred in a black microplate for fluorescence measurements. The microplate was incubated for 20 min in a microplate reader (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Switzerland) for measurements performed at 37°C, or in a Synergy 2 microplate reader controlled by Gen 5 software (Biotek, Colmar, France) for those performed at 50°C. Excitation wavelengths of 285 nm and 236 nm were chosen to record emission fluorescence spectra of pyridoclastax ($\lambda_{em} = [350-550 \text{ nm}]$), and of capsaicin ($\lambda_{em} = [280-400 \text{ nm}]$), respectively.

As for UV-measurements (Ribeiro et al., 2010), by following the variation with [L] of F_t , and after liposomal blank correction, the value of K_p was obtained from equation 5:

$$F_t = F_w + \frac{(F_l - F_w) \cdot K_p \cdot \gamma \cdot [L]}{1 + K_p \cdot \gamma \cdot [L]} \quad (5)$$

where F_t is the fluorescence intensity of the fluorescence spectrum of the molecule at a given λ (nm) and a given concentration of phospholipids (L), F_l corresponds to the fluorescence intensity of the fluorescence spectrum of the molecule in the lipid phase, F_w is the fluorescence intensity of the fluorescence spectrum of the molecule in the aqueous phase, and γ is the phospholipid molar volume as previously described (see *Determination of partition coefficient by derivative UV-spectrophotometry*).

2.4. Liposomes leakage assay

Carboxyfluorescein (CF)-loaded LUVs were prepared by the same protocol than that used for blank LUVs, but after dissolution of 50 mM CF in the HEPES buffer used for the hydration step. The obtained LUVs were separated from possible unincorporated CF by passage through a Sepharose[®] CL-4B loaded (Sigma-Aldrich) column, using HEPES buffer as eluent. The LUVs size was assessed by DLS (NanoZS[®], Malvern Instruments, Worcestershire, UK) after a 1:100 dilution in the HEPES buffer. The entrapment of CF was verified by dequenching of fluorescence after the addition of 20 % (v/v) Triton X-100 measured with a Synergy 2 microplate reader (Biotek, Colmar, France) equipped with the appropriate filters ($\lambda_{ex} = 485/20$ nm and $\lambda_{em} = 528/20$ nm). CF release assay was performed in a final volume of 200 μ L, using 10 μ M LUVs in HEPES buffer. Pyridoclast, solubilized in DMSO, was then added to the solution to reach a final concentration ranging from 1 to 20 μ M. The fluorescence was recorded immediately (F_0) and for 3h at 25°C, using a Synergy 2 microplate at $\lambda_{ex} 485/20$ nm and $\lambda_{em} 528/20$ nm. It was compared with that measured at the end of the experiment after addition of 2 μ L of 20% Triton X-100 solution to achieve complete liposome leakage (F_{max}).

The percentage of CF release was calculated according to the following equation (Jimah et al., 2017) :

$$\% \text{ CF leakage (t)} = [(F_t - F_0) / (F_{max} - F_0)] \times 100 \quad (6)$$

where F_t was the fluorescence intensity at time t, F_0 the initial fluorescence intensity, and F_{max} the final fluorescence intensity after adding Triton X-100.

3. Results and discussion

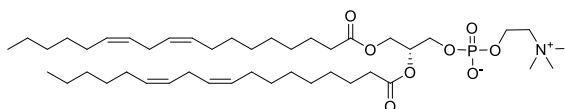
3.1. Determination of partition coefficient by a miniaturized derivative UV-spectrophotometry method

By using a microplate protocol adapted from that initially described by Magalhaes *et al.*, the determination of pyridoclasts K_p has been undertaken. Indeed, this miniaturized and simple method permits to rapidly provide partition coefficient values of drugs, and from that, it appears as well adapted to a drug discovery process. In the original microplate assay, hexadecylphosphocholine micelles were used to mimic the biomembranes (Magalhães *et al.*, 2010). Nevertheless, considering that liposomes are a less restricted membrane tool than micelles (suitable only for substances with high ϵ and $\log K_p > 3$) (Loureiro *et al.*, 2018), we have chosen to transpose the microplate assay to LUVs.

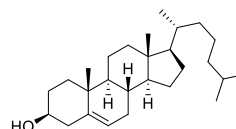
LUVs were used as membrane models because they present adequate characteristics of cell membrane models. Indeed, they are formed of a simple bilayer unlike multilamellar or multivesicular vesicles, (MLVs or MVVs). Their composition is flexible. It is possible to vary physicochemical parameters like pH, buffer composition, without detrimental repercussion on their stability unlike single unilamellar vesicles (SUVs) (Akbarzadeh *et al.*, 2013). Last, they are easier to produce and to manipulate than giant unilamellar vesicles (GUVs) (Bagatolli *et al.*, 1999, Tamba *et al.*, 2004). Taking into account these different properties, we have selected LUVs for experimental design of model membranes.

3.1.1. Preparation and characterization of liposomes

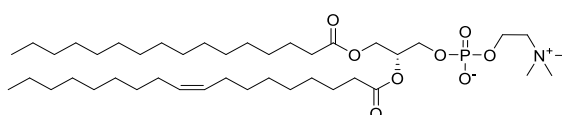
A. soybean phosphatidylcholine (SPC)



B. cholesterol (CHOL)



C. egg phosphatidylcholine (EPC)



D. dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)

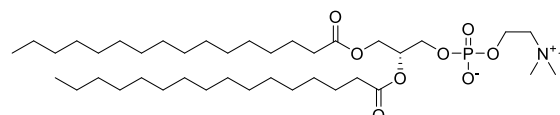
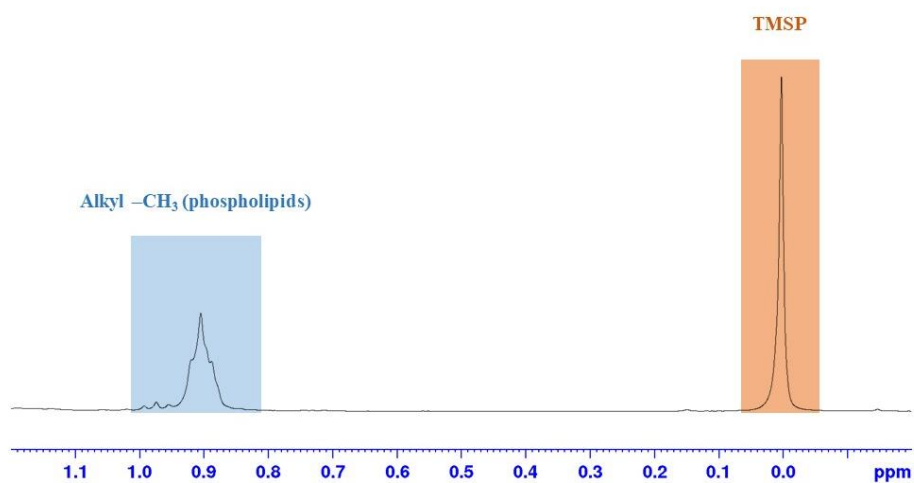


Fig. 1. Molecular structure of the lipids used for the formulation of the LUVs: **A.** SPC, **B.** cholesterol, **C.** EPC, **D.** DPPC

Soybean PhosphatidylCholine (SPC), Egg PhosphatidylCholine (EPC), DiPalmitoyl PhosphatidylCholine (DPPC), and mixed SPC/cholesterol (SPC/CHOL, 80:20, w/w) large unilamellar vesicles (LUVs) were produced by the classical thin hydration method, followed by an extrusion through polycarbonate filters (Fig. 1).

Their granulometric properties were similar, characterized by an average diameter about 130 nm, and homogeneous in size as indicated by the polydispersity index (PDI) values lower than 0.1 (Table 1). Only in the case of SPC/CHOL vesicles, the diameter was slightly lower, probably because of an increased packing of lipids due to cholesterol (Alves et al., 2017). In all cases, ζ potential values were neutral, in coherence with the chemical structure of the lipids used (Fig. 1).

A.



B.

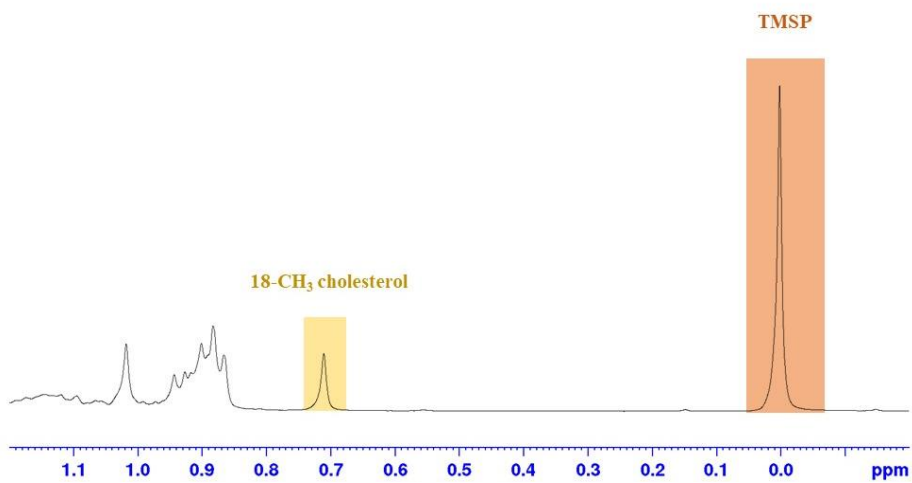


Fig. 2. ¹H NMR spectra of **A.** SPC-, and **B.** SPC-CHOL-based-LUVs

For each LUVs formulation, the phospholipid concentration was precisely determined by a ^1H NMR (Hein et al., 2016). In the method we used, a defined volume of the prepared LUVs stock solution was first totally solubilized in deuterated chloroform, and a defined amount of 3-(trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d $_4$ acid (TMSP) was then added to the solution as internal standard ($\delta = 0$ ppm). In these conditions, the signal at ca. 0.88 ppm, well separated from all other peaks, can be assigned to the terminal methyl groups of the phospholipid's fatty acid side chains. As this ^1H NMR method allows determination of total phospholipid content of lipid mixtures with different head groups, and fatty acid acyl side chains (Fig. 2.A), it was efficiently transposed to the different formulated LUVs, also originally, in presence of cholesterol (Fig. 2.B). The only requirement for LUVs formulated in presence of cholesterol or DPPC was to maintain a heating of samples at 50°C to avoid solubility issues. To obtain a more well-defined peak for the integration in presence of cholesterol, SPC/CHOL-based LUVs (80:20) were quantified using the C18 methyl group of cholesterol ($\delta = 0.67$ ppm). So, this quantification method can be efficiently proposed in routine for characterization of LUVs of various compositions. Content in lipids [L] of various studied liposomal formulations are presented in Table 1. These experimental values have been further used in equation 4 for K_p determination (*see 3.1.3.*).

Table 1. Characteristics of the LUVs (n = 3) determined directly at the end of the formulation process.

Composition	% (w/w)	Diameter (nm)	PDI	ζ potential (mV)	[C] (mM)
SPC	100	134.8 ± 1.6	0.064 ± 0.019	-2.1 ± 0.4	31.5 ± 0.2
EPC	100	134.0 ± 0.9	0.076 ± 0.004	-1.4 ± 0.4	29.8 ± 0.4
DPPC	100	129.7 ± 0.5	0.071 ± 0.009	0.6 ± 0.1	24.5 ± 0.1
SPC/CHOL	80:20	121.0 ± 0.5	0.062 ± 0.019	-3.1 ± 0.1	43.0 ± 0.8

3.1.2. Molecules used as references

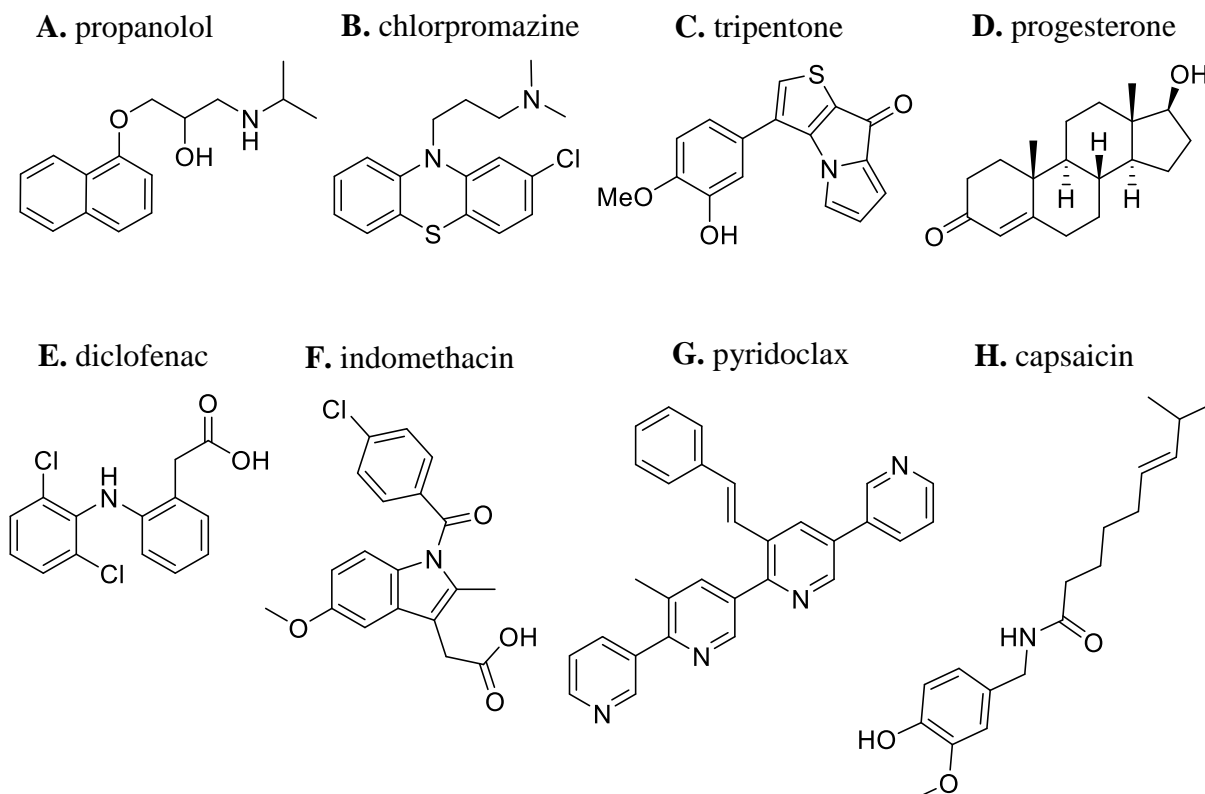


Fig. 3. Molecular structure of the tested molecules: **A.** propranolol, **B.** chlorpromazine, **C.** triptentone, **D.** progesterone, **E.** diclofenac, **F.** indomethacin, **G.** pyridoclast, **H.** capsaicin.

To establish the K_p method, we first used SPC-based LUVs and several drugs whose properties permit to cover a relatively large range of logP values. Molecules have been selected to have a suitable UV absorption, *i.e.* with a number of π bonds > 3 (Loureiro et al., 2018), and to be either bases (propranolol, chlorpromazine), neutral molecules (triptentone, progesterone), or acids (diclofenac, indomethacin) (Fig. 3).

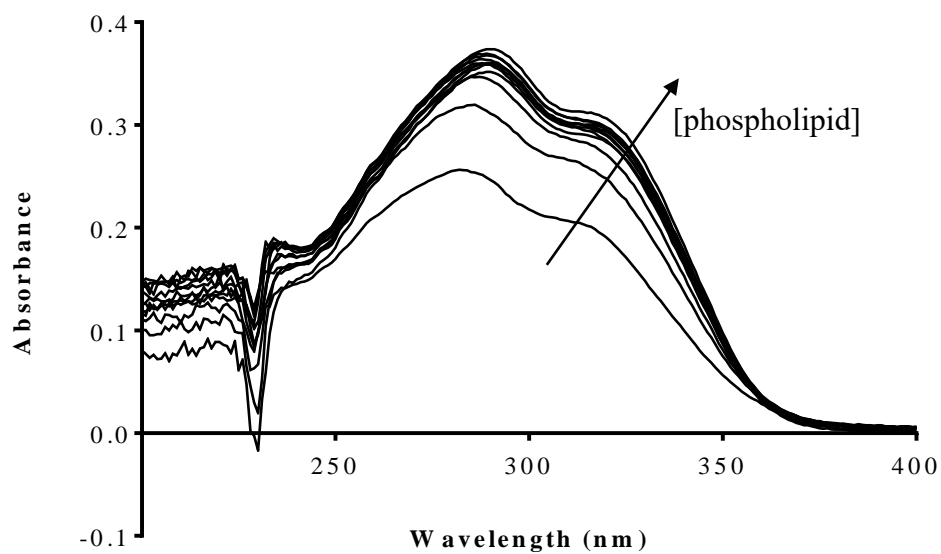
All molecules were assayed at a fixed final concentration of 15 μ M, since such a concentration provides UV signals, that were suitable for analysis, after derivatization of the UV-spectra too. Moreover, such a weak solute concentration is poorly molecule consumable, and permits also to minimize deviation from the Nernst conditions, *i.e.*, to ensure complete solubilization of the molecule in both phases, and to minimize solute own volume in the lipid phase. In order to avoid any precipitation in working intermediate solutions, compounds were directly added from a concentrated DMSO solution to increasing concentrations of SPC based-LUVs in HEPES buffer.

It was checked that, in these conditions, the final percentage of DMSO, equal to 2% (v/v), didn't significantly impact calculated K_p values (data not shown). After recording the UV-spectra, the data management was performed from the calculation of the second-derivative spectrophotometer data, collected at defined wavelengths for each molecule in the presence of increasing LUVs concentration (Table 2). Indeed, the use of second-derivative spectra permits to eliminate the background caused by light scattering of phospholipids, and to identify an isobestic point at the vicinity of which a wavelength can be chosen to highlight the shift of observed D_t with increasing phospholipids concentration (Magalhães et al., 2010).

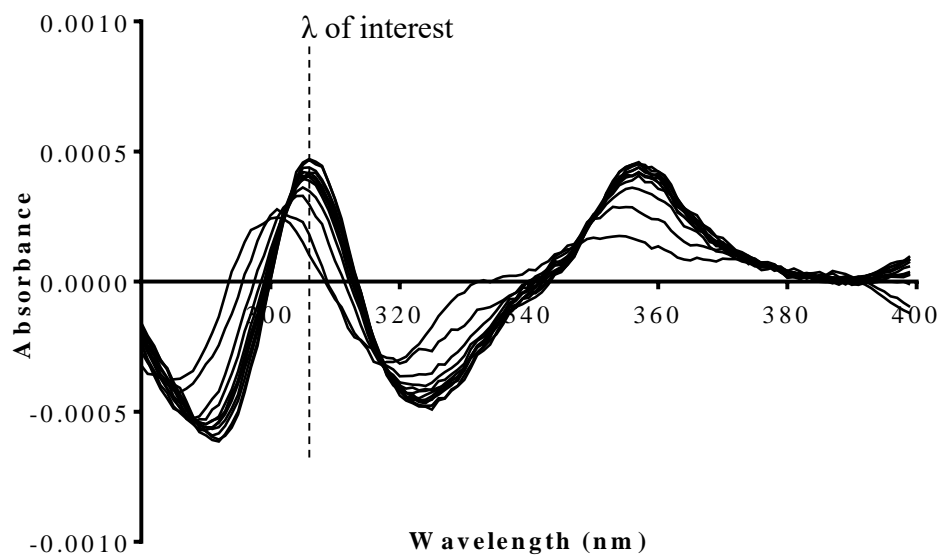
Experimental values determined for the 6 molecules appeared in accordance with those previously described in the literature (Table 2). The experimental $\log K_p$ values were in the same magnitude than $\log D_{7.4}$ for neutral compounds. For the ionized molecules, $\log K_p$ were higher than $\log D_{7.4}$ with a difference from 0.3 to 3 log units, which is inversely correlated to the $\log K_p$ value. This may be explained by the fact, that, for the charged forms of the drugs at pH 7.4, the membrane partition of molecules is influenced by electrostatic forces between the positively charged propranolol or chlorpromazine and the negatively charged phosphate group of SPC, or between its positively charged ammonium group and the negatively charged diclofenac or indomethacin (Fig. 1,3).

3.1.3. Partition coefficient of pyridoclast determined by a miniaturized derivative UV-spectrophotometry method

A.



B.



C.

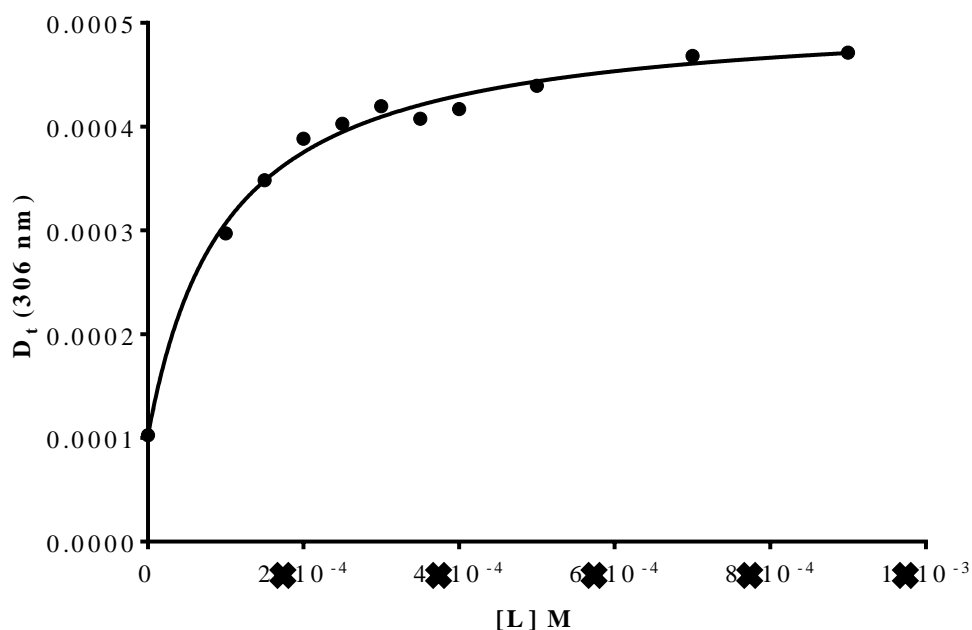


Fig. 4. A. Absorption spectra, and **B.** second-derivative spectra of pyridoclox (15 μ M) incubated for 1h in the presence of increasing concentrations of phospholipids (SPC-LUVs: 0 to 900 μ M) in Hepes buffer (pH 7.4) at 37°C. After determination of the wavelength of interest at the vicinity of an isobestic point, D_t , the total membrane second-derivative intensity values were defined at $\lambda=306$ nm. **C.** D_t were then plotted in function of the concentration of phospholipids. From this fitted non-linear regression curve, K_p value of pyridoclox was determined using equation (1).

Table 2. Partition coefficients (expressed as K_p , and $\log K_p$) of the different molecules (15 μ M) using SPC-based LUVs as model membranes at pH 7.4 and 37°C (n=3), and compared with values (ref $\log K_p$ and ref $\log D$) found in the literature,ⁱ (Alves et al., 2017),ⁱⁱ (Avdeef, 2003),ⁱⁱⁱ (Castro et al., 2001),^{iv} (Lucio et al., 2010),^v (Pereira-Leite et al., 2013),^{vi} (Tomasina, 2009). pK_a and maximum emission wavelengths used for the analysis were also defined in this table.

	Propranolol	Chlorpromazine	Tripentone^{vi}	Progesterone	Diclofenac	Indomethacin
K _p	712 ± 312	5,828 ± 684	6,442 ± 799	1,432 ± 313	663 ± 106	1,244 ± 204
log K _p	2.73	3.77	3.81	3.16	2.79	3.09
ref log K _p	2.9 ⁱⁱ	3.9 ^v	-	3.5 ⁱ	3.08 ^{iv}	3.15 ⁱⁱⁱ
ref log D _{7.4} ⁱⁱ	1.41	3.45	3.94	3.48	1.30	0.68
pK _a	9.42	9.30	9.17	-	4.15	4.50
Type	Base	Base	Neutral	Neutral	Acid	Acid
λ (nm)	309	271	336	273	285	297

K_p of pyridoclastax was then determined by UV-spectrophotometry according to the validated protocol, by using a fixed concentration of drug (15 μM) and increasing concentrations of SPC-based LUVs at pH 7.4 and 37°C (Fig. 4). After recording the UV-spectra (Fig. 4.A), the data management was performed. The second-derivative spectra data highlighted three isobestic points (Fig. 4.B). The shift observed at λ_{max} of 306 nm with increasing concentration of phospholipids, particularly provided a clear indication that pyridoclastax partitions from the aqueous phase to the LUVs as translated by sensitive differences in absorbance values. From the fitted non-linear regression curve obtained from the plot of the total membrane second-derivative intensity values (D_t) monitored at this λ_{max} of 306 nm (Fig. 4.C), and by applying equation 4, the partition coefficient of pyridoclastax was found to be equal to 4.11 ± 0.09 (Table 3). This value is consistent with the experimental log P value of 4.4 previously reported, and experimentally defined by a chromatographic method (Groo et al., 2017).

It is smaller than the calculated logP prediction of 5.83, performed using ChemAxon software (Marvin 16.1.4.0, 2016, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com/>)). Thus, pyridoclastax appears as a lipophilic drug, which is relative to the presence of four central pyridines in its scaffold, and that of a lateral styryl hydrophobic group, that reinforces its lipophilic character.

Table 3. Partition coefficients (expressed as K_p , and $\log K_p$) of pyridoclastax (15 μ M) determined by using LUVs made of various lipids (SPC, EPC, DPP, or mixed SPC/cholesterol (80:20, w/w), at pH 7.4 and 37°C or 50°C (n=3).

	K_p		$\log K_p$	
	UV	Fluorescence	UV	Fluorescence
SPC (37°C)	13,164 \pm 2,702	11,637 \pm 3,785	4.11	3.97 (λ =418 nm) 4.03 (λ =442 nm) 4.07 (λ =446 nm)
EPC (37°C)	9,251 \pm 625	10,596 \pm 1,643	3.97	4.02
DPPC (37°C)	1,989 \pm 314	1,450 \pm 394	3.30	3.15
SPC/CHOL (37°C)	4,045 \pm 284	4,290 \pm 1,132	3.61	3.63
SPC (50°C)	9,450 \pm 1,048	10,574 \pm 1,058	3.97	4.02
EPC (50°C)	9,600 \pm 3,297	7,104 \pm 508	3.97	3.85
DPPC (50°C)	5,243 \pm 1,684	4,230 \pm 767	3.70	3.62

Considering that the most basic pKa value is 4.89 for pyridoclastax (calculated using ChemAxon software), the molecule exists in a predominant unionized form at pH 7.4. So, the membrane partition of pyridoclastax appears as mostly influenced by hydrophobic interactions rather than by electrostatic forces. By keeping the protocol unchanged, K_p of pyridoclastax was further assessed at pH 7.4 and at 37 or 50°C, in presence of LUVs formulated from SPC, EPC, DPPC, or mixed SPC/CHOL (80:20, w/w). From results (Table 3), the partition coefficient values of pyridoclastax appeared in the same magnitude order, *i.e.* $\log K_p \sim 4.0$, if determined by using SPC or EPC based liposomes, at 37 or 50°C. Thus, SPC-LUVs could be considered as a biomimetic membrane model particularly suitable for drug discovery studies since this inexpensive raw material permits to characterize interactions of original drugs with membranes as other more expensive but more largely used raw materials do.

Moreover, results showed that, whatever the temperature was, the partition coefficient value was lower with DPPC membranes than with SPC-based LUVs, but slightly increased at 50°C. SPC is a phospholipids mixture, mainly composed of linoleic acid (approximately 59-70 % according to the supplier), a bi-unsaturated fatty acid (18:2).

Although the fatty acid chain length is poorly different from that of DPPC (16:0), presence of two unsaturated bonds can increase the membrane fluidity, and decrease the energy required for the drug to penetrate within the membrane (Stubbs and Smith, 1984). At both temperatures of experiments, SPC and EPC present a disordered liquid-crystalline phase since their phase transition temperature are -20 and -8 °C, respectively. On the contrary, at 37°C, *i.e.* below the DPPC T_m (41°C), the DPPC lipids are present in an ordered gel state, making the penetration of pyridoclast more difficult within the membrane. The fact that with membranes composed of SPC/CHOL (80:20, w/w), the partition coefficient of pyridoclast was smaller than with the SPC-based LUVs indicates also that by increasing packing of lipids, the membrane becomes less accessible to pyridoclast. Indeed, it is known that the addition of cholesterol causes a decrease in membrane fluidity (Alves et al., 2017). In this case, the amount of drug able to partition into membranes being decreased, K_p value became directly affected and lowered.

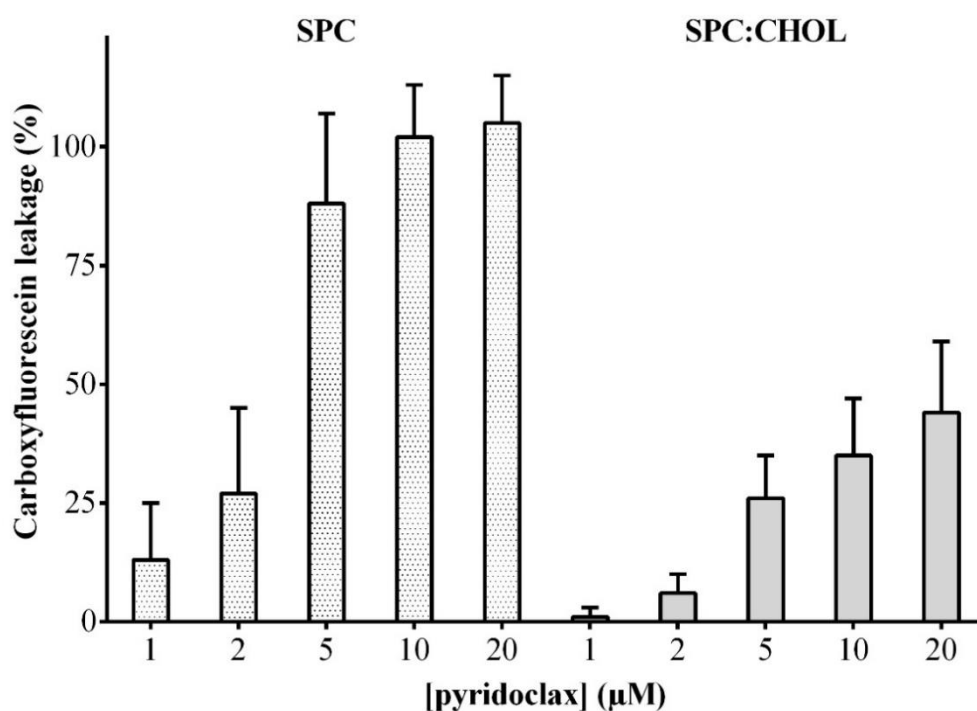


Fig. 5. Carboxyfluorescein leakage from SPC or SPC/cholesterol (80:20, w/w) liposomes (10 µM) as a function of pyridoclast concentration (1, 2, 5, 10, 20 µM) after 3h of incubation at 25°C. Each data point represents the mean of three determinations.

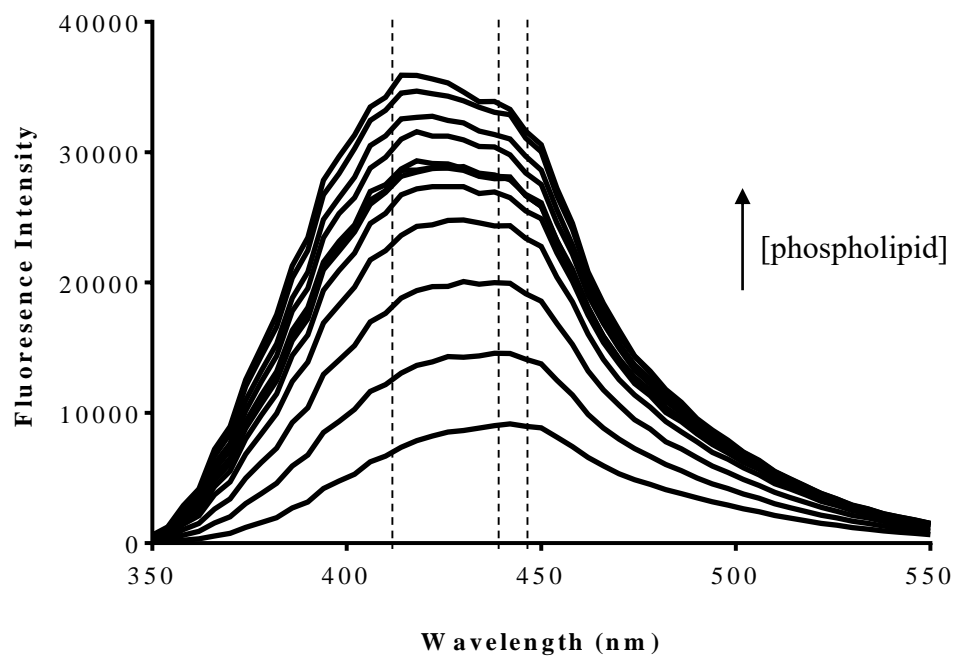
Table 4. Characteristics of the CF-loaded LUVs determined directly at the end of the formulation process (n=3).

Composition	Diameter (nm)	PDI	ζ potential (mV)
CF-SPC	143.1 ± 0.7	0.051 ± 0.023	-0.8 ± 0.2
CF-SPC/CHOL	135.5 ± 1.1	0.060 ± 0.004	-3.0 ± 1.4

Considering that drug-membranes interactions may be correlated with the permeabilization of the lipid bilayer, pyridoclastax was assayed for its membrane-disruptive properties by carboxyfluorescein (CF) leakage from liposomes. CF-loaded LUVs, formulated from either SPC-, or SPC/CHOL (80:20, w/w) were used. In comparison with blank LUVs (Table 1), encapsulation of the fluorophore led to a slight increase in the average diameter of the liposomes, less pronounced in presence of cholesterol (Table 4). Nevertheless, in both cases, LUVs populations remain monodisperse in size, and present a surface potential close to zero (Table 4). Assays were performed by keeping their final phospholipid concentration (10 μM) unchanged in HEPES buffer. From Fig. 5, pyridoclastax displayed a concentration-dependent membrane disruptive effect. Such appearance of lipid defects in the membrane upon exposure to pyridoclastax could participate to the biophysical mechanisms contributing to the efficacy, and/or toxicity of this promising lead, as it was previously reported for other anticancer drugs (Engelk et al., 2001, Lucio et al., 2010). It appeared also the membrane permeabilization upon pyridoclastax exposure was considerably decreased by employing the more rigid cholesterol-containing liposomes. As physiological membranes present variable proportions in cholesterol, the ability of pyridoclastax to interpenetrate within them could differ according the cellular type (de Oliveira Andrade, 2016).

3.1.4. Partition coefficient of pyridoclastax determined by a miniaturized fluorescence spectrophotometry method

A.



B.

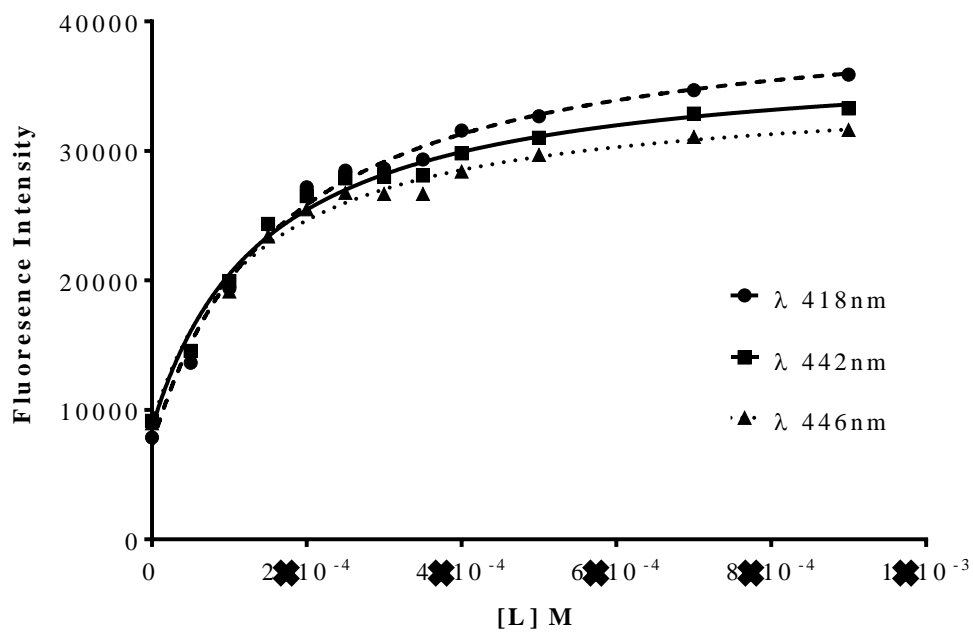


Fig. 6. A. Emission spectra of pyridoclax (15 μM , $\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$) incubated in the presence of increasing concentrations of SPC-LUVs (0 to 900 μM) in Hepes buffer (pH 7.4) at 37°C. **B.** The analysis wavelengths for non-linear regression were either the maximum (418 nm), that appeared during the experiments by increasing phospholipids concentration, or the emission wavelengths of the molecule (442-446 nm). From the fitted non-linear regression curve obtained by plotting fluorescence intensities, K_p value of pyridoclax was determined after applying equation (2).

Pyridoclax is a fluorescent molecule absorbing at 285 nm and emitting with a maximal intensity in the range 442-446 nm in aqueous medium. This intrinsic fluorescence originates from the presence of 4 pyridines in the scaffold, and is also influenced by the presence of a styryl group (Fig. 3.G) (Gloaguen et al., 2015). The same samples than those previously used for pyridoclax's K_p determination by UV measurement were then assayed by fluorescence spectrophotometry.

By increasing lipid concentration, the fluorescence signal intensity of pyridoclax significantly increased, and emission maxima progressively shifted from the range 442-446 nm towards 418 nm (Fig. 6.A). Such a shift of the emission maximum may reflect a molecule transition from polar (water) to a less polar environment (membrane), whereas an increase of fluorescence intensity may indicate immobilization of the compound within the membrane. Thus, it appeared that by measurement of the intrinsic fluorescence of the molecule, interactions between the drug and membranes could be highlighted. Only after blank correction, fluorescence intensity values measured at either 418, 442, or 446 nm were plotted in function of the phospholipid concentrations (Fig. 6.B). In all cases, K_p values were determined and appeared similar.

Comparable results have been also obtained at a lower pyridoclax concentration (5 μM) and in another aqueous buffer such as PBS (results not shown). Assays have been performed by using SPC, EPC, DPP, or mixed SPC/cholesterol (80:20, w/w), at pH 7.4 and 37°C or 50°C. Whatever the conditions, the interactions between pyridoclax and membranes can be determined (Table 3). Log K_p values of pyridoclax defined by the fluorescence method appeared identical to those obtained by UV spectrophotometry, and effects of the composition or the fluidity of the membrane on the partition of the drug into these mimetic models can be also highlighted.

Only few studies report the follow in the fluorescence changes to determine drug-membrane interactions. Fluorescence anisotropy measurements have been proposed to investigate lipophilicity of fluorescent drugs, but light scattering by liposomes was considered as a hampering factor (Pallicer and Krämer, 2012). Fluorescence quenching measurements have been also carried out, but required use of an external fluorophore (Ferreira et al., 2005). Study of interactions of capsaicin with lipid bilayer membranes was performed using its intrinsic fluorescence but was realized thanks to a fluorescence spectrophotometer (Swain and Kumar Mishra, 2015).

Interestingly, we transposed our miniaturized fluorescence method to capsaicin (Fig. 3.H), and the partition coefficient was determined: $K_p = 2,954 \pm 619$, corresponding to $\log K_p = 3.46$. This value appeared coherent with that measured by the miniaturized derivative UV-spectrophotometry method: $K_p = 6,394 \pm 2,619$, corresponding to $\log K_p = 3.79$, confirming the interest of this approach.

From that, the microplate reader provides a rapid assay, by requiring only limited quantities of drugs, that is particularly appealing in drug discovery since available amounts of leads remain low at this drug development stage.

Moreover, this method can be advantageously proposed to confirm results obtained in UV. It also appears as an alternative sensitive and rapid approach to UV detection, in particular for substances with low molar absorption coefficient (Loureiro et al., 2018), and by avoiding the calculation of the second-derivative spectrophotometer data, it permits a simplified data management, and a gain in sensitivity.

4. Conclusion

Lipophilicity must be necessarily determined in drug discovery since this physicochemical property will directly influence the pharmacokinetics of a drug as its pharmacodynamics profile. Thanks to our analytical approach based on a microplate assay, and raw fluorescence spectrophotometry by taking advantage of drug intrinsic fluorescence, Kp's pyridoclox was determined. This rapid and sensitive method, transposable to other fluorescent drugs, appears particularly appealing for drug discovery since it permits to assess the lead partition coefficients by requiring only few drug amounts. Being applicable to liposomes with various phospholipid composition, it also permits to highlight impact of the membrane fluidity on drug-membranes interactions. This method can be advantageously proposed to confirm results obtained in UV. It also appears as an alternative sensitive and rapid approach to UV detection, in particular for intrinsic fluorescence gifted substances with low molar absorption coefficient.

Acknowledgments

W. Smeralda was recipient of a doctoral fellowship from the French State (Research Ministry). This work was financially supported by the Region Normandie and the European Union *via* the European Regional Development Fund (FEDER).

References associated with this article

- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K., 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* 8, 102.
<https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- Alves, A.C., Ribeiro, D., Horta, M., Lima, J.L.F.C., Nunes, C., Reis, S., 2017. The daunorubicin interplay with mimetic model membranes of cancer cells: A biophysical interpretation. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1859, 941–948.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.034>
- Ambike, A., Rosilio, V., Stella, B., Lepêtre-Mouelhi, S., Couvreur, P., 2011. Interaction of Self-Assembled Squalenoyl Gemcitabine Nanoparticles with Phospholipid–Cholesterol Monolayers Mimicking a Biomembrane. *Langmuir* 27, 4891–4899. <https://doi.org/10.1021/la200002d>
- Austin, R.P., Davis, A.M., Manners, C.N., 1995. Partitioning of ionizing molecules between aqueous buffers and phospholipid vesicles. *J. Pharm. Sci.* 84, 1180–1183.
- Avdeef, A., 2003. Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- Bangham, A.D., Standish, M.M., Watkins, J.C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238-IN27.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)
- Bourgaux, C., Couvreur, P., 2014. Interactions of anticancer drugs with biomembranes: What can we learn from model membranes? *J. Controlled Release* 190, 127–138.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.012>
- Cooper, R.A., 1979. Cholesterol on Membrane Fluidity and Cell, in: *Normal and Abnormal Red Cell Membranes: Proceedings of the ICN-UCLA Symposium Held at Keystone, Colorado, March 1978.* AR Liss, p. 135.
- de Oliveira Andrade, L., 2016. Understanding the role of cholesterol in cellular biomechanics and regulation of vesicular trafficking: The power of imaging. *Biomed. Spectrosc. Imaging* 5, S101–S117. <https://doi.org/10.3233/BSI-160157>
- Dufourc, E.J., 2008. Sterols and membrane dynamics. *J. Chem. Biol.* 1, 63–77.
<https://doi.org/10.1007/s12154-008-0010-6>
- Engelk, M., Bojarski, P., Bloss, R., Diehl, H., 2001. Tamoxifen perturbs lipid bilayer order and permeability: comparison of DSC, fluorescence anisotropy, laurdan generalized polarization and carboxyfluorescein leakage studies. *Biophys. Chem.* 90, 157–173.
- Ferreira, H., Lúcio, M., Lima, J.L.F.C., Matos, C., Reis, S., 2005. Effects of diclofenac on EPC liposome membrane properties. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 1256–1264.
<https://doi.org/10.1007/s00216-005-3251-z>
- Gallová, J., Želinská, K., Balgavý, P., 2017. Partial molecular volumes of cholesterol and phosphatidylcholine in mixed bilayers. *Eur. Pharm. J.* 64, 1–3.
<https://doi.org/10.1515/afpuc-2017-0012>
- Gloaguen, C., Voisin-Chiret, A.S., Sopkova-de Oliveira Santos, J., Fogha, J., Gautier, F., De Giorgi, M., Burzicki, G., Perato, S., Pétigny-Lechartier, C., Simonin-Le Jeune, K., Brotin, E., Goux, D., N'Diaye, M., Lambert, B., Louis, M.-H., Ligat, L., Lopez, F., Juin, P., Bureau, R., Rault, S., Poulain, L., 2015. First Evidence That Oligopyridines, α -Helix Foldamers, Inhibit Mcl-1 and Sensitize Ovarian Carcinoma Cells to Bcl-x_L - Targeting Strategies. *J. Med. Chem.* 58, 1644–1668.
<https://doi.org/10.1021/jm500672y>

- Greenwood, A.I., Tristram-Nagle, S., Nagle, J.F., 2006. Partial molecular volumes of lipids and cholesterol. *Chem. Phys. Lipids* 143, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.04.002>
- Groo, A.-C., De Pascale, M., Voisin-Chiret, A.-S., Corvaisier, S., Since, M., Malzert-Fréon, A., 2017. Comparison of 2 strategies to enhance pyridocloxacin solubility: Nanoemulsion delivery system versus salt synthesis. *Eur. J. Pharm. Sci.* 97, 218–226.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.11.025>
- Hein, R., Uzundal, C.B., Hennig, A., 2016. Simple and rapid quantification of phospholipids for supramolecular membrane transport assays. *Org. Biomol. Chem.* 14, 2182–2185.
<https://doi.org/10.1039/c5ob02480c>
- Hendrich, A.B., Michalak, K., 2003. Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells. *Curr. Drug Targets* 4, 23–30.
- Jimah, J.R., Schlesinger, P.H., Tolia, N.H., 2017. Liposome Disruption Assay to Examine Lytic Properties of Biomolecules 16.
- Lisowski, V., Léonce, S., Kraus-Berthier, L., Sopková-de Oliveira Santos, J., Pierré, A., Atassi, G., Caignard, D.-H., Renard, P., Rault, S., 2004. Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Thienopyrrolizines as Antitubulin Agents. *J. Med. Chem.* 47, 1448–1464. <https://doi.org/10.1021/jm030961z>
- Loureiro, D.R.P., Soares, J.X., Lopes, D., Macedo, T., Yordanova, D., Jakobtorweihen, S., Nunes, C., Reis, S., Pinto, M.M.M., Afonso, C.M.M., 2018. Accessing lipophilicity of drugs with biomimetic models: A comparative study using liposomes and micelles. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 115, 369–380.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.029>
- Lucio, M., Lima, J., Reis, S., 2010. Drug-membrane interactions: significance for medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.* 17, 1795–1809.
- Magalhães, L.M., Nunes, C., Lúcio, M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., 2010. High-throughput microplate assay for the determination of drug partition coefficients. *Nat. Protoc.* 5, 1823–1830. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.137>
- Marsh, D., n.d. *Handbook of Lipid Bilayers*. Boca Raton: CRC Press.
- Nunes, C., Lopes, D., Pinheiro, M., Pereira-Leite, C., Reis, S., 2013. In Vitro Assessment of NSAIDs-Membrane Interactions: Significance for Pharmacological Actions. *Pharm. Res.* 30, 2097–2107. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1066-8>
- Pallicer, J.M., Krämer, S.D., 2012. Evaluation of fluorescence anisotropy to assess drug–lipid membrane partitioning. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 71, 219–227.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.08.009>
- Peetla, C., Stine, A., Labhassetwar, V., 2009. Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery. *Mol. Pharm.* 6, 1264–1276. <https://doi.org/10.1021/mp9000662>
- Pinheiro, M., Nunes, C., Caio, J.M., Moiteiro, C., Lúcio, M., Brezesinski, G., Reis, S., 2013. The Influence of Rifabutin on Human and Bacterial Membrane Models: Implications for Its Mechanism of Action. *J. Phys. Chem. B* 117, 6187–6193.
<https://doi.org/10.1021/jp403073v>
- Ribeiro, M.M.B., Melo, M.N., Serrano, I.D., Santos, N.C., Castanho, M.A.R.B., 2010. Drug–lipid interaction evaluation: why a 19th century solution? *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 449–454. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.06.007>
- Santos, N.C., Prieto, M., Castanho, M.A.R.B., 2003. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochim. Biophys. Acta* 1612, 123–135.
- Simons, K., Ehehalt, R., 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 597–603. <https://doi.org/10.1172/JCI200216390>

- Stubbs, C.D., Smith, A.D., 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* 779, 89–137. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(84\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0304-4157(84)90005-4)
- Swain, J., Kumar Mishra, A., 2015. Location, Partitioning Behavior, and Interaction of Capsaicin with Lipid Bilayer Membrane: Study Using Its Intrinsic Fluorescence. *J. Phys. Chem. B* 119, 12086–12093. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b05351>
- Testa, B., Crivori, P., Reist, M., Carrupt, P.-A., 2000. The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: concepts and examples. *Perspect. Drug Discov. Des.* 19, 179–211.
- Yang, S.-T., Kreuzberger, A.J.B., Lee, J., Kiessling, V., Tamm, L.K., 2016. The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem. Phys. Lipids* 199, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.05.003>
- Zepik, H.H., Walde, P., Kostoryz, E.L., Code, J., Yourtee, D.M., 2008. Lipid Vesicles as Membrane Models for Toxicological Assessment of Xenobiotics. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 1–11. <https://doi.org/10.1080/10408440701524519>

2. INTERACTIONS A β /MEMBRANES

Le processus d'auto-assemblage du peptide A β est piloté par des réactions microscopiques complexes et est influencé par une interaction spécifique avec les membranes. En effet, une corrélation a été établie entre la toxicité de certains intermédiaires A β et leur propension à perturber les membranes. Des études ont montré que selon leur conformation secondaire, notamment en feuillets β antiparallèles, les formes oligomériques interagissaient de façons très différentes avec les membranes et pouvaient conduire à des effets toxiques variables.

Afin de pouvoir étudier les modulations de l'agrégation du peptide A β , il a été nécessaire d'établir des conditions expérimentales permettant de suivre de façon reproductible la cinétique d'agrégation du peptide A β_{1-42} . En effet, l'agrégation du peptide amyloïde est largement affectée par différents facteurs tels que la température, le pH, la concentration ou encore la force ionique. Après plusieurs essais de mise au point, un protocole de traitement du peptide A β_{1-42} a pu être défini. Dans des conditions expérimentales définies, avec du matériel adéquate (microplaques et tubes eppendorf low-binding), il a été possible de suivre l'agrégation du peptide par l'intermédiaire de la fluorescence spécifique de la ThT. L'utilisation de cette sonde permet d'obtenir des courbes d'allure sigmoïdale caractéristiques des amyloïdes. Ces courbes permettent de discriminer les différents états agrégatifs du peptide : une phase de latence (nucléation) suivie d'une phase d'élongation et enfin un plateau marquant l'état fibrillaire. Ce suivi cinétique a été réalisé en absence et en présence de liposomes de composition complexe, servant à mimer de façon simplifiée les membranes neuronales.

La toxicité des espèces oligomériques intermédiaires a été étudiée par le biais de l'utilisation d'une forme mutante du peptide, l'oG37C. Des études de *liposome leakage assay* (LLA) ont donc été menées afin de caractériser la toxicité du mutant sur les liposomes utilisés. Finalement, en utilisant la spectroscopie ATR-FTIR, des études structurales ont permis d'analyser la conformation secondaire de l'oligomère, en absence et en présence de liposomes.

II-2. INTERACTIONS A β /MEMBRANES

β -amyloid peptide interactions with biomimetic membranes : a multiparametric characterization

Abbreviations

AD : Alzheimer's Disease

A β : Amyloid- β

ATR-FTIR : Attenuated Total Reflectance –Fourier Transform InfraRed spectroscopy

CF : Carboxyfluorescein

DLS : Dynamic Light Scattering

FFT : Fast Fourier Transform

LUV : Large Unilamellar Vesicle

MLV : Multilamellar Vesicle

NMR : Nuclear Magnetic Resonance

SPC : Soybean phosphatidylcholine

THT : Thioflavin T

Keywords: Alzheimer's disease; liposomes; β -amyloid; membranes

1. Introduction

Amyloids refer to a group of soluble proteins or peptides that have the ability to aggregate in the form of insoluble deposits. The presence of such deposits within biological tissues characterizes diseases known as amyloidoses (or amyloses). Many amyloid proteins have been identified in humans, some of which are associated with neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease (AD) (Benson et al., 2018; Ow and Dunstan, 2014). AD is the most widespread form of senile dementia worldwide and represents the leading socioeconomic problem in healthcare. The onset and the progression of this neurodegenerative disease is associated with the aggregation of the amyloid- β peptide (A β) (Dumery et al., 2001).

The amyloid aggregation process consists in the fibrillation of the A β peptide going from monomeric species, passing by intermediary states such as oligomeric species which are considered to be responsible for the neuron toxicity, to finally form fibers, the major components of the amyloid plaques (Finder and Glockshuber, 2007; Gouras et al., 2015). This fibrillation can therefore be divided into 3 phases: the nucleation where the nuclei are formed, the elongation corresponding to the assembly of the nuclei into protofibrils passing by intermediary species such as the oligomeric state and then the saturation phase corresponding to the maturation of the fibers and to an equilibrium phase. The whole process is characterized by an increase in the β -sheet secondary structure. Indeed, amyloids are ordered cross- β sheet protein aggregates consisting of fibers arranged in β -sheets perpendicular to the axis of the fiber (Makin and Serpell, 2005; Nelson et al., 2005). The aggregation process involves both homotypic (A β -A β) and heterotypic (A β with interacting partners in its environment) interactions. Factors that can influence this process are numerous, with many physicochemical parameters such as temperature, pH or concentration. These factors can also be molecular actors present in the peptide environment such as metal ions and membrane lipids (Rangachari et al., 2018).

Lipids like ganglioside GM1, cholesterol and sphingomyelin have been largely described as being able to interact with A β fibrillation process (Gibson Wood et al., 2003; Habchi et al., 2018; Matsubara et al., 2018; Matsuzaki, 2014; Nicastro et al., 2016; Vestegaard et al., 2010). However, it is found that the peptide would also tend to interact with other lipids such as phosphatidylserine or phosphatidylethanolamine (Mandal and Pettegrew, 2004; Sani et al., 2011; Yu et al., 2013). In order to study these interactions *in vitro*, many membrane models have been used like monolayers, bilayers, micelles or liposomes (Drolle et al., 2017; Mandal and Pettegrew, 2004; Sani et al., 2011; Sasahara et al., 2013).

All studies carried out revealed numerous results concerning the effects of the presence of membrane lipids, some of which being contradictory depending on the peptide source, the operating conditions or the membrane model.

Our main goal is to set up a multiparametric assay that will characterize modulators of A β peptide aggregation, while including the membrane in its environment to mimic the *in vivo* interatomic landscape. By taking advantage of our previous work on the characterization of novel compounds through the use of liposomes, we decided to use large unilamellar vesicles as a membrane model to set up this test (Smeralda et al., 2019). Using a simplified composition, we have recreated a lipid environment that mimics neuronal membranes. We designed liposomes containing phosphatidylcholine, cholesterol and phosphatidylglycerol. Interaction of A β -peptide with membranes, were described according to several spectroscopic methods and using the stable oligomeric peptide variant, oG37C.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Soybean phosphatidylcholine (SPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt (DOPG) were gifts from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). 3-(trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d₄ acid (TMSP), carboxyfluorescein (CF), cholesterol, dimethyl sulfoxide (DMSO), potassium chloride, potassium phosphate, Sepharose[®] CL-4B, sodium chloride, sodium phosphate, thioflavin T, Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Ammonium hydroxide was obtained from VWR (Randor, Pennsylvanie, USA), dithiothreitol from Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

2.2. Liposomes

2.2.1. Formulation of liposomes

Liposomes mixtures of SPC:cholesterol:DOPG in a molar ratio of 6:2:2 (PCG₆₂₂) or 2:2:6 (PCG₂₂₆) were used.

Liposomes were formulated according to the adapted method of the thin lipid film hydration (Bangham et al., 1965). Lipid solutions in chloroform/methanol (4:1) were evaporated under nitrogen flow, and left under vacuum for 3-4 h to form a lipid film. This thin lipid film was then hydrated in PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ et 2 mM de KH₂PO₄) and vortexed.

Rehydrated lipid suspensions were subjected to 1 h hour of gentle agitation in order to have maximum homogenization. Free-thaw cycles were carried out with liquid nitrogen and a 40°C water bath. The yielded multilamellar vesicles (MLVs) were then extruded 13 times with a mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama, USA) through polycarbonate membranes with a pore diameter of 100 nm (Avanti Polar Lipids, Inc.) to form LUVs.

2.2.2 Characterization of liposomes by dynamic light scattering

The average hydrodynamic diameter associated with the polydispersity index (PDI) of the formulated LUVs were measured by dynamic light scattering (DLS) using a NanoZS® apparatus (Malvern Instruments SA, Worcestershire, UK). The zeta potential was calculated from the electrophoretic mobility using the Smoluchowski equation, also using a NanoZS® apparatus. The measurements were performed in triplicate at 25°C after a 1:100 (v/v) dilution in the buffer.

2.2.3 Lipid quantification by NMR spectroscopy

The lipid concentration of the formulated LUVs was quantified by ¹H NMR spectroscopy (Hein et al., 2016). ¹H NMR measurements were performed at ambient temperature for SPC, and DOPG-based LUVs, or at 50°C for PCG₆₂₂ and PCG₂₂₆ LUVs on a Bruker Avance III spectrometer (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) equipped with a 5 mm probehead operating at 400 MHz. The instrument's standard settings (90° pulse angle, 2.72 s acquisition time, 3 s relaxation delay, 15 ppm spectral width) were used. Locking and shimming was performed on the signal of the exchangeable deuterium atoms of the D₂O/CD₃OD mixtures. 64 scans were performed leading to a total acquisition time of 6 min 20 s. Data processing was performed with Topspin 3.5 After zero-filling to 64k data points, apodization (exponential and Gaussian functions, 1 Hz), Fourier transformation, phase- and baseline correction, the peak areas were determined by integration. TMSP was used as an internal standard ($\delta = 0$ ppm). For samples with increased amounts of water, presaturation of the water peak ($\delta = 4.79$ ppm) was used to ensure that the dynamic range of the instrument was not exceeded during the measurement. To prevent overlapping signals above $\delta = 0.8$ ppm phospholipid quantification was made using the signal around $\delta = 0.67$ ppm originating from the C18 methyl group of cholesterol.

2.2.4 Liposomes leakage assay (LLA)

Carboxyfluorescein (CF)-loaded LUVs were prepared by the thin lipid film hydration as described in 2.2.1. The hydration step was carried out with a 70 mM CF solution prepared in PBS buffer. The obtained LUVs were separated from unincorporated CF by passage through a Sepharose[®] CL-4B loaded (Sigma-Aldrich) column, using PBS buffer as eluent. The LUVs were characterized by DLS and the lipids were quantified by NMR spectroscopy as described in 2.2.3, and 2.2.4, respectively. The dequenching of the CF fluorescence was measured using a Synergy 2 microplate reader (Biotek, Colmar, France) equipped with the appropriate filters ($\lambda_{\text{ex}} = 485/20$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 528/20$ nm). CF release assay was performed in a final volume of 100 μL , using 10 μM of LUVs. The fluorescence was recorded immediately (F_0) and for 4h at 25°C. It was compared with that measured at the end of the experiment after addition of 2 μL of 20% Triton X-100 solution to achieve complete liposome leakage (F_{max}). To validate the Liposome Leakage Assay results, the sensibility rate $R = F_{\text{max}}/F_0$ was calculated, and it had to be greater than 6 to perform studies. Then, the percentage of CF release was calculated according to the following equation (Jimah et al., 2017):

$$\% \text{ CF leakage (t)} = [(F_t - F_0) / (F_{\text{max}} - F_0)] \times 100$$

where F_t was the fluorescence intensity at time t , F_0 the initial fluorescence intensity, and F_{max} the final fluorescence intensity after addition of Triton X-100.

The data of LLA were plotted with GraphPad[®] Prism statistical software (version 6.01, GraphPad[®] Software, La Jolla, CA, USA). Comparison at references values (oG37c alone) were performed with Mann-Whitney test. Differences were considered significant when the associated p value was below 0.05.

2.3 Amyloid- β peptide

2.3.1 A β treatment

Recombinant A β_{1-42} was purchased from rPeptide (Watkinsville, GA 30677, USA). The lyophilized powder was solubilized in 1% NH₄OH, at a concentration of 1 mg/mL. After 3 min of sonication, resuspension was achieved using PBS buffer at pH 6.3 to reach a final pH around 7.4. The Sensolyte[®] Thioflavin T Beta-Amyloid (1-42) Aggregation kit was purchased from Anaspec (Fremont, CA 94555, USA), and further used according to manufacturer's protocol, and as described before (Jourdan et al., 2016).

2.3.2 Production and purification of oG37C

oG37C variant was produced and purified with minor modifications of the protocol previously described (Vignaud et al., 2013). Briefly, after transformation in the bacterial strain 969 (B121de3pLysS) with the plasmid pET Sac Abeta, one clone was grown on 10 mL LB medium preculture that contained 1 % dextrose, 100 mg/L ampicillin, and 25 mg/L chloramphenicol. This one-day preculture was added to 990 mL of ZYM medium (1 % Tryptone, 0.5 % yeast extract, 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 2 mM MgSO₄) containing 100 mg/mL ampicillin and 25 mg/mL chloramphenicol and incubated overnight at 37°C. Cell pellet (1g / 2.5 mL of TE buffer) were subjected to 3 cycles of sonication (respectively 5, 4 and 2 sonication of 1 min on ice, output 40 %), and then centrifuged for 15 min at 30,000 g at 4°C after each cycle. The pelleted inclusion bodies were solubilized at 1.25 mg per 10 mL of TE-urea buffer (8 M urea, 50 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8). After overnight at 4°C with gentle agitation, the soluble inclusion bodies were centrifuged for 30 min at 30,000 g at 4°C. The supernatant was passed through a 30 kD filtration unit for 2 h at 4,000 g at 4°C and concentrated on a 5 kD membrane at 4000 g at 4° C. Monomeric and oligomeric species of A β were separated by size-exclusion chromatography on a Superdex-75 10/300 GL Column equilibrated in phosphate-buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4) at 4°C. The fractions were pooled separately, and aliquots were quantified with a Bradford assay, frozen in liquid nitrogen, and conserved at -80°C until use.

2.3.3 A β peptide self-aggregation kinetic assay (ThT, Thioflavin T fluorescence)

10 μ M of A β were incubated in 96-well dark plates in presence or absence of liposomes with 20 μ M of ThT at 25°C. Fluorescence measurements (λ_{exc} = 440 nm and λ_{em} = 484 nm) were made with an Infinite M200 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). Data were collected as the average of 25 flashes each 10 min with 20 sec of 1 mm orbital agitation before each run.

2.3.4 Attenuated Total Reflectance –Fourier Transform InfraRed spectroscopy (ATR-FTIR)

Samples were incubated overnight at 25°C before FTIR experiments. 3 μ L of each sample was loaded on a germanium crystal and dried with a stream of dry nitrogen. ATR-FTIR spectra were recorded on a Nicolet IS50 FTIR spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with DLaTG (Deuterated Lanthanum α -alanine-doped TriGlycine sulfate) and MCT (Mercury Cadmium Telluride) detectors with a spectral resolution of 2 cm⁻¹.

128 interferograms, were co-added after a 2 min acquisition. All FTIR experiments were done in a thermostatically controlled room at 25°C. For signal processing, after blank subtraction (buffer alone or buffer and liposome), all spectra were fitted using OriginPro® 8.5.1. The deconvolution of the amide I band of the spectra was performed using a Fast Fourier Transform (FFT) low-band. The value of cutting frequency was determined by FFT of typical experimental FTIR spectra in order to remove high frequency contribution significantly larger than the typical amide frequency. The Voigt function type option was selected to take into account two kind of contributions: Lorentzian and Gaussian.

3. Results

3.1 Liposomal model formulation

In order to study the interactions between A β peptide and the neuronal membranes *in vitro*, it was first necessary to establish a liposomal model. Large unilamellar vesicles (LUVs) were chosen because of their stability, their easy production and because LUVs offer a similar curvature to the cell membrane (Lucio et al., 2010). This parameter seems to be crucial for A β -lipids interactions (Sugiura et al., 2015; Terakawa et al., 2018). Several studies using artificial membrane models to study A β interactions with neuronal membranes use compositions containing phosphatidylcholine, cholesterol, sphingomyelin and ganglioside GM1 (Drolle et al., 2017; Ewald et al., 2019; Matsubara et al., 2018; Nicastro et al., 2016; Sasahara et al., 2013). We needed to design a model easy to produce, easy to use, stable, and cheap to be further well adapted to drug discovery assays. To respond to these objectives, as it is difficult with GM1, phosphatidylglycerol (PG) can be used instead of GM1. Indeed, PG shows a similar H-bonding ability *via* the presence of hydroxyl groups and a same negative charge at the polar head (Henry et al., 2015). We therefore designed a simplified model composed of soybean phosphatidylcholine (SPC), cholesterol and di-oleyl-phosphatidylglycerol (DOPG) (Fig. 1).

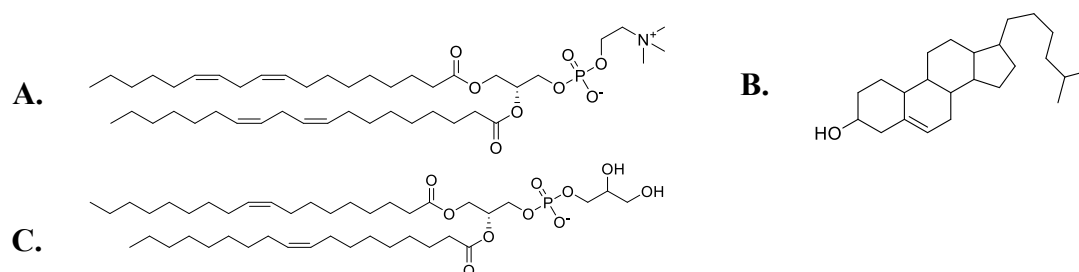


Fig. 1. Molecular structure of **A.** soybean phosphatidylcholine (SPC) major component; **B.** cholesterol; **C.** 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DOPG).

A SPC:cholesterol:DOPG ratio was chosen in coherence with the composition of the neuronal membranes (Drolle et al., 2017). Liposomes were formulated using mixtures of SPC:cholesterol:DOPG in a molar ratio of 6:2:2 (PCG₆₂₂). Other liposomes with a SPC:cholesterol:DOPG molar ratio of 2:2:6 (PCG₂₂₆) were also used to highlight the impact of the overall ionic charge of liposomes on the aggregation process.

3.2 Liposomes characterization

After being formulated according to the Bangham method (Bangham et al., 1965), the lipid concentration was checked using a ^1H NMR quantification method developed in a previous work (Smeralda et al., 2019). The granulometric properties of the liposomes were also determined. The DLS measurements showed that the average diameter of the liposomes is about one hundred nanometers which is coherent with the expected size for the large unilamellar vesicles formulated by extrusion in our conditions. PCG₆₂₂-based LUVs are slightly smaller in diameter than PCG₂₂₆-based LUVs. This can be explained by the presence of a larger proportion of negative charges brought by the DOPG causing a repulsion at the polar heads of the phospholipids, whereas the PC is zwitterionic (Fig. 1). This net charge difference is also seen in the measurement of the zeta potential, which is more electronegative for PCG₂₂₆-based LUVs (Table 1). The measurement of the polydispersity indices being less than 0.1 indicates the presence of monomodal liposome populations in both cases.

Table 1. Granulometric measurements of LUVs expressed in terms of diameter by volume (nm), peak percentage of each population and PDI, determined immediately after formulation

	\emptyset (nm)	%	ζ pot (mV)	PdI	Lipids concentration (mM)
PCG ₆₂₂	113.5 \pm 1.7	100	-22.6 \pm 2.3	0.068 \pm 0.001	20.0 \pm 5.0
PCG ₂₂₆	120.4 \pm 0.8	100	-38.9 \pm 1.4	0.032 \pm 0.020	20.0 \pm 5.0

3.2 ThT monitoring of A β peptide aggregation in absence and presence of liposomes

Thioflavin T is a well-known dye which fluoresces when the β -sheet secondary structure of a peptide or a protein increases (Biancalana and Koide, 2010). This property allows to follow the increase of the β -sheet content during the A β peptide aggregation and thus to follow its kinetics.

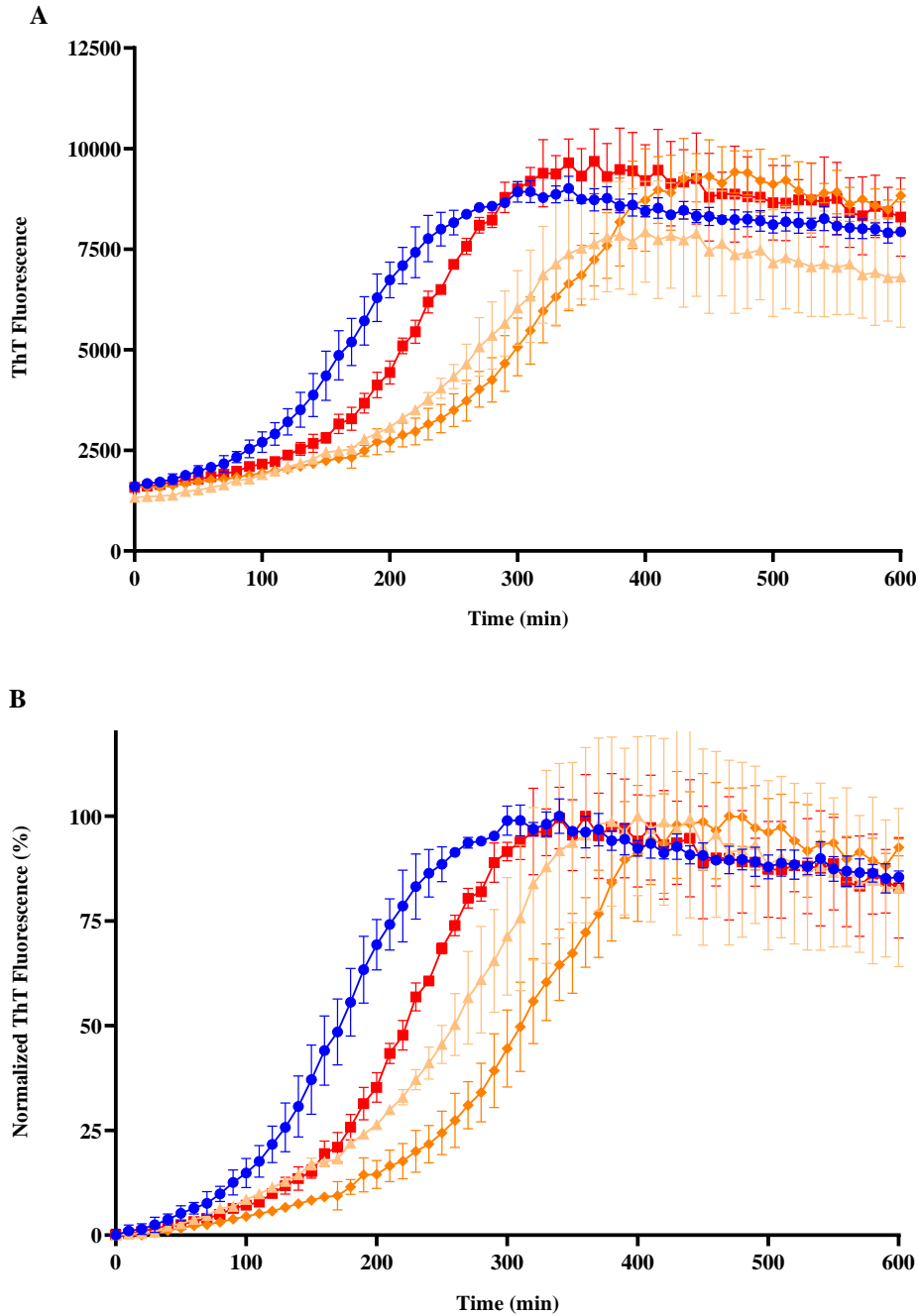


Fig. 2. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for $\text{A}\beta_{1-42}$ alone 10 μM (blue dots), for $\text{A}\beta_{1-42}/\text{PCG}_{622}$ -based LUVs 10 μM (beige triangles), $\text{A}\beta_{1-42}/\text{PCG}_{622}$ -based LUVs 100 μM (orange diamonds) and $\text{A}\beta_{1-42}/\text{PCG}_{622}$ -based LUVs 1 mM (red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

The aggregation kinetic of $\text{A}\beta_{1-42}$ alone shows the classical phases of amyloid aggregation with a lag phase of approximately 60 min, then an elongation phase of approximately 240 min to reach the equilibrium phase (Fig. 2. A).

In the presence of PCG₆₂₂-based LUVs, results do not show any major quantitative difference at the kinetic plateau. The normalized representation (Fig. 2. B) allows us to isolate kinetic data (Habchi et al., 2017), which can be compared in presence of three concentrations of PCG₆₂₂-based LUVs. The presence of LUVs affects A β aggregation. At 10 and 100 μ M, a concentration-dependent delay in the fibrillation process is observed. Moreover, at this concentration range, the slope of the elongation phase was slightly decreased with lipid concentration. Plateau phases are reached after 350 and 400 min for 10 and 100 μ M LUVs, respectively. However, when the lipid concentration is increased to 1 mM, a decrease in the delay of the fibrillation process is observed, and the slope of the elongation phase came back to that observed with A β ₁₋₄₂ alone.

Considering these results, it appears that the effect of the lipid composition PCG₆₂₂ is essentially a kinetic effect with a delay in the peptide aggregation and a modification of the slope of the elongation phase. This could indicate that the main interactions between the peptide and the membranes are at the level of the species present at the nucleation phase, or during oligomerization. The lowering elongation slope indicates an inhibition of the elongation process, which depends on the lipid concentration. However, when it becomes too high compared to the amount of peptide, the delay seems to be diminished.

An aggregation study of A β on zwitterionic DOPC-based LUVs by FRET analysis reported that the liposomes were able to catalyse fibril formation *via* secondary nucleation mechanisms involving aggregate fragmentation (Lindberg et al., 2017). As in this study, secondary pathways induced by oligomeric forms of A β on the membrane surface could appear beyond a critical concentration of PCG₆₂₂-based LUVs.

Taking into account that the A β is negatively charged (Ewald et al., 2019), which may influence its interactions with membranes, we then modified the molar ratio of our liposomes by increasing the proportion of phosphatidylglycerol and therefore the proportion of negative charges.

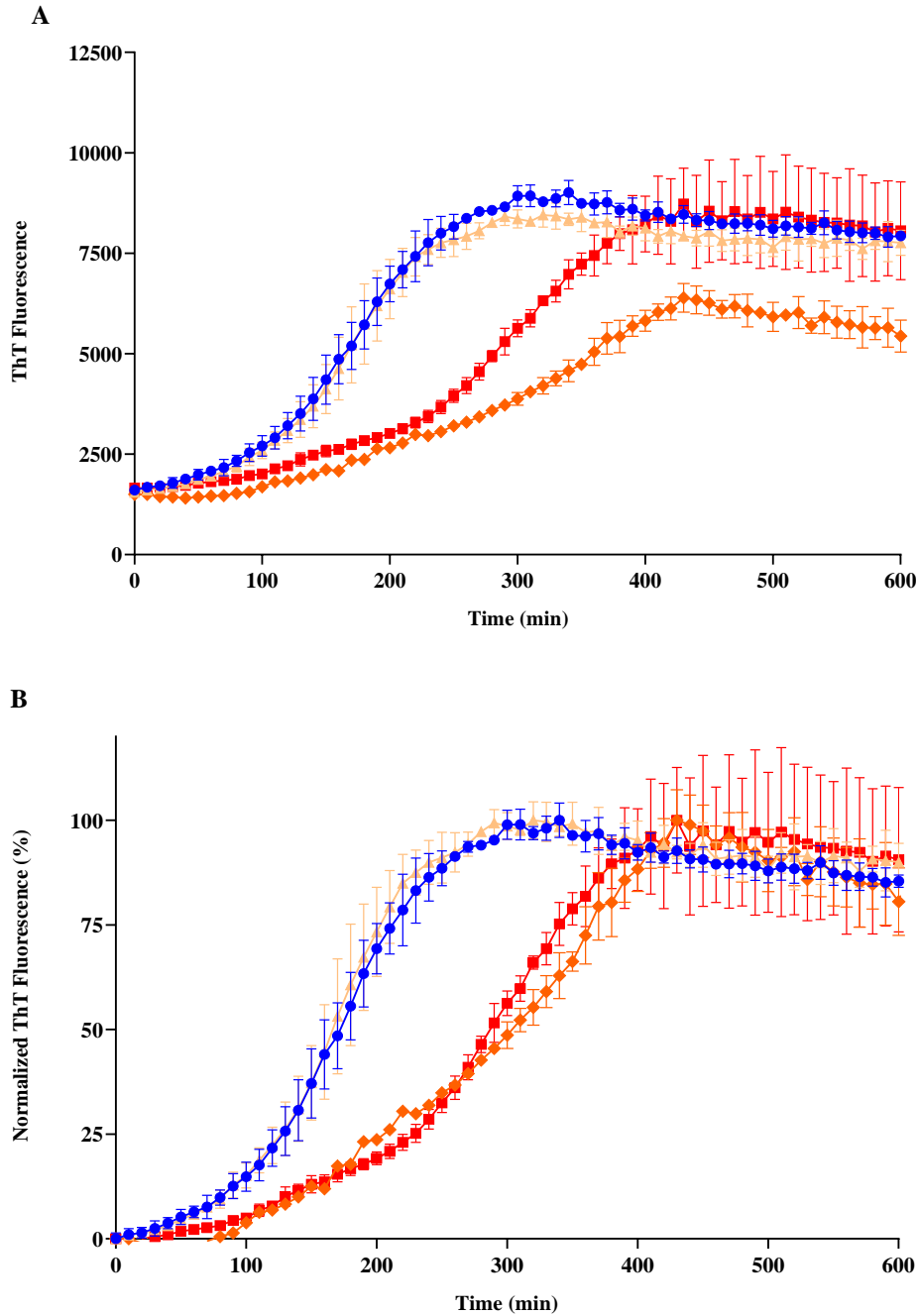


Fig. 3. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for A β_{1-42} alone 10 μM (blue dots), for A β_{1-42} /PCG₂₂₆-based LUVs 10 μM (beige triangles), A β_{1-42} /PCG₂₂₆-based LUVs 100 μM (orange diamonds) and A β_{1-42} /PCG₂₂₆-based LUVs 1 mM (red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

In the presence of PCG₂₂₆-based LUVs at 10 μM , no difference with A β_{1-42} own aggregation is detected from a quantitative and a kinetic point of view (Fig. 3).

At 100 μM and 1 mM of lipids, a similar kinetic delay is observable with a prolongation of the nucleation and mostly the elongation phase. The equilibrium plateau is reached after 400 min vs 300 min when $\text{A}\beta_{1-42}$ is incubated alone. Moreover, at 100 μM of PCG₂₂₆-based LUVs, it can be noted that the reached fluorescence plateau is lower than in the other cases (Fig. 3.A). This may indicate the formation of different $\text{A}\beta$ forms with less ThT binding abilities or a quantitative difference in terms of length or amount of fibers formed.

Many studies have reported the study of interactions of $\text{A}\beta$ with lipids (Gibson Wood et al., 2003; Hoshino et al., 2013; Matsubara et al., 2018; Matsuzaki, 2007; Nicastro et al., 2016; Vestergaard et al., 2010). It is often shown that $\text{A}\beta$ interactions with the anionic phospholipids on liposomes are limited to the lipid surface at neutral pH, and may lead to partial insertion of $\text{A}\beta$ into the membrane. In coherence with other works made on different liposomes (Hellstrand et al., 2010), our results show that the surface characteristics of the membranes, and in particular the nature of the phospholipids head groups, modulate $\text{A}\beta$ aggregation pattern, and *in extenso* behave as a specific inducing factor for $\text{A}\beta$ conformations during aggregation.

In recent years, studies relative to the $\text{A}\beta$ peptide aggregation have focused on the existence of intermediate oligomeric species (Ahmed et al., 2010; Bobo et al., 2017; Cerf et al., 2009; Cizas et al., 2010; Cline et al., 2018; Kaye and Lasagna-Reeves, 2012; Lee et al., 2017; Sengupta et al., 2016). Indeed, it is really difficult to obtain a stable and homogeneous solution of $\text{A}\beta$ in oligomeric form (Breydo and Uversky, 2015; Fa et al., 2010; Stine et al., 2010). In order to work with a solution containing exclusively oligomers, we have decided to use a stable mutant model synthesized by Vignaud et al. 2013. This mutant, named oG37C, that was obtained after mutagenesis of $\text{A}\beta$, has been identified as the most toxic stable oligomeric mutant among 6000 clones (Vignaud et al., 2013).

3.3 oG37C aggregation in absence and presence of liposomes

Since it was synthesized, many works described oG37C aggregation process, its membrane toxicity mechanism was described in several studies. (Bobo et al., 2017; Bonhommeau et al., 2017; Ewald et al., 2019; Henry et al., 2015, 2018).

The size and the organization of this oligomer depends on its treatment, and on its incubation duration. Classically, the size and height distributions of oG37C are homogeneous with an average diameter around 20 nm and a height around 10 nm, which corresponds to 7 to 15 monomers (Bobo et al., 2017; Ewald et al., 2019).

Henry *et al.* (2015) study demonstrated that interactions between α G37C and liposomes are favored in the presence of PG head groups that may interact with peptide *via* hydrogen bonding rather than electrostatic forces using simple models of LUVs (pure DOPC or DOPG). Using ThT assay, liposome leakage assay (LLA), Transmission Electronic Microscopy (TEM) experiments and Plasmon-Waveguide Resonance (PWR) spectroscopy, they showed that α G37C is able to destabilize liposomes made of DOPG (Henry *et al.*, 2015). However, to date, no study has been reported on liposomes based on PCG₆₂₂ or PCG₂₂₆.

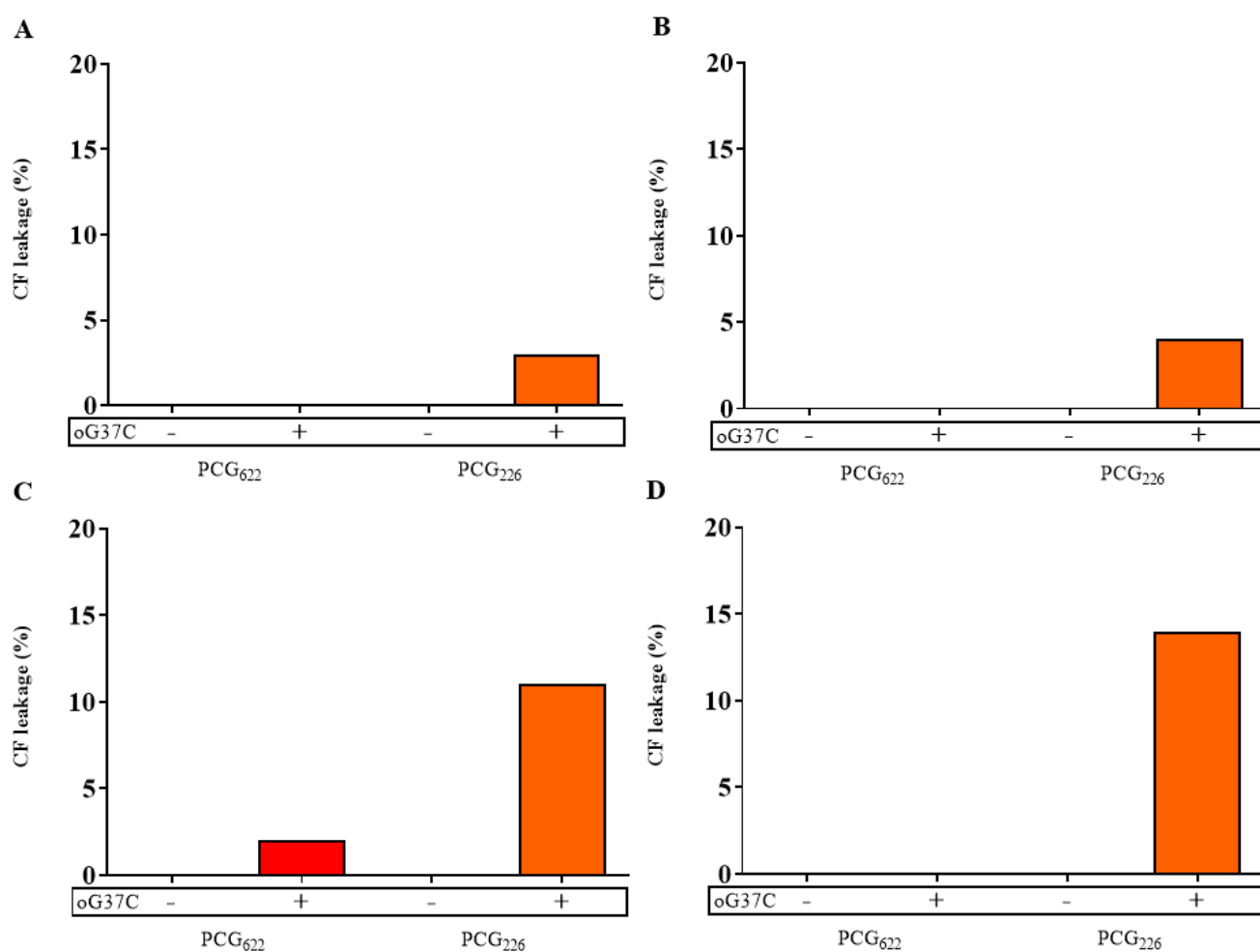


Fig. 4. Carboxyfluorescein leakage from PCG₆₂₂-based LUVs and PCG₂₂₆-based LUVs at **A.** (100 μ M), **B.** (50 μ M), **C.** (20 μ M), **D.** (10 μ M) in absence and in presence of α G37C (10 μ M) after 2 h of incubation at 25°C. The leakage values were calculated from average values of triplicates.

Using the PCG₆₂₂-based LUVs, no significant leakage was observed upon exposure to oG37C whatever the lipid:peptide ratio (Fig. 4). In the case of PCG₂₂₆-based LUVs, the most important leakage was detected for the 1:1 lipid:peptide molar ratio (14 %).

Henry *et al.* (2015) reported approximately 45 % of leakage using DOPG-based LUVs at the same lipid:peptide ratio vs less than 3 % using DOPC-based LUVs (Henry et al., 2015).

The lower leakage that we observe, can be due to the presence of cholesterol, which is known to stiffen the membranes (Arriaga et al., 2009). Our results show that the PG proportion plays an important role towards the oG37C toxicity on LUVs models, and the lipid:peptide molar ratio too. Effects being more objectified at the 1:1 PCG₂₂₆: oG37C molar ratio, we therefore decided to continue studying the effects of liposome/peptide interactions at the kinetic and conformational point of view in these conditions.

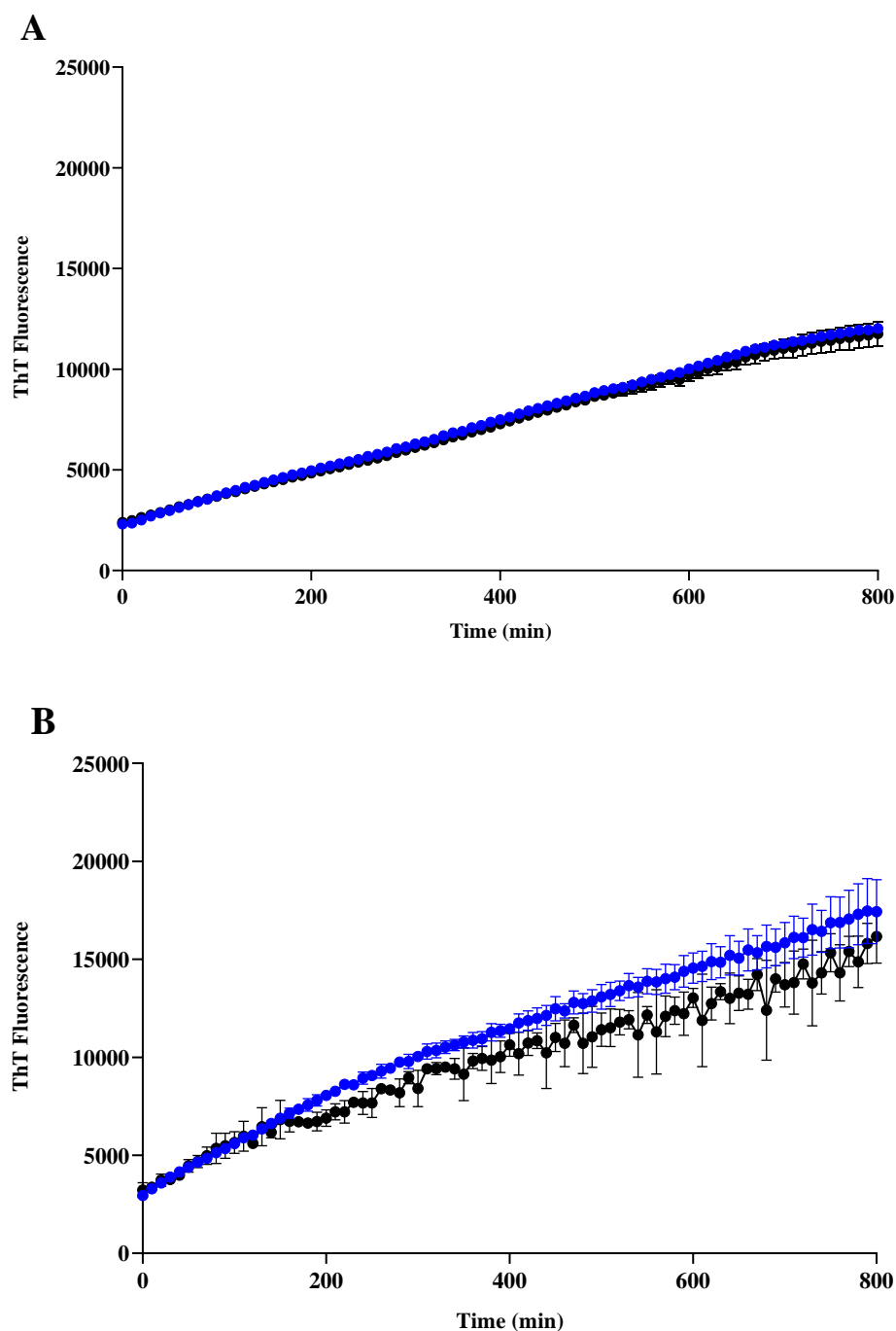


Fig. 5. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for oG37C 10 μM alone (blue dots) and using **A.** PCG₆₂₂-based LUVs (10 μM) or **B.** PCG₂₂₆-based LUVs (10 μM). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

Using the ThT fluorescence assay, in 800 min of incubation time, it appears that oG37C shows a characteristic linear aggregation kinetics (Fig. 5). This is coherent with that previously described by Bobo *et al.* (2017).

In their study, they showed that in oxidative conditions the oG37C did not form ThT-binding species but in the presence of the small redox molecule dithiothreitol (DTT), it took 960 min to observe the beginning of the appearance of a sigmoid curve characteristic of amyloid aggregation (Bobo et al., 2017). In our study, considering the lower concentration of oG37C (10 μM vs 30 μM) and the lower temperature (25°C vs 30°C) that we use, it is therefore expected a slower kinetics, that allows us to focus on the early interactions between oligomer species and lipids.

The incubation of oG37C in the absence and in the presence of the two liposomal models does not show a significant difference in the fluorescence signals of ThT. However, despite the background noise, it is possible to note a slight decrease of the signal in the presence of PCG₂₂₆-based LUVs.

The mechanism of ThT binding has been described by Biancalana and Koide (2010) as a channel model of binding. ThT is proposed to bind along surface side-chain grooves running parallel to the long axis of the β -sheet (Biancalana and Koide, 2010). It is therefore possible that structural changes occur while limiting the binding of ThT which would prevent the observation of differences in simple fluorescence monitoring. We therefore decided to provide a conformational analysis of the peptide with or without liposomes using the ATR-FTIR spectroscopic technique. It was done by incubating overnight, under gentle agitation, at 25°C oG37C (50 μM) alone, or in presence of liposomes (100 μM).

ATR-FTIR spectroscopy is used to analyze the secondary structure of peptides and proteins, in particular by analyzing the amide band I (1700-1600 cm^{-1}) corresponding to the C=O vibration of the peptide bond (Sarroukh et al., 2013). The deconvolution of the amide I band of the spectra allows to identify three specific peaks of the α /random, β and anti-parallel β -sheet conformation respectively at 1657, 1628 and 1685 cm^{-1} . The conformation study of the oG37C peptide has showed a specific fingerprint in comparison with the wild-type peptide, *i.e.* the existence of an anti-parallel β -sheet conformation (Vignaud et al., 2013). However, those experiments were carried out after a very longer incubation time in comparison with our experiments (15 days vs overnight) (Bobo et al., 2017). To date, and to our knowledge, no FTIR data describing conformation of oG37C with membrane are available.

Thus, experiments conducted with liposomes were analyzed by subtracting the absorbance of the blank containing the same concentration of lipids. Respective areas under the curves led us to determine relative signal contribution of each conformation (Table 2).

Table 2. Relative abundance of each secondary structure after deconvolution of ATR-FTIR amide I band monitored after incubation under gentle agitation at 25°C overnight of oG37C (50 μ M) alone, or mixed with liposomes (100 μ M).

	Center (cm^{-1})	Assignment	oG37C	oG37C + PCG ₆₂₂	oG37C + PCG ₂₂₆
Relative	1628	β sheet	57.1	46.2	34.2
abundance	1685	anti-// β	16.6	5.6	6.5
(%)	1657	α / random	26.3	51.8	59.3

The ATR-FTIR results show that oG37C alone would have a conformation made by 57% of β -sheets, 17% of anti-parallel β -sheets, and 26% of α -helix /random structure. It was established that these proportions depend on the oG37C treatment. In particular, it was previously shown that in presence of DTT, oG37C switched from a random conformation to an anti-parallel β -sheet organization (Bobo et al., 2017), as it is the case here. In the presence of liposomes, the proportion in β -sheet is lower than that observed for oG37C alone, more particularly in the presence of PCG₂₂₆-based LUVs. This decrease is accompanied by a drastic increase in α -helical/random conformation. Several studies have shown that A β /membrane interaction lead to an increase in α -helical conformation due to adsorption of the peptide on the membrane surface. Others have shown that lipid interaction is accompanied by the increase of the β -sheet structuring link to pore formation (Lal et al., 2007; Matsuzaki, 2007; Quist et al., 2005; Xu et al., 2005). In our case, the main process would be the adsorption of the peptide on the membrane surface, and even insertion within the membrane. This anchorage is greater when the proportion of PG is increased, leading to a detergent effect. Indeed, binding mechanisms are associated with toxicity as observed in leakage assay (Fig. 4).

Ewald, *et al.* (2019) showed that oG37C insertion and detergent effect depends on the concomitant presence of GM1 and cholesterol (Ewald et al., 2019). It was also reported for a wild-type A β peptide in the literature (Nicastro et al., 2016). In our liposomal models, no GM1 is present. However, it is possible that cholesterol facilitates the interaction of oG37C with membranes, and the concomitant presence of significant proportions (60%) of negatively charged PG leads to a detergent effect of the peptide.

4. Discussion

All the results showed that, in the presence of the selected lipids, the major effect observed is a delay in $A\beta_{1-42}$ fibrillation. The kinetic modifications seem to take place mainly on the nucleation and elongation stages. Using the oG37C, we observed that interactions with membranes are more important when the proportion of PG is increased. Bibliographic studies have shown that the $A\beta$ peptide tends to interact with GM1 clusters and that this interaction is facilitated by the presence of cholesterol (Matsuzaki, 2014). One hypothesis is that the same type of phenomenon occurs with the increase of the PG proportion through the presence of cholesterol in our liposomal models. This interaction is reflected by an increase in α -helix conformation associated with a toxicity towards the liposome membranes detectable by the liposome leakage assay.

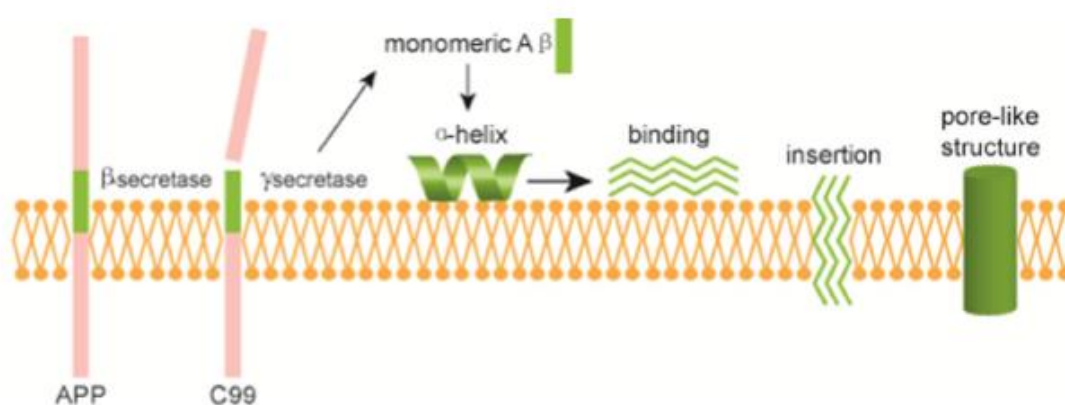


Fig. 6. Generation of $A\beta$ peptide and its interaction with membranes (Niu et al., 2018)

Sani *et al.* (2011), using ThT fluorescence measurements, electron microscopy and circular dichroism have shown that anionic lipids decrease the self-assembly of $A\beta_{1-42}$ (Sani et al., 2011). By increasing the amount of negative charges by using PCG₂₂₆₋ instead of PCG₆₂₂₋-based LUVs, we observed a larger delay with a prolongation of the nucleation and elongation phases. These observations may be attributed to a stabilizing effect of $A\beta$ peptide early species upon exposure to the liposomes. Indeed, as shown in the interaction model of the peptide with the membranes in Fig. 6, it is possible that the interaction with the membranes translated by an increase in the α -helix proportion sequesters the peptide, delaying its propensity to fibrillate.

The current paradigm concerning oligomers is that they can undergo two pathways: the *on*-pathway which corresponds to the formation of short-lived toxic species leading to amyloid fibers; the *off*-pathway implies structurally different monomers (formed upon exposure to external elements, for example membranes) that proceed to form higher molecular weight oligomers that are structurally different from their *on*-pathway counterparts (Lee et al., 2017; Rangachari et al., 2018). Kinetic changes such as those we observed may indicate the presence of several aggregation pathways that could be borrowed by amyloid species, depending on the presence and composition of the liposomes used. Habchi *et al.* (2018) have shown that cholesterol can promote A β ₁₋₄₂ aggregation by acting on the nucleation phase (Habchi et al., 2018). However, other studies have shown that cholesterol containing vesicles can promote A β fibrillation by hindering the nucleation process (Phan et al., 2018). Kinetic changes such as those we observed may indicate the presence of several aggregation pathways that could be borrowed by amyloid species depending on the presence and composition of the liposomes used. However, the resultant lipid-mediated effects in our liposomal compositions is a delay in fibrillation with effects on the early phases of aggregation.

5. Conclusion

Our objectives were to characterize the effects of neuronal biomimetic membranes on the A β aggregation pathway. From the results of this study, it appeared, that depending on the membrane composition and the peptide/lipid ratio, the presence of lipids mainly has a slowing-down kinetic effect and a structural impact with a modification of the peptide conformation. Liposomes seem to promote the α -helix conformation, which leads to a different oligomer aggregation pathway. The resulting species appear toxic towards some membranes. Moreover, results provided first methodologic bases to develop an original multiparametric assay to describe interactions of potential new A β peptide aggregation modulators, peptide, and implying liposomes as biomimetic membranes.

References associated with this article

- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J.I., Van Nostrand, W.E., Smith, S.O., 2010. Structural conversion of neurotoxic amyloid- β 1–42 oligomers to fibrils. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 561–567.
- Arriaga, L.R., López-Montero, I., Monroy, F., Orts-Gil, G., Farago, B., Hellweg, T., 2009. Stiffening Effect of Cholesterol on Disordered Lipid Phases: A Combined Neutron Spin Echo + Dynamic Light Scattering Analysis of the Bending Elasticity of Large Unilamellar Vesicles. *Biophys. J.* 96, 3629–3637.
- Bangham, A.D., Standish, M.M., Watkins, J.C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238–IN27.
- Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Eisenberg, D.S., Merlini, G., Saraiva, M.J.M., Sekijima, Y., Sipe, J.D., Westermarck, P., 2018. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* 25, 215–219.
- Biancalana, M., Koide, S., 2010. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1804, 1405–1412.
- Bobo, C., Chaignepain, S., Henry, S., Vignaud, H., Améadan, A., Marchal, C., Prado, E., Douch, J., Schmitter, J.-M., Nardin, C., Lecomte, S., Cullin, C., 2017a. Synthetic toxic A β 1–42 oligomers can assemble in different morphologies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1861, 1168–1176.
- Bobo, C., Chaignepain, S., Henry, S., Vignaud, H., Améadan, A., Marchal, C., Prado, E., Douch, J., Schmitter, J.-M., Nardin, C., Lecomte, S., Cullin, C., 2017b. Synthetic toxic A β 1–42 oligomers can assemble in different morphologies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1861, 1168–1176.
- Bonhommeau, S., Talaga, D., Hunel, J., Cullin, C., Lecomte, S., 2017. Tip-Enhanced Raman Spectroscopy to Distinguish Toxic Oligomers from A β 1–42 Fibrils at the Nanometer Scale. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 1771–1774.
- Cerf, E., Sarroukh, R., Tamamizu-Kato, S., Breydo, L., Dufrêne, Y., Narayanaswami, V., Goormaghtigh, E., Raussens, V., 2009. ANTI-PARALLEL E-SHEET - A SIGNATURE STRUCTURE OF THE OLIGOMERIC AMYLOID- BETA PEPTIDE. 28.
- Cizas, P., Budvytyte, R., Morkuniene, R., Moldovan, R., Broccio, M., Lösche, M., Niaura, G., Valincius, G., Borutaite, V., 2010. Size-dependent neurotoxicity of β -amyloid oligomers. *Arch. Biochem. Biophys.* 496, 84–92.
- Cline, E.N., Bicca, M.A., Viola, K.L., Klein, W.L., 2018. The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J. Alzheimers Dis.* 64, S567–S610.
- Drolle, E., Negoda, A., Hammond, K., Pavlov, E., Leonenko, Z., 2017. Changes in lipid membranes may trigger amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *PLOS ONE* 12, e0182194.
- Dumery, L., Bourdel, F., Soussan, Y., Fialkowsky, A., Viale, S., Nicolas, P., Reboud-Ravaux, M., 2001. β -Amyloid protein aggregation: its implication in the physiopathology of Alzheimer's disease. *Pathol. Biol.* 49, 72–85.
- Ewald, M., Henry, S., Lambert, E., Feuillie, C., Bobo, C., Cullin, C., Lecomte, S., Molinari, M., 2019. High speed atomic force microscopy to investigate the interactions between toxic A β 1–42 peptides and model membranes in real time: impact of the membrane composition. *Nanoscale* 11, 7229–7238.
- Finder, V.H., Glockshuber, R., 2007. Amyloid- β Aggregation. *Neurodegener. Dis.* 4, 13–27.

- Gibson Wood, W., Eckert, G.P., Igbavboa, U., Müller, W.E., 2003. Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1610, 281–290.
- Gouras, G.K., Olsson, T.T., Hansson, O., 2015. β -amyloid Peptides and Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* 12, 3–11.
- Habchi, J., Chia, S., Galvagnion, C., Michaels, T.C.T., Bellaiche, M.M.J., Ruggeri, F.S., Sanguanini, M., Idini, I., Kumita, J.R., Sparr, E., Linse, S., Dobson, C.M., Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., 2018a. Cholesterol catalyses A β 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes. *Nat. Chem.* 10, 673–683.
- Habchi, J., Chia, S., Limbocker, R., Mannini, B., Ahn, M., Perni, M., Hansson, O., Arosio, P., Kumita, J.R., Challa, P.K., Cohen, S.I.A., Linse, S., Dobson, C.M., Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., 2017. Systematic development of small molecules to inhibit specific microscopic steps of A β 42 aggregation in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E200–E208.
- Hein, R., Uzundal, C.B., Hennig, A., 2016. Simple and rapid quantification of phospholipids for supramolecular membrane transport assays. *Org. Biomol. Chem.* 14, 2182–2185.
- Hellstrand, E., Sparr, E., Linse, S., 2010. Retardation of A β Fibril Formation by Phospholipid Vesicles Depends on Membrane Phase Behavior. *Biophys. J.* 98, 2206–2214.
- Henry, S., Bercu, N.B., Bobo, C., Cullin, C., Molinari, M., Lecomte, S., 2018. Interaction of A β _{1–42} peptide or their variant with model membrane of different composition probed by infrared nanospectroscopy. *Nanoscale* 10, 936–940.
- Henry, S., Vignaud, H., Bobo, C., Decossas, M., Lambert, O., Harte, E., Alves, I.D., Cullin, C., Lecomte, S., 2015. Interaction of A β _{1–42} Amyloids with Lipids Promotes “Off-Pathway” Oligomerization and Membrane Damage. *Biomacromolecules* 16, 944–950.
- Hoshino, T., Mahmood, Md.I., Mori, K., Matsuzaki, K., 2013. Binding and Aggregation Mechanism of Amyloid β -Peptides onto the GM1 Ganglioside-Containing Lipid Membrane. *J. Phys. Chem. B* 117, 8085–8094.
- Jackson, M., Mantsch, H.H., 1995. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 95–120.
- Jimah, J., Schlesinger, P., Tolia, N., 2017. Liposome Disruption Assay to Examine Lytic Properties of Biomolecules. *BIO-Protoc.* 7.
- Kayed, R., Lasagna-Reeves, C.A., 2012. Molecular Mechanisms of Amyloid Oligomers Toxicity. *J. Alzheimers Dis.* 33, S67–S78.
- Lal, R., Lin, H., Quist, A.P., 2007. Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1768, 1966–1975.
- Lee, S.J.C., Nam, E., Lee, H.J., Savelieff, M.G., Lim, M.H., 2017. Towards an understanding of amyloid- β oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* 46, 310–323.
- Lindberg, D.J., Wesen, E., Björkeröth, J., Rocha, S., Esbjörner, E.K., 2017. Lipid membranes catalyse the fibril formation of the amyloid- β (1–42) peptide through lipid-fibril interactions that reinforce secondary pathways. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.* 1859, 1921–1929.
- Makin, O.S., Serpell, L.C., 2005. Structures for amyloid fibrils: Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.* 272, 5950–5961.
- Mandal, P.K., Pettegrew, J.W., 2004. Alzheimer's Disease: Soluble Oligomeric Ab(1–40) Peptide in Membrane Mimic Environment from Solution NMR and Circular Dichroism Studies 6.

- Matsubara, T., Yasumori, H., Ito, K., Shimoaka, T., Hasegawa, T., Sato, T., 2018. Amyloid- β fibrils assembled on ganglioside-enriched membranes contain both parallel β -sheets and turns. *J. Biol. Chem.* 293, 14146–14154.
- Matsuzaki, K., 2007. Physicochemical interactions of amyloid β -peptide with lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1768, 1935–1942.
- Matsuzaki, K., 2014. How Do Membranes Initiate Alzheimer's Disease? Formation of Toxic Amyloid Fibrils by the Amyloid β -Protein on Ganglioside Clusters. *Acc. Chem. Res.* 47, 2397–2404.
- Miller, L.M., Bourassa, M.W., Smith, R.J., 2013. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828, 2339–2346.
- Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.Ø., Riek, C., Grothe, R., Eisenberg, D., 2005. Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435, 773–778.
- Nicastro, M.C., Spigolon, D., Librizzi, F., Moran, O., Ortore, M.G., Bulone, D., Biagio, P.L.S., Carrotta, R., 2016. Amyloid β -peptide insertion in liposomes containing GM1-cholesterol domains. *Biophys. Chem.* 208, 9–16.
- Niu, Z., Zhang, Z., Zhao, W., Yang, J., 2018. Interactions between amyloid β peptide and lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1860, 1663–1669.
- Ow, S.-Y., Dunstan, D.E., 2014. A brief overview of amyloids and Alzheimer's disease: Amyloids and Alzheimer's Disease. *Protein Sci.* 23, 1315–1331.
- Phan, H.T.T., Shimokawa, N., Sharma, N., Takagi, M., Vestergaard, M.C., 2018. Strikingly different effects of cholesterol and 7-ketocholesterol on lipid bilayer-mediated aggregation of amyloid beta (1-42). *Biochem. Biophys. Rep.* 14, 98–103.
- Quist, A., Doudevski, I., Lin, H., Azimova, R., Ng, D., Frangione, B., Kagan, B., Ghiso, J., Lal, R., 2005. Amyloid ion channels: A common structural link for protein-misfolding disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 10427–10432.
- Rangachari, V., Dean, D.N., Rana, P., Vaidya, A., Ghosh, P., 2018. Cause and consequence of A β – Lipid interactions in Alzheimer disease pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1860, 1652–1662.
- Sani, M.-A., Gehman, J.D., Separovic, F., 2011. Lipid matrix plays a role in A β fibril kinetics and morphology. *FEBS Lett.* 585, 749–754.
- Sarroukh, R., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M., Raussens, V., 2013. ATR-FTIR: A “rejuvenated” tool to investigate amyloid proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828, 2328–2338.
- Sasahara, K., Morigaki, K., Shinya, K., 2013. Effects of membrane interaction and aggregation of amyloid β -peptide on lipid mobility and membrane domain structure. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 8929.
- Sengupta, U., Nilson, A.N., Kaye, R., 2016. The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine* 6, 42–49.
- Smeralda, W., Since, M., Corvaisier, S., Legay, R., Voisin-Chiret, A.-S., Malzert-Freon, A., 2019. Microplate assay for lipophilicity determination using intrinsic fluorescence of drugs: Application to a promising anticancer lead, pyridoclox. *Eur. J. Pharm. Sci.* 131, 75–83.
- Sugiura, Y., Ikeda, K., Nakano, M., 2015. High Membrane Curvature Enhances Binding, Conformational Changes, and Fibrillation of Amyloid- β on Lipid Bilayer Surfaces. *Langmuir* 31, 11549–11557.
- Terakawa, M.S., Lin, Y., Kinoshita, M., Kanemura, S., Itoh, D., Sugiki, T., Okumura, M., Ramamoorthy, A., Lee, Y.-H., 2018. Impact of membrane curvature on amyloid aggregation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1860, 1741–1764.

- Vestergaard, M., Hamada, T., Morita, M., Takagi, M., 2010. Cholesterol, lipids, amyloid Beta, and Alzheimer's. *Curr. Alzheimer Res.* 7, 262–270.
- Vignaud, H., Bobo, C., Lascu, I., Sörgjerd, K.M., Zako, T., Maeda, M., Salin, B., Lecomte, S., Cullin, C., 2013. A Structure-Toxicity Study of A β 42 Reveals a New Anti-Parallel Aggregation Pathway. *PLoS ONE* 8, e80262.
- Xu, Y., Shen, J., Luo, X., Zhu, W., Chen, K., Ma, J., Jiang, H., 2005. Conformational transition of amyloid -peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 5403–5407.
- Yu, X., Wang, Q., Pan, Q., Zhou, F., Zheng, J., 2013. Molecular interactions of Alzheimer amyloid- β oligomers with neutral and negatively charged lipid bilayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 8878.

Supplementary Information

Attenuated Total Reflectance –Fourier Transform InfraRed spectroscopy spectra fitting

After blank subtraction, water signal is removed by FFT filtering (Fast Fourier Transform, Fig. S1.A). A low-pass filter is applied to eliminate all frequencies above the cutting value. By choosing carefully the cutting frequency with a large difference with the one of signal prevent spectrum distortion. The resulting spectrum is subsequently processed by applying a multiple peak fit using the Voigt function on the amide band I (1700-1600 cm^{-1}) (Fig. S1. B). Considering that the peak of the α -Helix (1660-1648 cm^{-1}) contribution and the peak of the unordered contribution (1648-1640 cm^{-1}) often overlap we decided to assign a single peak for both (Jackson and Mantsch, 1995; Miller et al., 2013; Sarroukh et al., 2013).

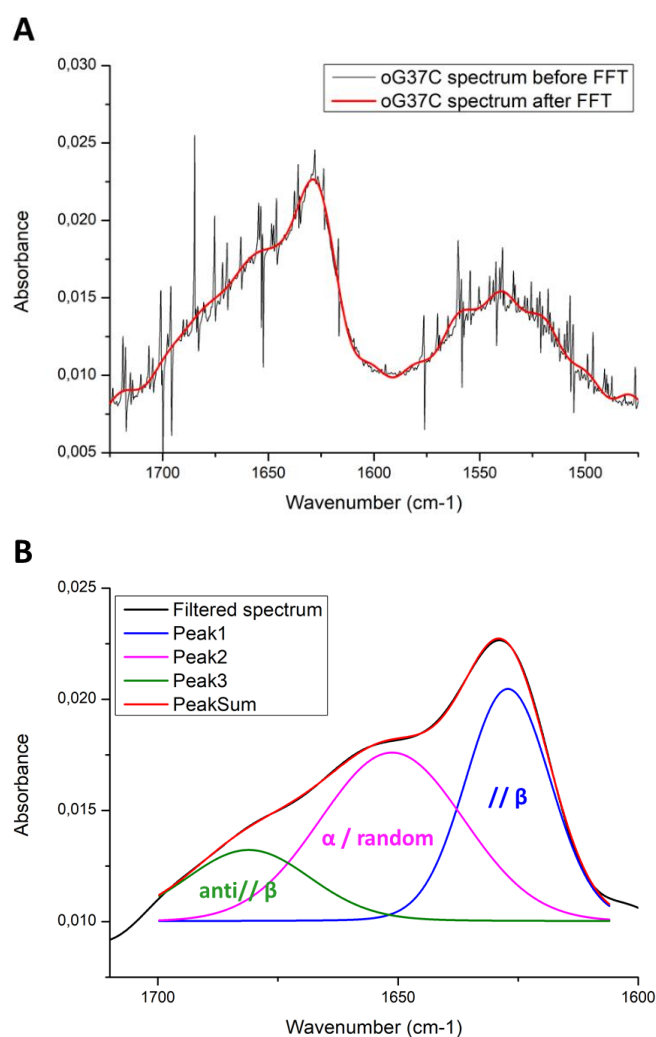


Fig. S1. A. ATR-FTIR spectrum FFT filtration using a low band pass **B.** Multiple peak fit of amide band I spectrum using the Voigt function.

3. INTERACTIONS MOLECULES/A β /MEMBRANES

L'objectif du troisième axe de ce projet de thèse est d'inclure des modulateurs de l'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂ dans l'environnement mis en place pour le second axe.

Les modulateurs sont cinq molécules sélectionnées dans la littérature connues pour agir à différentes étapes de la cinétique d'agrégation : le bexarotène, l'adapalène, le chicago sky blue 6B, l'indométacine et l'*o*-vanilline. De plus, une molécule hit, identifiée au cours d'un travail de thèse précédemment réalisé au CERMN, le MR32741, est également étudiée afin d'appliquer le test à une molécule en développement.

Les interactions molécules/membranes sont d'abord caractérisées avec la détermination du coefficient de partage et le *liposome leakage assay* développés dans le premier axe. Afin de compléter cette caractérisation, l'anisotropie de fluorescence du DPH/TMA-DPH est étudiée dans le but d'obtenir plus d'information sur la localisation des interactions et leurs effets vis-à-vis de la rigidité membranaire.

Les études cinétiques se font par suivi de la fluorescence de la ThT avec le protocole mis au point dans le second axe, en absence et/ou présence des liposomes et/ou des modulateurs. En parallèle, les composés sont testés sur le peptide oG37C afin d'analyser les effets cinétiques et structuraux sur une forme oligomérique, potentiellement toxique. Le *liposome leakage assay* a également été réalisé afin d'évaluer l'impact des interactions entre l'oG37C, les modulateurs et les membranes sur la déstabilisation membranaire des liposomes. Ces études sont croisées avec des mesures de DLS permettant d'étudier cette déstabilisation de façon plus fine et de distinguer différents effets sur les populations liposomales.

Drug/ β -amyloid peptide/membranes interactions: Development and application in drug discovery of multiparametric tools enabling the characterization of this interactome of interest for Alzheimer's disease treatment

Abbreviations

A β	Amyloid β
AD	Alzheimer disease
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform InfraRed
CF	Carboxyfluorescein
CHOL	Cholesterol
CSB	Chicago Sky Blue
DLS	Dynamic light scattering
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
K _p	Partition coefficient
LLA	Liposome leakage assay
LUVs	Large unilamellar vesicles
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PdI	Polydispersity Index
SPC	Soybean phosphatidylcholine
ThT	Thioflavine T
UV	UltraViolet
WT	Wild-Type

: Alzheimer's disease; liposomes; β -amyloid; interactome; drug discovery.

1. Introduction

The aggregation of amyloid proteins is a key event in neurodegenerative disease pathogenesis, especially in the case of Alzheimer's Disease (AD) (Ghisso and Frangione, 2002). Indeed, AD is the most widespread form of senile dementia worldwide and represents the leading socioeconomic problem in healthcare. AD-related costs were estimated at US \$ 818 billion in 2015 (1.1% of global Gross Domestic Product) and are expected to reach US \$ 2 trillion in 2030 and over € 250 billion in Europe. The onset and the progression of this neurodegenerative disease is associated with the aggregation of the amyloid- β peptide (A β) (Bharadwaj et al., 2009; Dumery et al., 2001; Murphy and LeVine, 2010).

An attractive therapeutic strategy, that is proposed by medicinal chemists, is the development of molecules able to interfere at specific steps of this fibrillation process (Attar et al., 2013; Landau et al., 2011; Stefani and Rigacci, 2013). Compounds that would be able to prevent or inhibit the formation of A β molecular species that mediate cellular toxicity are particularly appealing (Sengupta et al., 2016). There is particular interest in the development of compounds able to prevent the formation of toxic oligomers or redirecting the aggregation to alternative pathways (Arosio et al., 2014; Bieschke et al., 2012).

To identify such compounds, analytical tools are required to provide kinetic analysis to study the entire fibrillation process in time but also analytical methods to precisely characterize the most toxic A β species reliable to their secondary structure (Berthelot et al., 2013). Many years of study in the field of A β peptide physiopathology have allowed the development of analytical methods widespread in the analysis of amyloid proteins. The peptide self-assembly kinetics process is almost systematically studied by kinetic monitoring of the fluorescence of Thioflavin T (Biancalana and Koide, 2010). Peptide and protein conformation can be studied through the use of spectroscopic methods such as Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform InfraRed spectroscopy (Sarroukh et al., 2013).

Nevertheless, in the drug discovery process, methodologies are also required to characterize the interactions of molecules or/and A β with membranes (Ashley et al., 2006; Gibson Wood et al., 2003; Nunes et al., 2011a; Vestergaard et al., 2010). Liposomes, whose production is mastered nowadays, are able to mimic organic lipid bilayers by taking into account various physicochemical properties like lipid composition, pH, membrane anisotropy or electrostatic forces (Akbarzadeh et al., 2013; Morigaki and Tanimoto, 2018; Smeralda et al., 2019).

The use of liposomes as a membrane model to study interactions in terms of molecules lipophilicity, membrane fluidity changes and also destabilization processes associated with membrane toxicity appears to be a solid choice for the drug discovery process (Daniela R.P. Loureiro et al., 2018; Magalhães et al., 2010; Nunes et al., 2013; Smeralda et al., 2019).

In the present study, we propose to combine experimental methods to allow a multiparameter characterization of potential modulators of A β ₁₋₄₂ fibrillation. These kinetic studies are carried out in presence of liposomes because it has been established that neuronal lipids are an important factor in the formation of the amyloid fibers (Chaibva et al., 2018; Gibson Wood et al., 2003; Habchi et al., 2018; Matsuzaki, 2014; Poojari et al., 2013; Terzi et al., 1997).

We decided to use different sources of peptides to correlate the different results. Firstly, a ready to use kit of interest in drug discovery (AS-72214, SensoLyte®) and the isolated peptide commercially provided. In a second time, we focused on the oligomeric species of the peptide. Indeed, it is really difficult to obtain a stable and homogeneous solution of A β in oligomeric form (Breydo and Uversky, 2015; Fa et al., 2010; Stine et al., 2010). In order to work with a solution containing exclusively oligomers, we have decided to use a stable mutant model synthesized by Vignaud et al. 2013. This mutant, named oG37C, that was obtained after mutagenesis of A β , has been identified as the most toxic stable oligomeric mutant among 6000 clones (Vignaud et al., 2013).

By the past, Necula *et al.* (2007) proposed a classification of known compounds into 3 different classes: molecules that inhibit oligomerization but not fibrillation, compounds that inhibit fibrillation but not oligomerization and compounds that inhibit both (Necula et al., 2007). On the basis of this segregation, we have chosen some molecules to establish and validate our multiparametric approach: chicao sky blue, indomethacin and *o*-vanillin. Moreover, in other recent works, some compounds like adapalene and bexarotene were identified to inhibit specific microscopic steps of A β ₁₋₄₂ aggregation in AD (Habchi et al., 2017). Last but not least, from drug discovery works, MR32741 has been identified as a promising original compound for the treatment of AD (Jourdan et al., 2016). We have therefore selected these 6 molecules with potentially different effects in order to set up a simple and rapid test adapted to the early screening of new compounds, and to determine its interest to screen and identify original molecules of interest for the treatment of AD.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Soybean phosphatidylcholine (SPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt (DOPG) were gifts from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). 3-(trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3- d_4 acid (TMSP), adapalene, bexarotene, carboxyfluorescein (CF), cholesterol, chicago sky blue 6B, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), dimethyl sulfoxide (DMSO), *o*-vanillin, potassium chloride, potassium phosphate, Sepharose[®] CL-4B, sodium chloride, sodium phosphate, thioflavin T, TMA-DPH (1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene *p*-toluenesulfonate), Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Ammonium hydroxide was obtained from VWR (Randor, Pennsylvania, USA), dithiothreitol from Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA), Hepes buffer from Grosseron (Coueron, France). Indomethacin was purchased from Alfa Aesar (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and MR32741 was synthesized according to the process previously described (Jourdan et al., 2016).

2.2. Liposomes

2.2.1. Formulation of liposomes

Various liposome compositions were used in this study, based on either 100 % SPC, 100% DOPG, or on mixtures of SPC:cholesterol:DOPG in a molar ratio of 6:2:2 (PCG₆₂₂) or 2:2:6 (PCG₂₂₆).

Liposomes were formulated according to the adapted method of the thin lipid film hydration (Bangham et al., 1965). Lipid solutions in chloroform/methanol (4:1) were evaporated under nitrogen flow, and left under vacuum for 3-4 h to form a lipid film. This thin lipid film was then hydrated in Hepes buffer (Hepes 50 mM, NaCl 107 mM, pH 7.4) for liposomes dedicated to partition coefficient determination or Phosphate Buffered Saline (PBS) buffer (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ et 2mM de KH₂PO₄) for other experiments, and vortexed. Rehydrated lipid suspensions were subjected to 1h hour of gentle agitation in order to have maximum homogenization. Free-thaw cycles were carried out with liquid nitrogen and a 40°C water bath. The yielded multilamellar vesicles (MLVs) were then extruded 13 times with a mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama, USA) through polycarbonate membranes with a pore diameter of 100 nm (Avanti Polar Lipids, Inc.) to form LUVs.

2.2.2 Characterization of liposomes by dynamic light scattering

The average hydrodynamic diameter associated with the polydispersity index (PDI) of the formulated LUVs were measured by dynamic light scattering (DLS) using a NanoZS® apparatus (Malvern Instruments SA, Worcestershire, UK). The zeta potential was calculated from the electrophoretic mobility using the Smoluchowski equation, also using a NanoZS® apparatus. The measurements were performed in triplicate at 25°C after a 1:100 (v/v) dilution in the buffer.

2.2.3 Lipid quantification by NMR spectroscopy

The lipid concentration of the formulated LUVs was quantified by ¹H NMR spectroscopy (Hein et al., 2016). ¹H NMR measurements were performed at ambient temperature for SPC, and DOPG-based LUVs, or at 50°C for PCG₆₂₂ and PCG₂₂₆ LUVs on a Bruker Avance III spectrometer (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) equipped with a 5 mm probehead operating at 400 MHz. The instrument's standard settings (90° pulse angle, 2.72 s acquisition time, 3 s relaxation delay, 15 ppm spectral width) were used. Locking and shimming was performed on the signal of the exchangeable deuterium atoms of the D₂O/CD₃OD mixtures. 64 scans were performed leading to a total acquisition time of 6 min 20 s. Data processing was performed with Topspin 3.5 After zerofilling to 64 k data points, apodization (exponential and Gaussian functions, 1 Hz), Fourier transformation, phase- and baseline correction, the peak areas were determined by integration. TMSP was used as an internal standard ($\delta = 0$ ppm). For samples with increased amounts of water, presaturation of the water peak ($\delta = 4.79$ ppm) was used to ensure that the dynamic range of the instrument was not exceeded during the measurement.

2.2.4 Determination of partition coefficient by derivative UV-spectrophotometry

The partition coefficients (K_p) of the molecules were determined according to our previous methodology (Smeralda et al., 2019). Briefly, 5 μ L of each stock compound solution (750 μ M in DMSO) was added to Hepes buffer (50 mM, 107 mM NaCl, pH 7.4) with increasing concentrations of phospholipids (0 to 900, 1000 or 4000 μ M) to give a final volume of 250 μ L. The corresponding reference solutions were identically prepared in absence of molecule. The microplate was incubated in a Biotek Synergy 2 microplate reader (Biotek, Colmar, France) at 37.0 °C \pm 0.1 °C for 1 hour with regular homogenization. The absorption spectra were then recorded using 1 nm wavelength interval in the 250-500 nm range at 37°C.

The corrected absorption spectra of compounds were obtained by subtracting the spectrum of the liposomal solution used at the same concentration. Spectra data recovery was performed using Microsoft® Excel® 2016. Second derivative spectra were calculated by using a second-order polynomial convolution of 9 points with GraphPad Prism (version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The following equation was applied to determine the Kp value after a non-linear regression analysis and a graph plotting performed with GraphPad Prism:

$$D_t = D_w + \frac{(D_t - D_w) \cdot K_p \cdot \gamma \cdot [L]}{1 + K_p \cdot \gamma \cdot [L]}$$

where D_t is the derivative value of the absorbance spectrum of the molecule at a given λ (nm) and a given concentration of phospholipids (M), D_t corresponds to the derivative value of the absorbance spectrum of the molecule in the lipid phase, D_w is the derivative value of the absorbance spectrum of the molecule in the aqueous phase, $[L]$ is the experimental concentration in phospholipids. γ is the phospholipid molar volume. All experiments were performed in triplicate, by using 3 measurements each time. Data are presented as means \pm standard deviation of the three experiments.

2.2.5 Liposomes leakage assay (LLA)

Carboxyfluorescein (CF)-loaded LUVs were prepared by the thin lipid film hydration as described in 2.2.1. The hydration step was carried out with a 70 mM CF solution prepared in PBS buffer. The obtained LUVs were separated from unincorporated CF by passage through a Sepharose® CL-4B loaded (Sigma-Aldrich) column, using PBS buffer as eluent. The LUVs were characterized by DLS and the lipids were quantified by NMR spectroscopy as described in 2.2.3, and 2.2.4, respectively. The dequenching of the CF fluorescence was measured using a Synergy 2 microplate reader (Biotek, Colmar, France) equipped with the appropriate filters ($\lambda_{ex} = 485/20$ nm and $\lambda_{em} = 528/20$ nm). CF release assay was performed in a final volume of 100 μ L, using 10 μ M of LUVs. The fluorescence was recorded immediately (F_0) and for 4h at 25°C. It was compared with that measured at the end of the experiment after addition of 2 μ L of 20% Triton X-100 solution to achieve complete liposome leakage (F_{max}). To validate the Liposome Leakage Assay results, the sensibility rate $R = F_{max}/F_0$ was calculated, and it had to be greater than 6 to perform studies. Then, the percentage of CF release was calculated according to the following equation (Jimah et al., 2017):

$$\% \text{ CF leakage (t)} = [(F_t - F_0) / (F_{max} - F_0)] \times 100$$

where F_t was the fluorescence intensity at time t, F_0 the initial fluorescence intensity, and F_{max} the final fluorescence intensity after addition of Triton X-100.

The data of LLA were plotted with GraphPad® Prism statistical software (version 6.01, GraphPad® Software, La Jolla, CA, USA). Comparison at reference values (oG37c alone) were performed with Mann-Whitney test. Differences were considered significant when the associated *p* value was below 0.05.

2.2.6 Fluorescence polarization anisotropy experiments

Membrane fluidity studies were conducted using DOPG, PCG₆₆₂ and PCG₂₂₆, and by incorporating DPH and TMA-DPH. The LUVs were prepared by the thin lipid film hydration as described in 2.2.1, and the probes were directly added during the thin film formation after solubilization of DPH and TMA-DPH at 11.6 mg/mL in chloroform and in DMSO, respectively. The obtained LUVs were separated from unincorporated probes by passage through a Sepharose® CL-4B loaded (Sigma-Aldrich) then characterized by DLS and NMR spectroscopy as described in 2.2.3, and 2.2.4, respectively. The tested molecules were solubilized in DMSO at 100-fold the final concentration to obtain 2% of DMSO by addition of 2 µL in the 200 µL final volume. Fluorescence anisotropy measurements were performed each 30 min for 3 hours at 25°C in a Synergy 2 microplate reader (Biotek, Colmar, France) equipped with the appropriate filters ($\lambda_{\text{ex}} = 360/40$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 460/40$ nm). The excitation and emission wavelengths were set to 358 nm and 429 nm, respectively. The sample were excited with vertically polarized light and fluorescence intensities were recorded with the analyzing polarizer oriented parallel (I_{\parallel}) and perpendicular (I_{\perp}) to the excitation polarizer. The anisotropy emission was calculated according to the equation (Lakowicz, 2006):

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

The results were expressed in percentage using the anisotropy of the samples without molecules (only 2% DMSO) as 100%.

2.3 Amyloid-β peptide

2.3.1 Production and purification of oG37C

oG37C variant was produced and purified with minor modifications of the protocol previously described (Vignaud et al., 2013). Briefly, after transformation in the bacterial strain 969 (B121de3pLysS) with the plasmid pET Sac Abeta, one clone was grown on 10 mL LB medium preculture that contained 1 % dextrose, 100 mg/L ampicillin, and 25 mg/L chloramphenicol.

This one-day preculture was added to 990 mL of ZYM medium (1 % Tryptone, 0.5 % yeast extract, 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 2 mM MgSO₄) containing 100 mg/mL ampicillin and 25 mg/mL chloramphenicol and incubated overnight at 37°C. Cell pellet (1g / 2.5 mL of TE buffer) were subjected to 3 cycles of sonication (respectively 5, 4 and 2 sonication of 1 min on ice, output 40 %), and then centrifuged for 15 min at 30,000 g at 4°C after each cycle. The pelleted inclusion bodies were solubilized at 1.25 mg per 10 mL of TE-urea buffer (8 M urea, 50 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8). After overnight at 4°C with gentle agitation, the soluble inclusion bodies were centrifuged for 30 min at 30,000 g at 4°C. The supernatant was passed through a 30 kD filtration unit for 2 h at 4,000 g at 4°C and concentrated on a 5 kD membrane at 4000 g at 4°C. Monomeric and oligomeric species of A β were separated by size-exclusion chromatography on a Superdex-75 10/300 GL Column equilibrated in phosphate-buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4) at 4°C. The fractions were pooled separately, and aliquots were quantified with a Bradford assay, frozen in liquid nitrogen, and conserved at -80°C until use.

2.3.2 A β treatment

Recombinant A β ₁₋₄₂ was purchased from rPeptide (Watkinsville, GA 30677, USA). The lyophilized powder was solubilized in 1% NH₄OH, at a concentration of 1 mg/mL. After 3 min of sonication, resuspension was achieved using PBS buffer at pH 6.3 to reach a final pH around 7.4. The Sensolyte[®] Thioflavin T Beta-Amyloid (1-42) Aggregation kit was purchased from Anaspec (Fremont, CA 94555, USA), and further used according to manufacturer's protocol, and as described before (Jourdan et al., 2016).

2.3.3 A β peptides self-aggregation kinetic assay (ThT, Thioflavin T fluorescence)

10 μ M of A β peptides (WT or oG37C) were incubated in 96-well dark plates in presence of absence of liposomes (10 or 100 μ M) and of tested compounds used at various concentrations (described in the results) with 20 μ M of ThT at 25°C. Fluorescence measurements (λ_{exc} = 440 nm and λ_{em} = 484 nm) were made with an Infinite M200 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). Data were collected as the average of 25 flashes each 10 min with 20 sec of 1 mm orbital agitation before each run. Data is represented after blank subtraction; each representation combines the triplicate of an experiment.

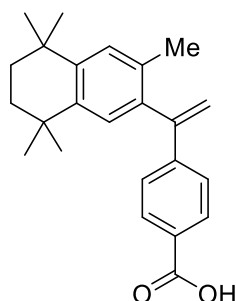
2.3.4 Attenuated Total Reflectance –Fourier Transform InfraRed spectroscopy (ATR-FTIR)

Samples were incubated overnight at 25°C before FTIR experiments to reach the plateau of the aggregation process. 3 μL of each sample was loaded on a germanium crystal and dried with a stream of dry nitrogen.

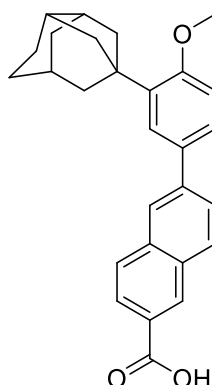
ATR-FTIR spectra were recorded on a Nicolet IS50 FTIR spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with DLaTG (Deuterated Lanthanum α -alanine-doped TriGlycine sulfate) and MCT (Mercury Cadmium Telluride) detectors with a spectral resolution of 2 cm^{-1} . 128 interferograms, were co-added after a 2 min acquisition. All FTIR experiments were done in a thermostatically controlled room at 25°C. For signal processing, after blank subtraction, all spectra were fitted using OriginPro[®] 8.5.1. The deconvolution of the amide I band of the spectra was performed using a Fast Fourier Transform (FFT) low-band. The value of cutting frequency was determined by FFT of typical experimental FTIR spectra in order to remove high frequency contribution significantly larger than the typical amide frequency. The Voigt function type option was selected to take into account two kind of contributions: Lorentzian and Gaussian.

3. Results and discussion

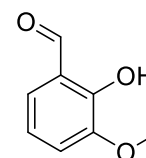
A. bexarotene



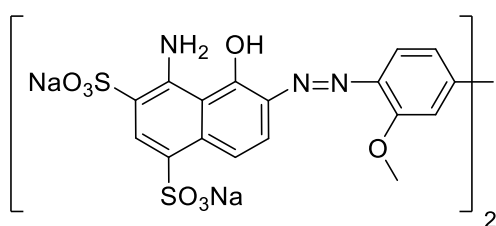
B. adapalene



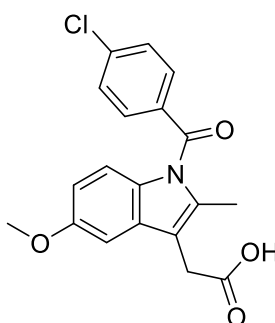
C. *o*-vanillin



D. chicago sky blue



E. indomethacin



F. MR32741

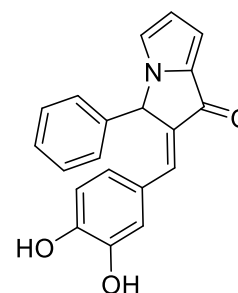


Fig. 1. Molecular structure of the tested molecules: **A.** bexarotene, **B.** adapalene, **C.** *o*-vanillin, **D.** chicago sky blue, **E.** indomethacin, **F.** MR32741.

In order to implement our studies, we first determined the experimental conditions by taking into account the available bibliographic data. Necula *et al.* (2007) determined the oligomeric inhibiting potency (IC_{50}) of chicago sky blue (CSB, $2.58 \pm 0.57 \mu\text{M}$), indomethacin ($958 \mu\text{M}$), *o*-vanillin ($6.15 \pm 1.02 \mu\text{M}$) and also ThT ($122.19 \pm 32.97 \mu\text{M}$) with an ELISA assay using the A11 antibody (Necula *et al.*, 2007). In regard of these results, we decided to use for our experiments ThT at $20 \mu\text{M}$ to avoid any inhibiting effects specific to the ThT, and to test indomethacin at 10, 100 and $1000 \mu\text{M}$, CSB and *o*-vanillin at 0.1, 1 and $10 \mu\text{M}$ to bracket the IC_{50} . Adapalene and bexarotene were then assessed at 0.2, 2 and $20 \mu\text{M}$.

3.1. Bexarotene

Bexarotene is a retinoid X receptor (RXR) agonist, now approved by the US Food and Drug Administration, and the European Medicines Agency for the treatment of cutaneous T cell lymphoma (Boehm et al., 1995). The drug, with Targretin® brand name (Eisai Ltd.), is available as soft capsules that are administered by the oral route.

This lipophilic molecule shows some structural similarity to the abundant membrane cholesterol (Fantini et al., 2014). It was reported that this anticancer drug could reduce amyloid plaques and improve mental functioning in a small sample of mice engineered to exhibit Alzheimer's disease like symptoms. It has been suggested that bexarotene stimulates expression of apolipoprotein E (ApoE) leading to intracellular clearance of A β (Cramer et al., 2012).

Regarding such effects, this compound was carried out in clinical trials phase 2 to determine its safety and its effects on abnormal proteins found in the brain in AD. The outcome of this trial was negative with no consistent change in any clinical measure (Cummings et al., 2016). However, recent studies have shown that bexarotene could delay primary nucleation in A β ₁₋₄₂ aggregation (Habchi et al., 2016, 2017; Huy et al., 2017). It could also inhibit the production of A β by other mechanisms, in particular, by inhibiting the intramembrane cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by γ -secretase (Kamp et al., 2018). Considering all the suggested pleiotropic effects of bexarotene and some of them implying membranes, we decided to imply bexarotene as model drug in our studies.

3.1.1. Characterization of the bexarotene-LUVs interactions

3.1.1.1. Determination of bexarotene partition coefficient

By a miniaturized derivative UV-spectrophotometry method initially adapted from that initially described by Magalhães *et al.* 2010 (Magalhães et al., 2010), the determination of K_p has been undertaken for bexarotene.

This miniaturized and simple method allows to rapidly provide partition coefficient values of drugs, and is well adapted to a drug discovery process as we have previously shown (Smeralda et al., 2019). LUVs were used as biomimetic membranes since liposomes are a less restricted membrane tool than micelles that are suitable only for substances with high ϵ and $\log K_p > 3$ (Daniela R. P. Loureiro et al., 2018). LUVs present adequate characteristics of cell membrane models. Indeed, they are formed of a simple bilayer unlike multilamellar or multivesicular vesicles (MLVs or MVVs).

Their composition is flexible and it is possible to vary physicochemical parameters like pH, buffer composition, without detrimental repercussion on their stability unlike single Unilamellar Vesicles (SUVs) (Akbarzadeh et al., 2013). Finally, they are easier to produce and to manipulate than giant unilamellar vesicles (GUVs) (Bagatolli and Gratton, 1999; Stein et al., 2017) making it a suitable tool for screening compounds. Taking into account these different properties, the K_p of bexarotene and further, that of the other studied compounds, have been determined by UV-spectrophotometry using a fixed concentration of drug (15 μM) and increasing concentrations of LUVs at pH 7.4 and 37°C. LUVs were made either of 100% soybean phosphatidylcholine (SPC), or SPC:cholesterol:1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DOPG) in a molar ratio of 6:2:2 (PCG₆₂₂).

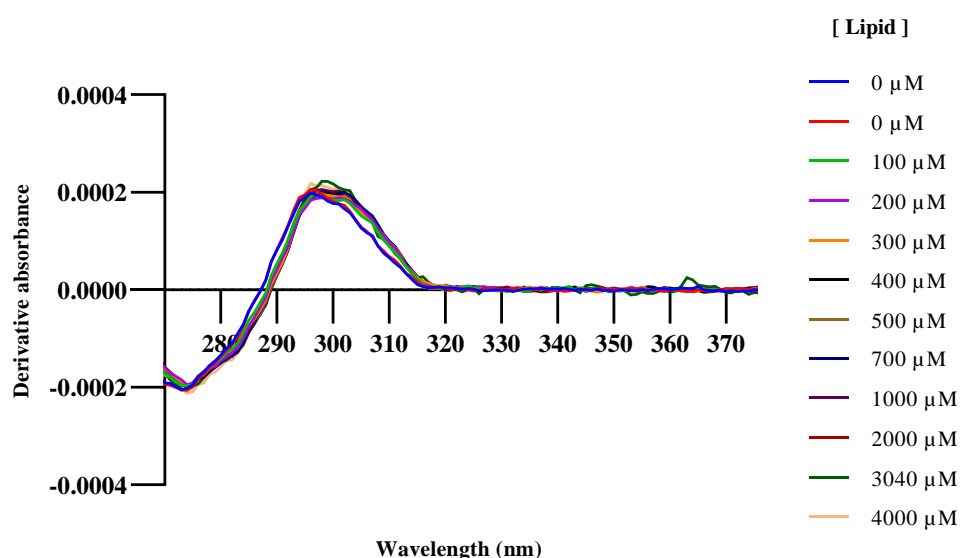


Fig. 2. Second-derivative spectra of bexarotene (15 μM) incubated for 1h in the presence of increasing concentrations of lipids (PCG₆₂₂-based LUVs: 0 to 4 mM) in Hepes buffer (pH 7.4) at 37°C.

After recording the UV-spectra, our data management implies the determination of second-derivative spectra data to highlight isobestic points. Surprisingly, no significant spectral shift was observed with increasing the lipid concentration, independently of the LUVs composition (see for example Fig. 2 for PCG₆₂₂-based LUVs). In these conditions, and despite the prediction of a log $D_{7.4}$ of 3.82 (Table 1), no K_p could be determined for bexarotene (Table 1). To obtain more information about the molecule partition with the LUVs, bexarotene effect on membrane fluidity was assessed.

Table 1. Partition coefficients (expressed as K_p , and $\log K_p$) of the different molecules (15 μM) using 100 % SPC or PCG₆₂₂-based LUVs as model membranes at pH 7.4 and 37 °C (n=3), and compared with values of $\log D_{7.4}$ determined by Chemicalize website (<https://chemicalize.com>). Molecular weight (MW), net charge at pH 7.4, and maximum emission wavelengths used for the analysis were also defined in this table.

	Bexarotene	Adapalene	<i>o</i>-Vanillin	CSB	Indomethacin	MR32741
SPC K_p	-	4556 ± 563	-	-	1,244 ± 204	-
SPC $\log K_p$	-	3.66	-	-	3.09	3.29
PCG ₆₂₂ K_p	-	4212 ± 105	-	-	-	-
PCG ₆₂₂ $\log K_p$	-	3.62	-	-	-	3.09
ref $\log D_{7.4}$	3.82	3.29	1.86	-5.14	0.68	3.99
MW (g/mol)	348.49	412.5	152.15	992.79	357.79	317.34
Charge (pH 7.4)	-1	-1	-0.03	-4	-1	-0.01
λ (nm)	-	347	-	-	297	282

3.1.1.2. Assessment of bexarotene-membrane interactions by fluorescence anisotropy measurement (FPA)

Interactions between a molecule and membranes can modify the physicochemical properties of membranes, and among them, their fluidity. It can be assessed by measuring changes in fluorescence anisotropy that are the reflection of a probe's rotational movement caused by stiffness differences in its environment (Nunes et al., 2011a). DPH and TMA-DPH were used as fluorescence probes since the precise positions of these fluorophores along the membrane depth plane are well established. DPH probe is supposed to have a deep location and a parallel alignment to the acyl chains. TMA-DPH is a rigid molecule that presents a cationic group attached to the DPH phenyl ring. In the membrane bilayer, due to its amphipathic character, TMA-DPH, with its cationic group, is anchored to the surface of the membrane, *i.e.*, within the polar head groups of the phospholipids, while its DPH phenyl ring is located within the hydrophobic acyl chains of the membrane phospholipids (Brittes et al., 2010; Engelke et al., 2001; Illinger et al., 1995).

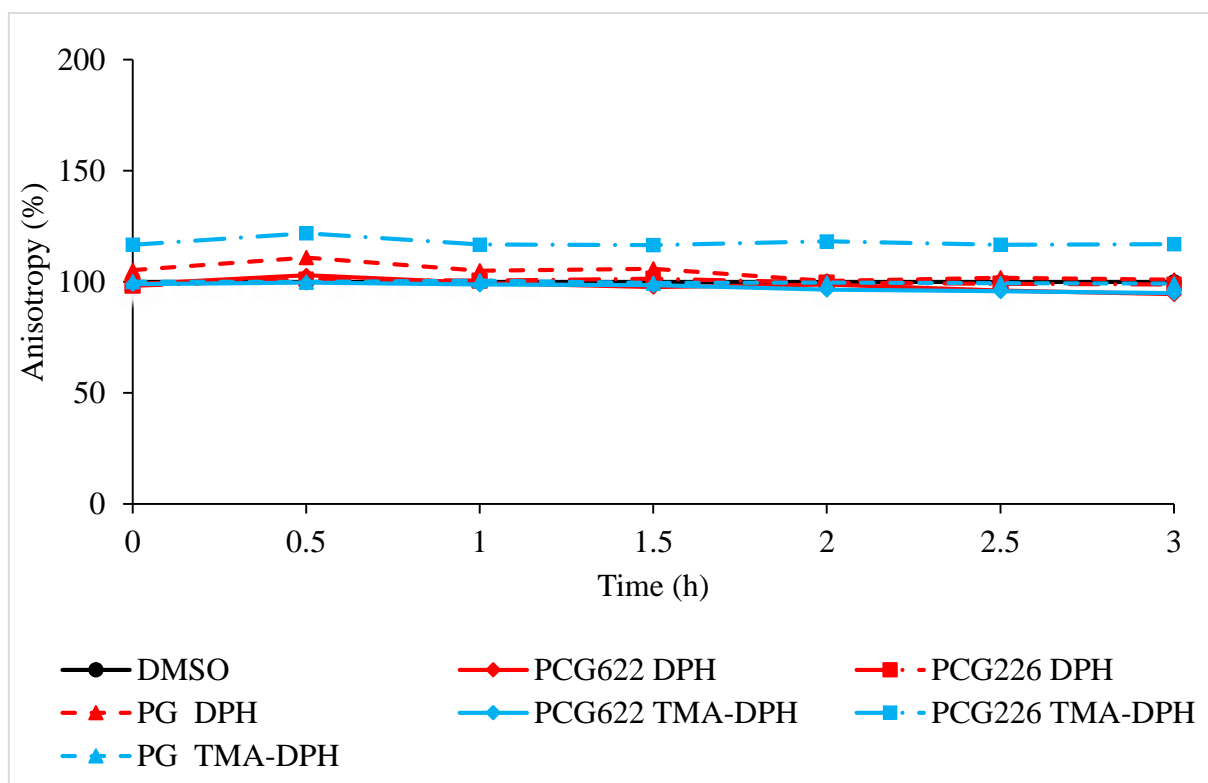


Fig. 2. Steady-state anisotropy of DPH and TMA-DPH as a function of time in each LUV model in absence (only DMSO used as control), and in presence of bexarotene (20 μ M).

In comparison with the control (DMSO), the addition of bexarotene causes no significant anisotropy values changes of DPH and TMA-DPH, indicating that there is no major change in membrane fluidity whatever the membrane composition is. Only a very slight anisotropy variation may be objectified in the case of PCG₂₂₆/TMA-DPH, suggesting some interactions between bexarotene molecules and the most superficial parts of the membranes. Bexarotene shows some structural analogy to the abundant membrane cholesterol (Fantini et al., 2014), which is well known for its chain condensation and membrane thickening effects. Nevertheless, bexarotene is completely lacking a flat ring structure and a lipid chain, and it presents high polarity due to its carboxyl head group (Kamp et al., 2018).

Although only few articles report bexarotene surface studies, Kamp *et al.* (2018) recently showed that bexarotene was able to insert into lipid membranes but did not influence lipid chain order and packing in the membrane. Our results appear coherent with these conclusions drawn from NMR experiments.

3.1.1.3. Assessment of bexarotene-membrane interactions by liposome leakage assay

We further examined the effects of bexarotene on membrane permeability. SCP₂₂₆-based LUVs were formulated with a self-quenching concentration of carboxyfluorescein (CF). In this assay, a change in membrane permeability causes the self-quenched CF to leak out of the lipid vesicle into the external compartment where the fluorophore becomes highly fluorescent (Weinstein et al., 1986). The fluorescence increase over time is indicative of heightened membrane permeability. After completion of the experiment, Triton X-100 was mixed with the vesicles in order to disrupt them, and determine the maximum percentage of leakage.

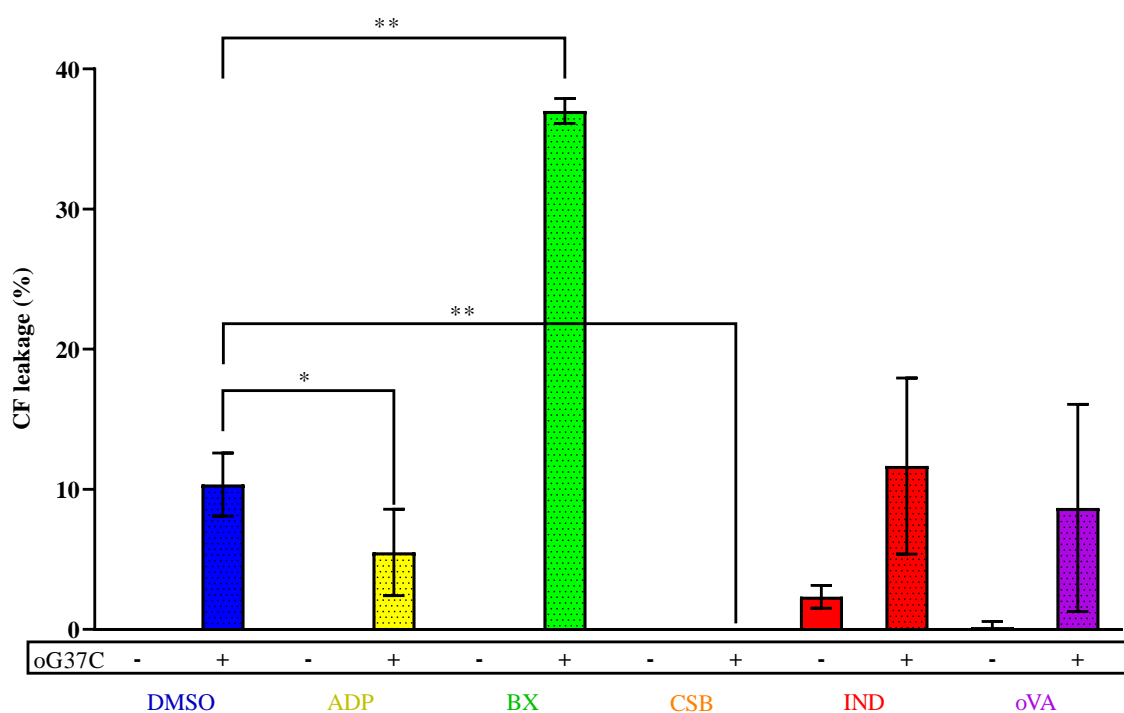


Fig. 3. Carboxyfluorescein leakage from PCG₂₂₆-based LUVs (10 μ M) in absence and in presence of oG37C (10 μ M), and bexarotene (20 μ M), or adapalene (20 μ M), or chicao sky blue (10 μ M), or indomethacin (1 mM), or *o*-vanillin (10 μ M) after 4h of incubation at 25°C. 6 samples data were analyzed by the Mann and Whitney statistical test ($p < 0.05$).

No significant membrane disruptive effect was observed upon exposure to bexarotene. From DLS measurements performed on these samples at the end of experiments, it appears that the majority of the LUVs remained intact after incubation with the molecule for 24 h (Table 2).

From results of these different studies, interactions between bexarotene and model membranes are rather only weakly objectified, and are not accompanied by significant destabilization effects.

3.1.2. Characterization of the bexarotene-A β_{1-42} interactions

The A β peptide aggregation mechanism is a complex process that is not yet fully known. It involves the self-assembly of monomeric species, influenced by the presence of several factors until the formation of amyloid fibers (Rangachari et al., 2018; Šarić et al., 2014). This process is characterized in particular by the formation of soluble intermediate species, including oligomeric and protofibrillar species leading to the fiber formation (Ahmed et al., 2010). After years of investment in research, the variability of the factors that influence the kinetics of aggregation of the peptide as well as the polymorphism of the species formed have led to divergent aggregation models (Agopian and Guo, 2012; Bartolini et al., 2007; Cohen et al., 2013; Gu et al., 2016). *On-* and *off-*pathway paradigms have been proposed (Crespo et al., 2016; Sarroukh et al., 2013; Vignaud et al., 2013) but the main issue is the lack of reproducibility between *in vitro* studies (Hortschansky et al., 2005). To circumvent such difficulties of reproducibility in the fibrillation kinetics, ready-to-use assay kits have been developed, and commercialized (AS-72214, SensoLyte®). Such assay kits, guaranteeing reproducible A β aggregation, by following the suggested protocol of the manufacturer, appear well adapted to drug discovery. In particular, they seem appealing to highlight compounds endowed with an overall antiaggregating effect. The fibers formation inhibition is determined by measuring thioflavin T (ThT) fluorescence, since ThT is a well-known dye that binds to amyloid fibers assembled in β -sheets (Biancalana and Koide, 2010). By using such an assay kit, by following the proposed protocol, and by implying control molecules, bexarotene was incubated for 150 min with the A β_{1-42} peptide, and the formation of fibers was followed by ThT fluorescence measurement.

3.1.2. Characterization of the bexarotene-A β_{1-42} interactions

3.6.6.1 Inhibition of A β_{1-42} aggregation (commercial kit assay) by bexarotene

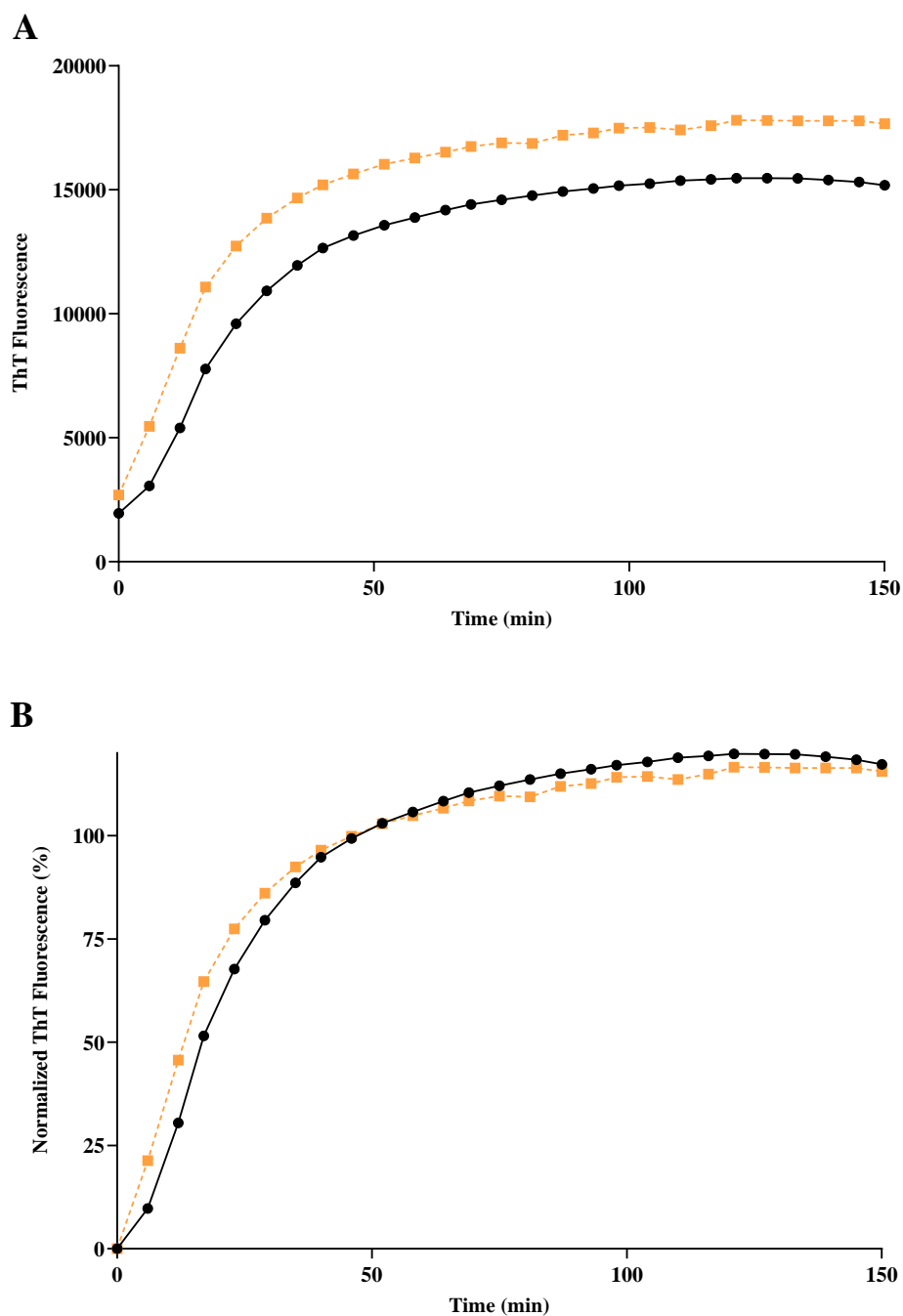


Fig. 4. Evolution of the ThT fluorescence (20 μ M) in presence of A β ₁₋₄₂ alone (46.5 μ M, dark dots) or in presence of bexarotene (20 μ M, orange squares): **A.** raw data, **B.** data normalized to the average of steady-state fluorescence intensity values detected for A β ₁₋₄₂ alone. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

Using the commercial assay, no effect due to bexarotene used at the concentration of 20 μ M was objectified on the aggregation of the peptide (Fig. 4. A.B).

3.1.2.2. Modulation of $A\beta_{1-42}$ peptide aggregation by bexarotene

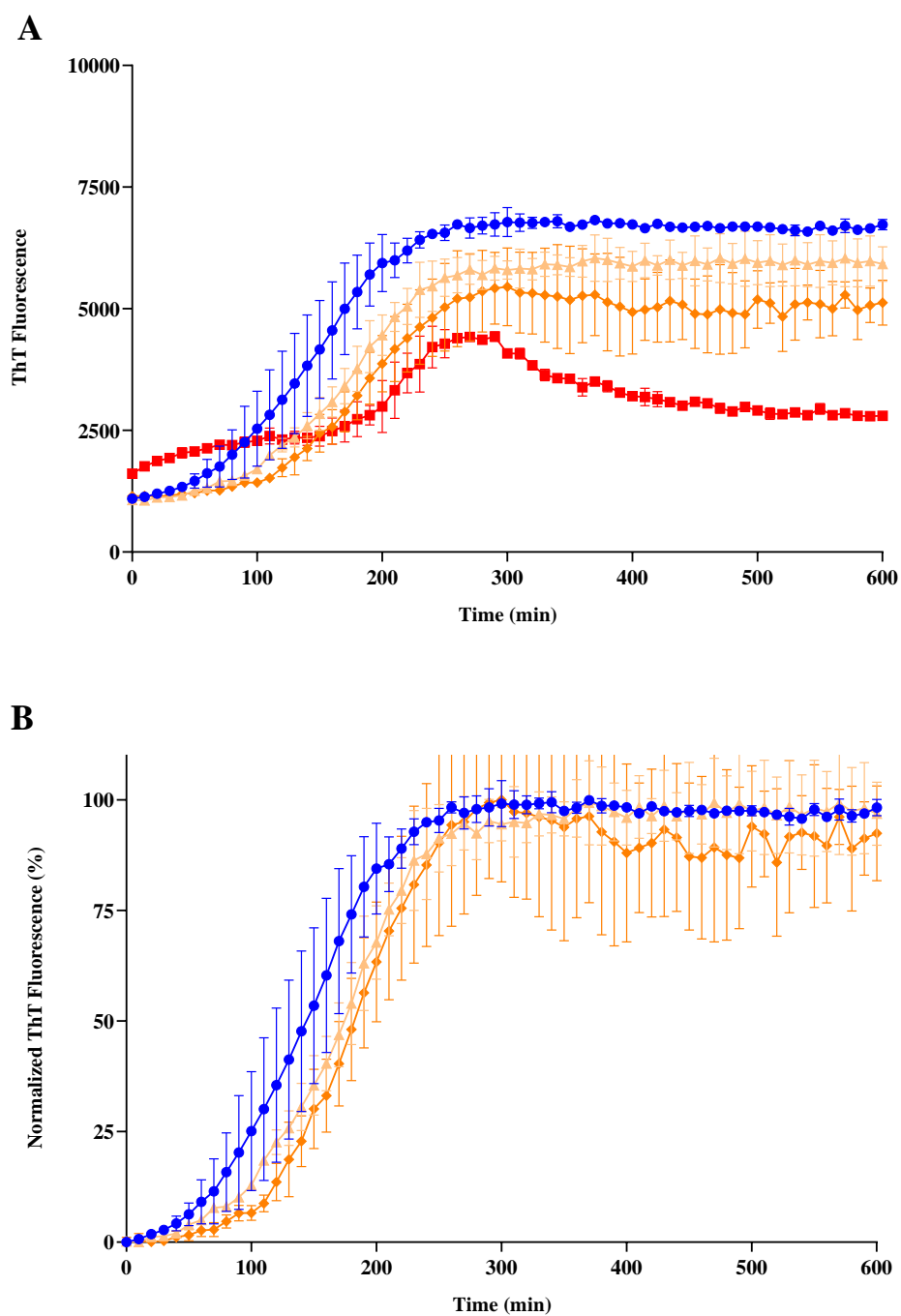


Fig. 5. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for $A\beta_{1-42}$ alone (10 μ M, blue dots), $A\beta_{1-42}$ /bexarotene 0.2 μ M (beige triangles), 2 μ M (orange diamonds), or 20 μ M (red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

The aggregation of the peptide alone makes it possible to reveal the phases of lag, elongation and plateau (Fig. 5), unlike the commercial assay where the phase of elongation is immediate (Fig. 4). The ability of bexarotene to affect A β ₁₋₄₂ peptide aggregation (10 μ M) was studied with a concentration of molecule varying from 0.2 to 20 μ M. From the kinetics profiles (Fig. 5), it appears that the process of fibrillation of A β ₁₋₄₂ is affected by the presence of bexarotene, in a concentration dependent manner: after a lag phase (corresponding to the formation of the nucleus) which is lasted all the more than the bexarotene concentration increases, an exponential increase is observed. After 250 min, a plateau is reached with a steep decrease of fluorescence intensity values at the highest tested bexarotene concentration (20 μ M). Because of this high decrease in fluorescence intensity at the plateau, the normalizing process applied to the other curves becomes aberrant for bexarotene tested at 20 μ M (Fig. 5.B). These results indicate that bexarotene can delay the formation of nuclei, oligomers, and thus inhibit the formation of fibrils. Habchi *et al.* (2016) reported that bexarotene selectively targets the primary nucleation step in A β ₁₋₄₂ aggregation causing a delay in peptide fibrillation (Habchi *et al.*, 2016). Huy *et al.* (2017) have also shown that bexarotene prolongs the lag phase, but is not able to reduce amyloid deposits due to weak binding to A β fibrils. Our results support these conclusions and allow us to conclude that the decrease in plateau intensity is probably due to an interaction of bexarotene with early species and not to a direct interaction on the formed fibrils.

3.1.2.3. Modulation of A β ₁₋₄₂ peptide aggregation by bexarotene in presence of LUVs

The aggregation of the A β peptide can be affected by a variety of external agents, in particular lipids, which can influence the formation of aggregates, their conformational and their toxic properties (Rangachari *et al.*, 2018). It is also known that the use of lipids for the characterization of new compounds presents a major interest in drug discovery (Ribeiro *et al.*, 2010). It therefore seemed essential to include the liposomes in the characterization of the modulators of peptide aggregation. Firstly, we repeated the fluorescence monitoring experiments of ThT under the same conditions but in the presence of 100 μ M of lipids.

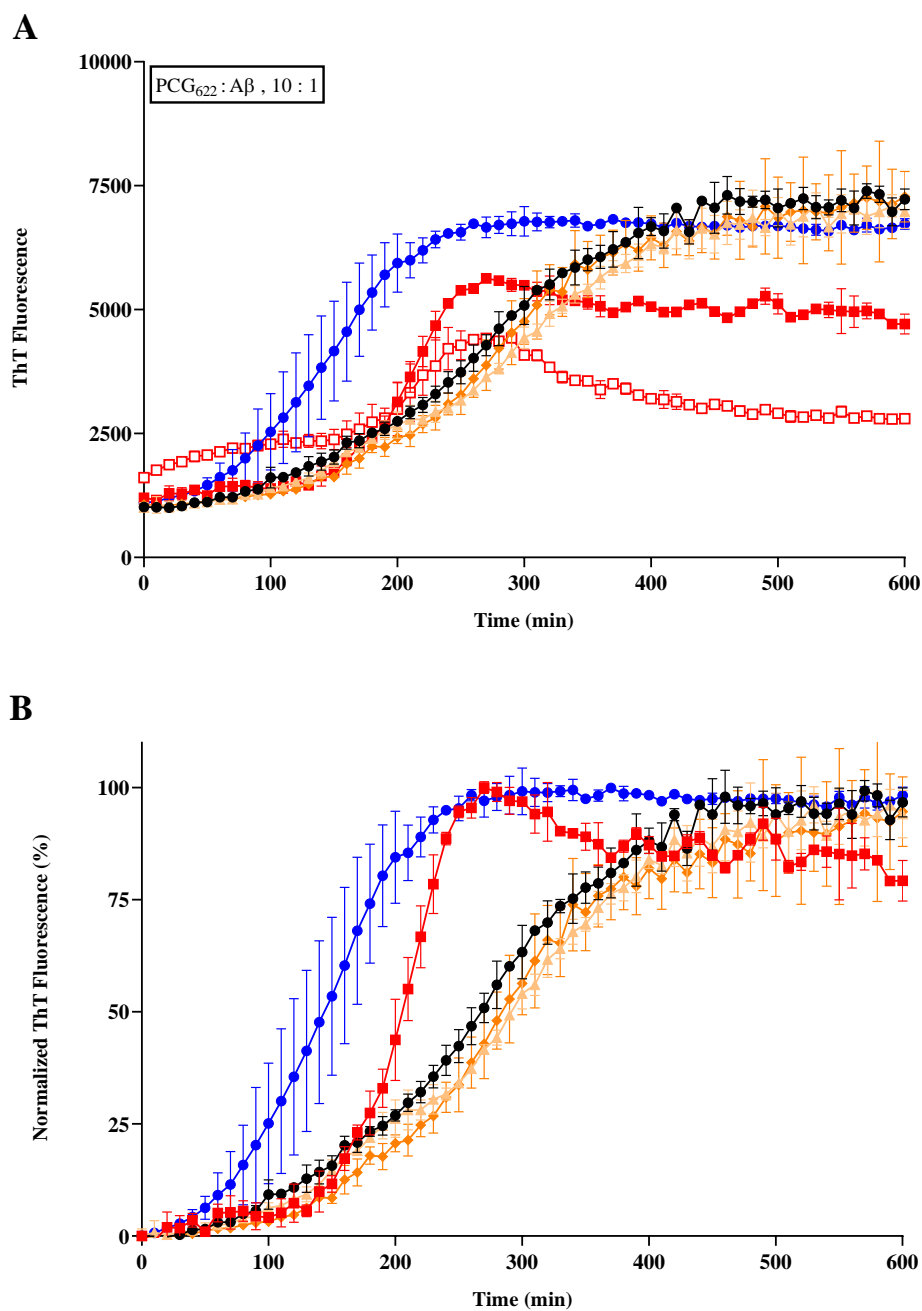


Fig. 6. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for A β ₁₋₄₂ alone 10 μ M (blue dots), A β ₁₋₄₂/bexarotene 20 μ M (empty red squares), A β ₁₋₄₂/PCG₆₂₂-based LUVs 100 μ M (dark dots), A β ₁₋₄₂/PCG₆₂₂-based LUVs and bexarotene 0.2 μ M (beige triangles), 2 μ M (orange diamonds), or 20 μ M (filled red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

The presence of PCG₆₂₂-based LUVs at 100 μM delays the lag phase, indicating that interactions between membranes and Aβ influence the nucleation process of the peptide (Fig. 6). When bexarotene is added at 0.2 or 2 μM, no difference in the aggregation kinetics is shown, suggesting that interactions between Aβ and the liposomes are predominant. At the highest tested concentration of bexarotene (20 μM), an acceleration of the elongation phase and a decrease in the fluorescence intensity at the plateau are observed, but less important compared to bexarotene used alone. From that, in the lipids:bexarotene:Aβ molar ratio of 10:2:1, bexarotene delays the formation of intermediate species and their growth, which results in less formed fibers.

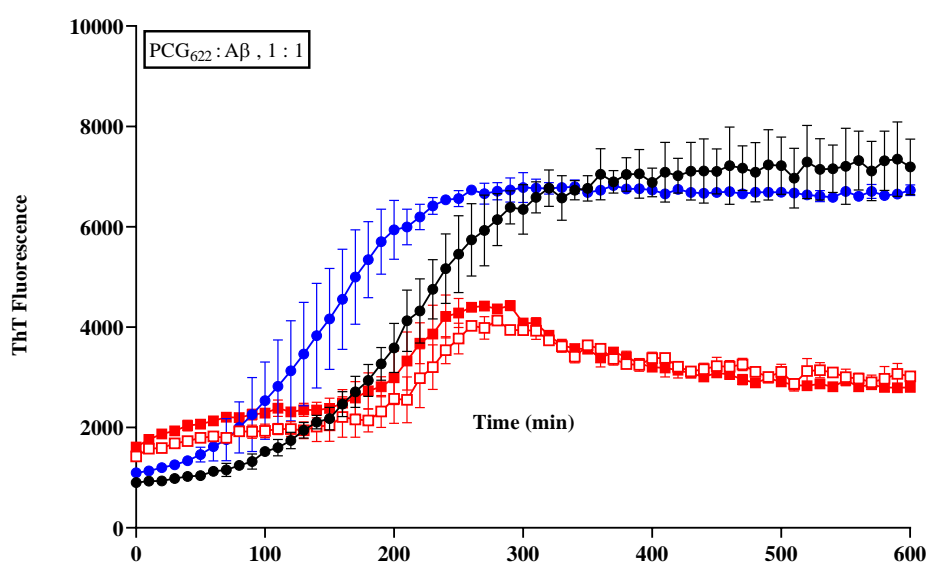


Fig. 7. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for Aβ₁₋₄₂ alone 10 μM (blue dots), Aβ₁₋₄₂/bexarotene 20 μM (empty red squares), Aβ₁₋₄₂/PCG₆₂₂-based LUVs 10 μM (dark dots) and Aβ₁₋₄₂/PCG₆₂₂-based LUVs/bexarotene 20 μM (filled red squares). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

In the presence of PCG₆₂₂-based LUVs at 10 μM, a delay in the fibrillation process is still present in comparison with the peptide used alone (Fig. 7). However, its duration is influenced by the concentration of lipids used, since the lag phase occurs for 100 min at 10 μM vs about 200 min at 100 μM. Thus, interactions between membranes and Aβ influence the nucleation process, but are dependent on the membranes:Aβ ratio. In the lipid:bexarotene:Aβ molar ratio of 1:2:1, considering the superposition of curves obtained for Aβ₁₋₄₂/bexarotene without or with PCG₆₂₂-based LUVs, effect of the bexarotene at 20 μM on Aβ₁₋₄₂ aggregation was not influenced by the presence of membrane.

The interactions between bexarotene and the peptide become predominant and directly influence the fibrillation process.

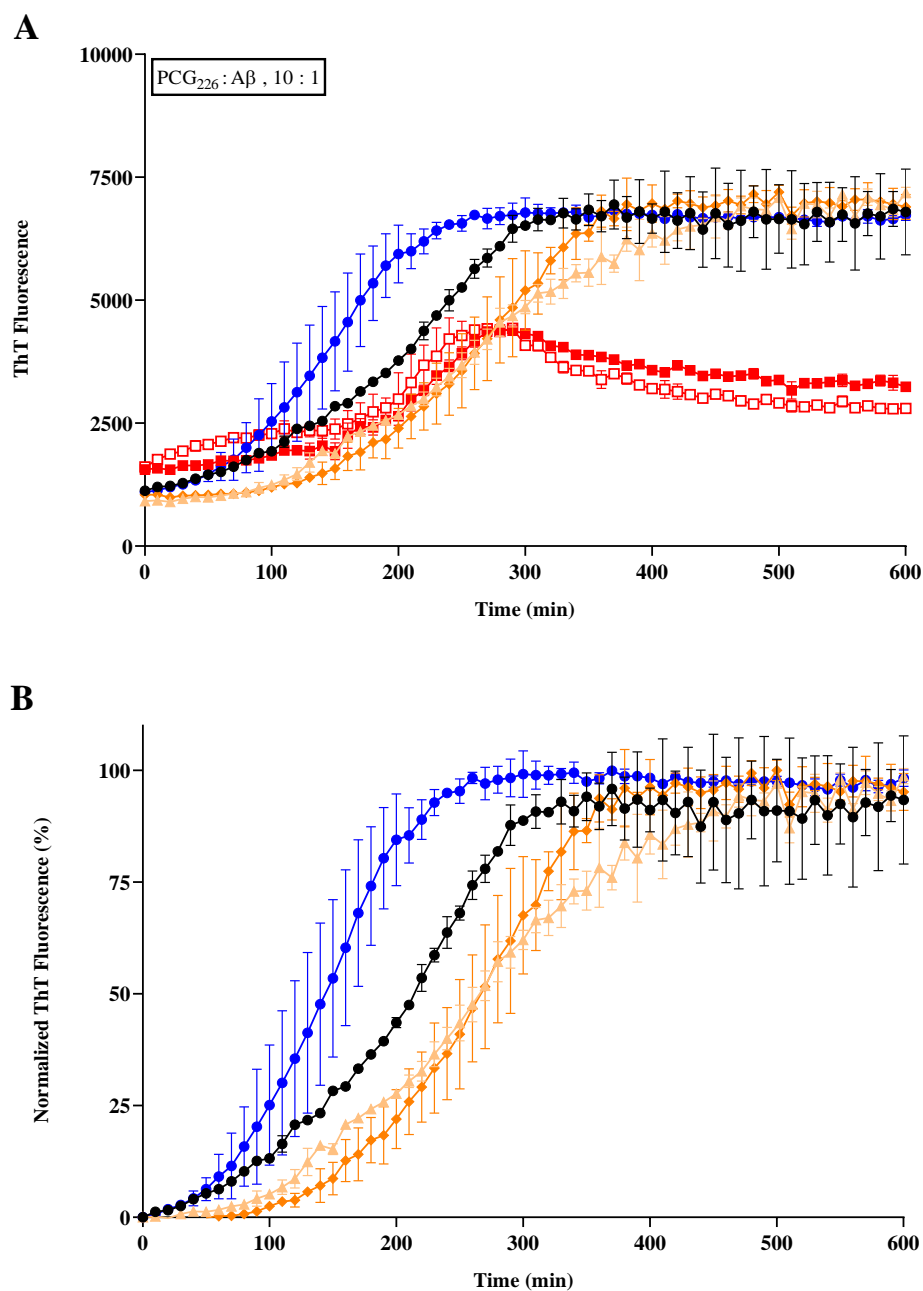


Fig. 8. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for A β ₁₋₄₂ alone 10 μ M (blue dots), A β ₁₋₄₂/bexarotene 20 μ M (empty red squares), A β ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs 100 μ M (dark dots), and A β ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs/bexarotene 0.2 μ M (beige triangles), 2 μ M (orange diamonds), or 20 μ M (filled red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

Then, a second formulation of LUVs (SPC:cholesterol:DOPG in a molar ratio of 2:2:6, and named PCG₂₂₆) charge was tested according to the same procedure. From Fig. 8, it appears that a change in the relative composition of liposomes directly affects the nucleation process. Indeed, although in presence of PCG₂₂₆-based LUVs at 100 μM , a delay of the lag phase is observed as for PCG₆₂₂-based LUVs at 100 μM , its duration is largely lower, comparable to that obtained for PCG₆₂₂-based LUVs at 10 μM . This result shows that the composition of the liposomes influences the interactions with A β . In presence of bexarotene, from the lowest concentrations (0.2 and 2 μM), there is a delay in fibrillation, suggesting that the interactions between bexarotene and A β become dominant. At the highest concentration (20 μM), there is an additional quantitative effect with a diminution of the fluorescence intensity at the plateau of the kinetics. The effect is thus comparable to that obtained for bexarotene without liposomes, as seen with an almost perfect superposition of the curves. When PCG₂₂₆-based LUVs are used, observations are similar whatever the lipid:bexarotene:A β molar ratio used 10:2:1 (Fig. 8) or (1:2:1) (Fig. 9).

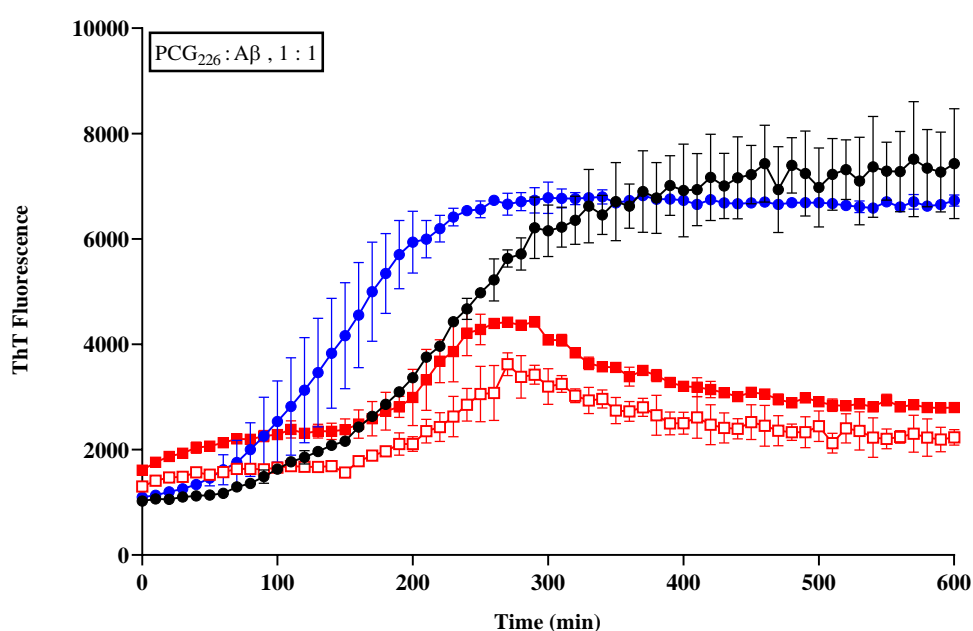


Fig. 9. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for A β ₁₋₄₂ alone 10 μM (blue dots), A β ₁₋₄₂/bexarotene 20 μM (empty red squares), A β ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs 10 μM (dark dots) and A β ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs/bexarotene 20 μM (filled red squares). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

Taking into account all these data, it appears that the ratio and the composition of LUVs implied in the interactome may induce various effects on bexarotene/A β interactions. They can be also different from those observed without membranes. In consequence, according to the concentration of bexarotene used, and according to the membrane or the cellular model implied in assays, the interactions between the drug and A β may be misevaluated, and may result in different conclusions (Tousi, 2015). However, from our studies, it is obvious that bexarotene delays the fibril growth, by interfering with A β species present at the early stages of the fibrillation process (see in particular, the absence of effect by using the kit enabling a reproducible aggregation, but not to highlight effects on the lag phase). Such effects of bexarotene on the prolongation of the lag phase are coherent with those already reported in the literature (Habchi et al., 2017; Huy et al., 2017). Considering that oligomers are considered as the most toxic A β intermediate species, the interactome was further studied by using an oligomer model (Cizas et al., 2010; Cline et al., 2018).

3.1.3. Characterization of the bexarotene-oG37C interactions

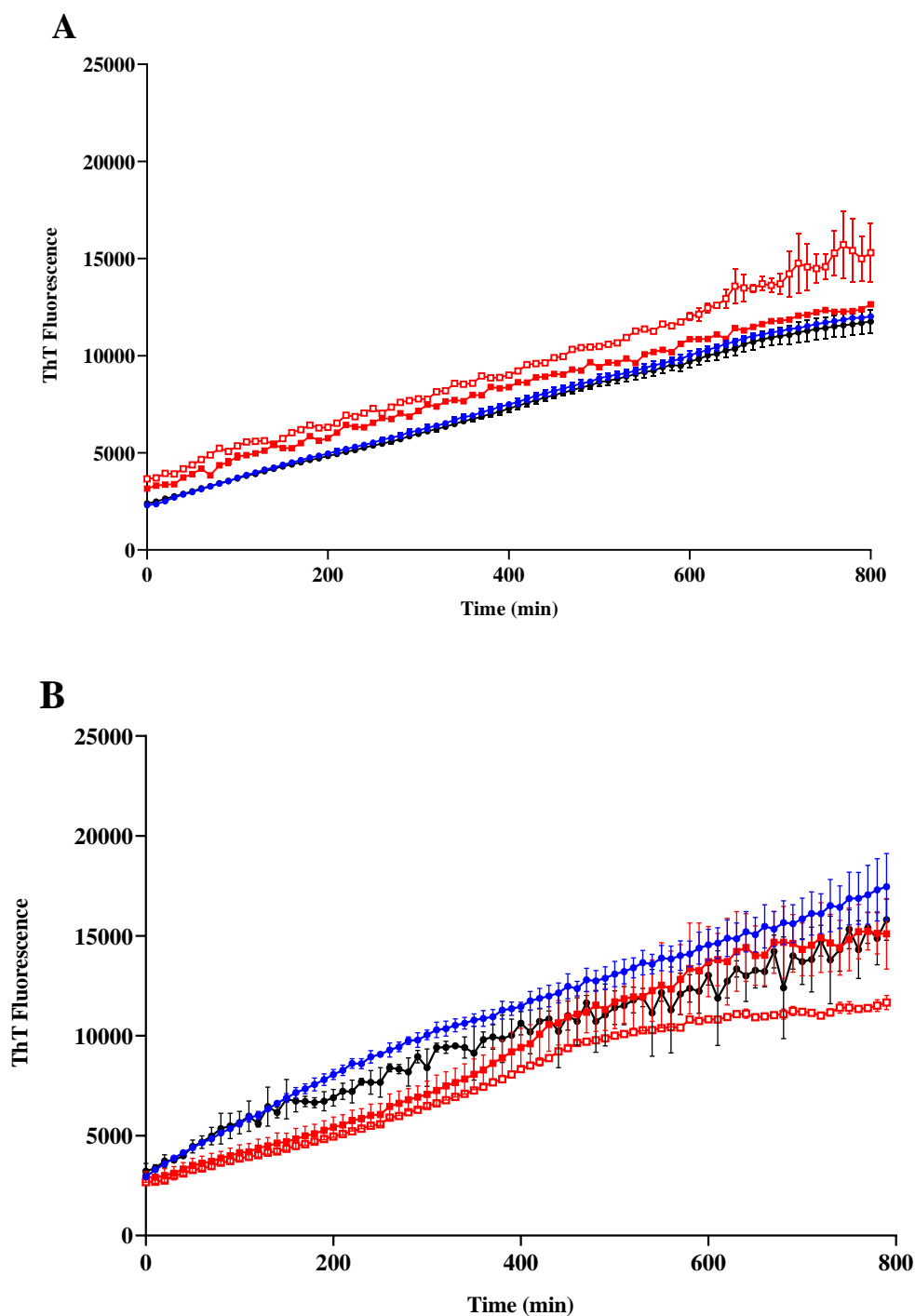


Fig. 10. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for oG37C 10 μM (blue dots), oG37C/bexarotene 20 μM (empty red squares), oG37C/LUVs (dark dots) and oG37C/LUVs/bexarotene 20 μM (filled red squares) using **A.** PCG₆₂₂-based LUVs (10 μM), or **B.** PCG₂₂₆-based LUVs (10 μM). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

Using the ThT fluorescence assay, in 800 min of incubation time, it appears that oG37C shows a characteristic linear aggregation kinetics (Fig. 10). This is coherent with that previously described by Bobo *et al.* (2017). In their study, they showed that in oxidative conditions the oG37C did not form ThT-binding species but in the presence of DTT, it took 960 min to observe the beginning of the appearance of a sigmoid curve characteristic of amyloid aggregation (Bobo *et al.*, 2017). In our study, considering the lower concentration of oG37C (10 μM vs 30 μM) and the lower temperature (25°C vs 30°C) that we use, it is therefore expected a slower kinetics, that allows us to focus on the early interactions between oligomer molecules.

oG37C aggregation appears only slightly influenced by the presence of bexarotene at 20 μM , and according to the experiments, it is accompanied either by a slight increase (Fig. 10.A) or a slight decrease (Fig. 10.B) of ThT fluorescence. To obtain more details about these interactions, and clarify the influence of bexarotene on the organization of oG37C, conformation studies were performed. ATR-FTIR spectroscopy may be used to analyze the secondary structure of peptides and proteins, in particular by analyzing the amide band I (1700-1600 cm^{-1}) corresponding to the C=O vibration (elongation) of the peptide bond (Sarroukh *et al.*, 2013). By applying a spectral fit, it is possible to quantify the sub-bands contributing to the signal of the amide band I (Arrondo *et al.*, 1993; Goormaghtigh *et al.*, 2006; Severcan *et al.*, 2004). Relative abundance of α /random, β and anti-parallel β -sheet secondary structures allow to get insight the peptide organization. Such data appears one of the three parameters linked to the oligomer membrane toxicity such as solvent-exposed hydrophobicity and size of the oligomer (Vivoli Vega *et al.*, 2019).

Table 2. Relative abundance of each secondary structure after deconvolution of ATR-FTIR amide I band monitored after incubation at 25°C overnight of oG37C (50 μM) alone, or mixed with bexarotene (100 μM).

	Center (cm^{-1})	Assignment	oG37C	oG37C + BX	oG37C + PCG ₂₂₆	oG37C + PCG ₂₂₆ + BX
Relative	1628	β -sheet	45.8	67.9	33.6	47.4
abundance	1679	anti// β	9.3	0.0	8.8	6.4
(%)	1652	α / random	44.9	32.1	57.6	46.3

In order to have a good signal/noise ratio, we incubated the peptide at 50 μM , by keeping the oG37C:bexarotene molar ratio of 1:2 unchanged. On the collected data, it appears that the peptide has a structure containing a high proportion of α /random contribution because of its slow kinetics in our conditions. There is also a signal indicating the formation anti-parallel β -sheets characteristic of the aggregation of the oG37C (Bonhommeau et al., 2017; Vignaud et al., 2013). According to the signal fit (see *supporting information*), a relative increase in β -sheet conformation is quantified in presence of bexarotene vs oG37C alone: + 13 % of total β -sheet (Table 2). This result objectifies a direct influence of bexarotene on the oligomer conformation. By circular dichroism studies, Huy *et al.* (2017) previously showed a reduction of the β -sheet content of A β monomers at high bexarotene concentration (bexarotene:A β ratio of 10:1). This result is in contradiction with ThT fluorescence monitoring results that did not show any significant modification of the fluorescence signal linked to the β -sheet formation. However, it can be explained by the formation of species adopting a global conformation limiting the interaction with ThT as described by Bobo *et al.* (2017) for oG37C in oxidative conditions (Bobo et al., 2017).

When PCG₆₂₂- or PCG₂₂₆-based LUVs are added in the interactome, no significant modification in the ThT fluorescence is observed in comparison with the other tested conditions (Fig. 10). We have been interested in studying interactions with the PCG₂₂₆ model, knowing that oG37C preferentially interacts with DOPG through OH bonds (Bobo et al., 2017; Henry et al., 2015). In the presence of PCG₂₂₆-based LUVs, there is an increase in the α -helix structuring, considered to be a specific hallmark of the interaction of the A β peptide with the membranes (Poojari et al., 2013; Terzi et al., 1997). In presence of PCG₂₂₆-based LUVs and bexarotene, there is a decrease of the α -helix conformation (-11.3 %) and an increase of the β -sheet conformation (+13.8 %) in comparison to PCG₂₂₆-based LUVs alone. This α -helix diminution is comparable to the effect of bexarotene on oG37C alone (-12.8 %) which may suggest that the oG37C/bexarotene interaction is dominant in presence of PCG₂₂₆-based LUVs.

We then performed leakage assays to determine the associated peptide toxicity. Whereas bexarotene alone does not induce any release of CF, the results shown Fig. 3 indicate a significant increased toxicity of oG37C in the presence of bexarotene. In these conditions, LUVs are destroyed and reorganized as confirmed by DLS measurements (Table 3). It is noted that there is about 15% of remaining LUVs in both cases but in the presence of bexarotene, the diameter of the LUVs greatly increases (214.5 nm vs 159.4 nm), and samples are heterodisperse. This could be due to the formation of differently structured species upon a detergent effect of combined bexarotene and oG37C, that cause a greater disorganization of the liposomes.

Table 3. Granulometric measurements of LUVs made of PCG₂₂₆ (10 μ M), expressed in terms of diameter by volume (nm), peak percentage of each population and PDI, determined immediately after formulation, or after incubation at 25°C for 24h, alone, or in presence of bexarotene (20 μ M) or/and oG37C (10 μ M).

Interactome	Ø 1 (nm)	%	Ø 2 (nm)	%	Ø 3 (nm)	%	PdI
PCG ₂₂₆ , t ₀	140.3 ± 1.3	100 ± 0.0					0.052 ± 0.013
PCG ₂₂₆ , t ₂₄	148.9 ± 1.7	100 ± 0.0					0.047 ± 0.011
PCG ₂₂₆ , t ₂₄ + BX	153.4 ± 7.2	81.9 ± 10.3	3732.7 ± 2589.8	18.1 ± 10.3			0.331 ± 0.125
PCG ₂₂₆ , t ₂₄ + oG37C	159.4 ± 13.7	14.8 ± 2.2	1102.3 ± 30.7	75.0 ± 6.2	5058.3 ± 248.6	10.2 ± 4.0	0.600 ± 0.151
PCG ₂₂₆ , t ₂₄ + oG37C + BX	214.5 ± 2.2	15.9 ± 2.0	1237.3 ± 89.8	73.6 ± 2.5	5079.7 ± 204.5	10.5 ± 0.5	0.790 ± 0.052

3.1.4. Bexarotene results discussion

The bexarotene/LUVs interactions study showed that there are probably weak interactions that are not accompanied by significant destabilization of the LUVs membranes. This was objectified by the non-modification of the UV-visible signal for the partition coefficient determination, by small modifications of DPH / TMA-DPH anisotropy and by a lack of CF leakage for our liposomal model of interest in the presence of bexarotene. These results are consistent with the literature since it was shown too that bexarotene is able to insert into membranes without destabilizing them (Kamp et al., 2018). When incubated in presence of A β ₁₋₄₂, bexarotene causes slowing of fibrillation associated with decreased formation of ThT-binding species. Huy *et al.* (2017) and Pham *et al.* (2018) demonstrated in their studies that bexarotene was not able to reduce the proportion of fibers formed but only to act at the level of early species (Huy et al., 2017; Pham et al., 2018). The obtained results are in agreement with these studies for the kinetics effects, because a delay of the fibrillation is observed. On the other hand, in our case, there is a decrease in the formation of aggregated species. We found that the addition of liposomes in this system could modify the observed effects and that the variations could depend on the ratio and the composition of the liposomes but also on the peptide/bexarotene ratio. The differences observed with the literature studies may therefore depend on the presence of some factors in the experiments conducted. When bexarotene was tested on our oligomer model, the ThT fluorescence experiments did not show any significant differences in absence and presence of liposomes.

It may therefore suggest that bexarotene would not affect the β -sheet structure of oG37c. However, ATR-FTIR experiments correlated with LLA and DLS experiments showed a different organization of the peptide in the presence of bexarotene resulting in a detergent effect towards the PCG₂₂₆-based LUVs. It is essential to keep in mind that we are on a mutant model and that the data are not correlated in absolute terms. Moreover, it turns out that Fantini *et al.* 2014 have shown that nanomolar concentrations of bexarotene efficiently prevented the cholesterol-dependent increase of calcium fluxes induced by β -amyloid peptides in SH-SY5Y cells (Fantini *et al.*, 2014). These experiments nevertheless demonstrate once again that bexarotene is able to interact with early species of the peptide aggregation process.

It is possible that by acting on the early species (nuclei, oligomers) the bexarotene leads to the formation of different species *via* different aggregation pathways as demonstrated by the example of the oG37C being characterized by a higher β -sheet structuration and thus by an increased toxicity in presence of bexarotene. The balance between the different aggregation pathways could be decisive for the ability of bexarotene to reduce the formation of certain species compared to others, all these processes being influenced by external parameters such as the presence of membranes. So far, in the literature, the most studied approach remains the enhancement of A β clearance by apoE activation by bexarotene (Cramer *et al.*, 2012; Tousi, 2015). But different results are found, for example with Ghosal *et al.* (2016) who conducted a phase Ib proof of mechanism trial which showed that bexarotene increase CSF apoE levels but had no effect on metabolism (Ghosal *et al.*, 2016). In a screening approach, using QSAR studies it would be possible to highlight the structural aspects related to certain effects of small molecules on the aggregation of the peptide as for bexarotene and its similarity with cholesterol (Fantini *et al.*, 2014). This wide variability of the effects demonstrates that it would be difficult to use bexarotene for therapeutic purposes directly as a modulator of peptide aggregation unless all the factors that can affect its effects are fully known.

3.2 Adapalene

Adapalene is a retinoid, a compound derived from vitamin A, used as a local anti-acne drug but also has anti-inflammatory properties (Broden and Goa, 1997). Adapalene has been included in various clinical tests, mainly related to skin diseases. In the framework of the study proposed by Habchi, *et al.*, 2017, this molecule was tested against the aggregation of the A β ₁₋₄₂ peptide and was identified as being able to inhibit the phases of nucleation and elongation of the fibrillation of the peptide. This compound was selected because of its structural similarity to bexarotene, and their common function as RAR agonists (Habchi *et al.*, 2017).

3.2.1. Characterization of the adapalene-LUVs interactions

The partition coefficient of adapalene was found to be equal to 3.66 on SPC-based LUVs, and 3.62 on those made of PCG₆₂₂ (Table 1). This value is consistent with the calculated log $D_{7.4}$ of 3.29, predicted using Chemicalize website (<https://chemicalize.com>). Thus, adapalene is a lipophilic drug, able to interact with liposomes membranes independently of their composition. However, it should also be noted that adapalene has limited absorption potential across the human skin (Piskin and Uzunali, 2007). During the study of the interactions between adapalene and liposomes, no interactions have been formally objectified using FPA (data not shown) and LLA (Fig. 3) approaches. It was therefore not possible to determine whether there is a change in membrane fluidity due to adapalene interaction with LUVs.

3.2.2. Characterization of the adapalene- $A\beta_{1-42}$ interactions

3.2.2.1 Inhibition of $A\beta_{1-42}$ aggregation (commercial kit assay) by adapalene

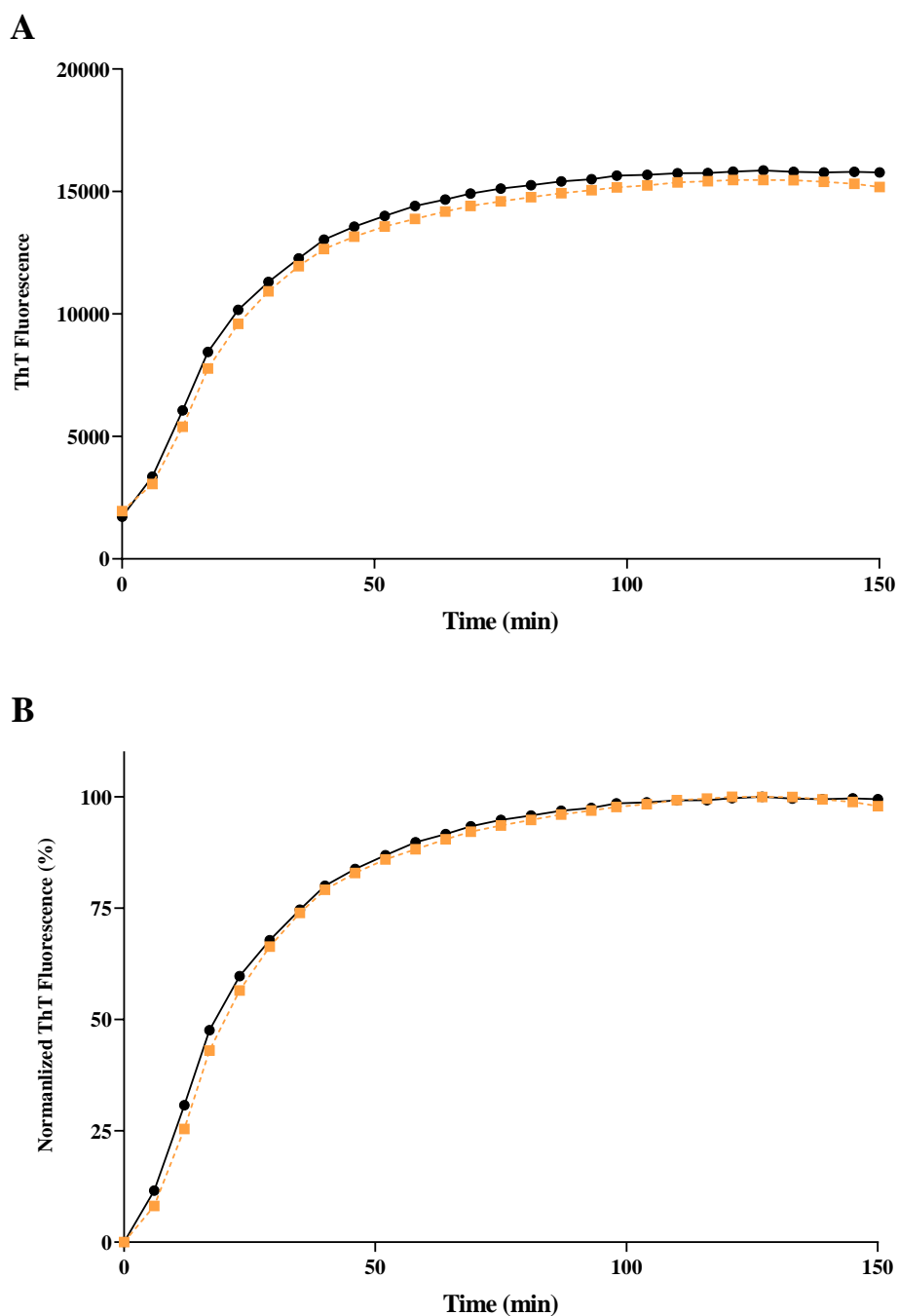


Fig. 11. Evolution of the ThT fluorescence (20 μM) in presence of $\text{A}\beta_{1-42}$ alone (46.5 μM , dark dots) or in presence of adapalene (20 μM , orange squares): **A.** raw data, **B.** data normalized to the average of steady-state fluorescence intensity values detected for $\text{A}\beta_{1-42}$ alone. The error bars represent the standard deviation of 3 samples. No interaction between adapalene (20 μM) and the peptide (46.5 μM) were detected using the commercial assay (Fig. 11).

3.2.2.2. Modulation of $A\beta_{1-42}$ peptide aggregation by adapalene

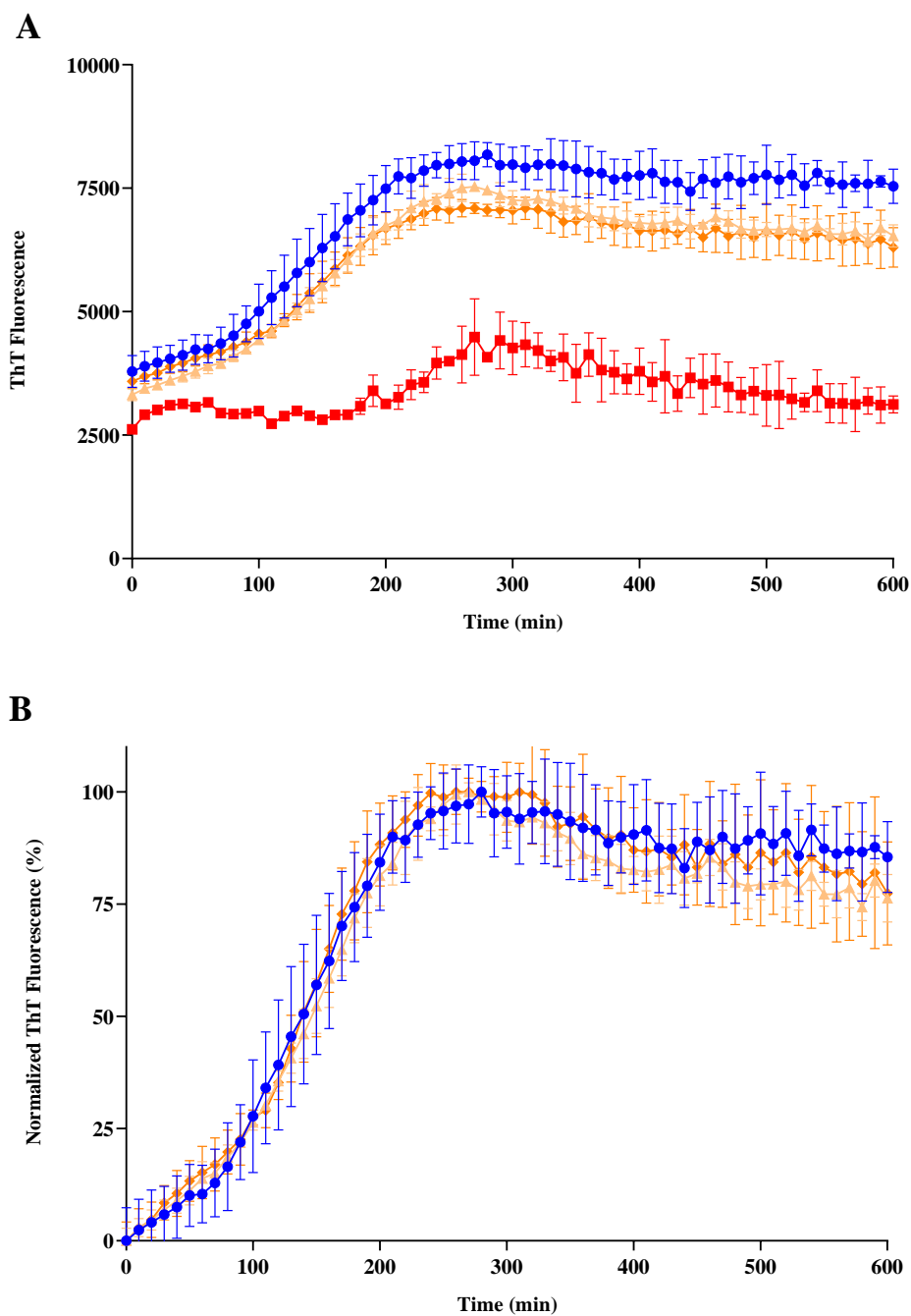


Fig. 12. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for $A\beta_{1-42}$ alone (10 μM , blue dots), $A\beta_{1-42}$ /adapalene 0.2 μM (beige triangles), 2 μM (orange diamonds), or 20 μM (red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

In presence of 0.2 and 2 μM of adapalene, a slight variation of the ThT fluorescence signal is observed, insufficient to conclude to a significant modification of the aggregation of the peptide in presence of the molecule. At the highest adapalene concentration tested (20 μM), a strong inhibition of the $\text{A}\beta_{1-42}$ peptide aggregation is observed (Fig. 12). Habchi *et al.* (2017) reported that adapalene was able to inhibit primary, secondary nucleation and elongation. So, almost all species formed during aggregation could potentially be targeted by this molecule (Habchi *et al.*, 2017). In contrast to bexarotene, the decrease in ThT fluorescence intensity occurs over the totality of the aggregation kinetics (Fig. 12). That means that in addition to nucleation, elongation and therefore fibrillation may also be inhibited in accordance with the results of Habchi *et al.* (2017).

3.2.3. Characterization of the adapalene-oG37C interactions

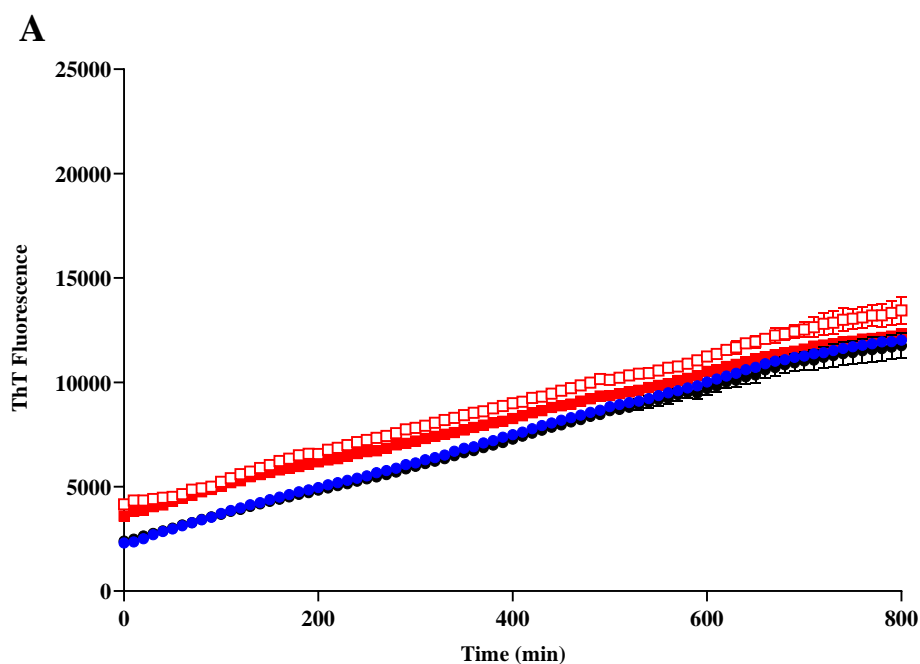


Fig. 13. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for oG37C 10 μM (blue dots), oG37C/adapalene 20 μM (empty red squares), oG37C/ PCG₆₂₂-based LUVs 10 μM (dark dots) and oG37C/ PCG₆₂₂-based LUVs 10 μM /adapalene 20 μM (filled red squares). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

oG37C aggregation appears to be not significantly influenced by the presence of adapalene at 20 μM (Fig. 13). However, from the bexarotene example, it is obvious that no modification of the ThT fluorescence signal does not necessarily mean that there is no modification of the species formed during aggregation.

However, considering the practically insoluble character of adapalene in water (solubility about 2 nM according to reported predicted values (Tetko et al., 2001), it appeared to us difficult to pursue its deep evaluation, and discussion of the obtained results. Indeed, precipitation of adapalene occurred in course of experiments, leading to variable results in LLA (Fig. 3) and the appearance of undesirable signals due to the presence of precipitates FTIR, or DLS measurements (data not shown).

3.1.4. Adapalene results discussion

Despite the problems related to the solubilization of the molecule, we were able to obtain some results in agreement with those obtained by Habchi *et al.* (2017). It appears that adapalene is able to interfere with the different stages of the A β ₁₋₄₂ peptide aggregation process (Habchi et al., 2017). However, we did not go further in the study because we faced an important problem in the process of drug discovery: the solubility of the tested compounds. In our case, this problem could have gone unnoticed because the precipitates formed were invisible to the naked eye but could be detected by DLS analysis (data not shown). The lack of possibility to completely characterize adapalene in solution, and also further the requirement of an efficient formulation strategy development render this molecule difficult to valorize for a clinical development for treatment of AD.

3.3 Chicago Sky Blue 6B

Chicago Sky Blue 6B (CSB) is a counterstain mostly used in immunofluorescence histochemistry for several diagnosis (Afshar et al., 2018; Baddireddy and Poojary, 2019; Lim and Lim, 2008). It is also structurally related to glutamate, which makes it a competitive inhibitor of vesicular glutamate uptake (Beirith et al., 2002; He et al., 2013). Necula *et al.* (2007) described CSB as a compound only able to inhibit fibrillation of A β peptide (Necula et al., 2007). After a screening of 1,200 approved drugs, CSB was identified by Risse *et al.* (2015) as the first small molecule capable of inhibiting A β binding to Prion Protein (PrP) which may act as a receptor for synaptotoxic oligomeric forms of A β (Risse et al., 2015).

3.3.1. Characterization of the chicao sky blue 6B-LUVs interactions

3.3.1.1. Determination of chicao sky blue partition coefficient

In presence of SPC or PCG₆₂₂-based LUVs, no significant spectral shift was observed when the lipid concentration increased. Thus, no K_p could be determined for CSB. However, it is predictable as a highly polar compound, with a predicted $\log D_{7.4}$ value of -5.14 (Table 1).

3.3.1.2. Assessment of chicao sky blue 6B-membrane interactions by fluorescence anisotropy measurement

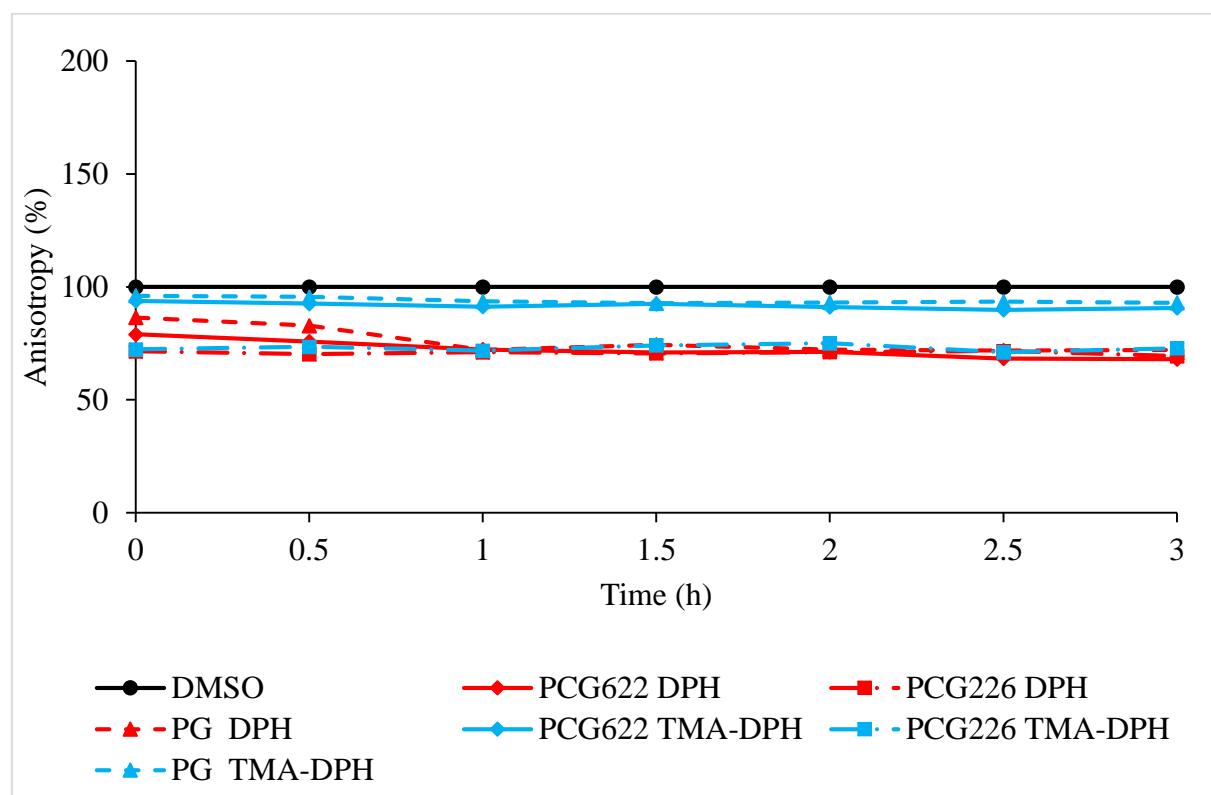


Fig. 14. Steady-state anisotropy of DPH and TMA-DPH as a function of time in each LUV model in absence (only DMSO used as control), and in presence of CSB (10 μ M).

In presence of CSB, a slight decrease of TMA-DPH anisotropy is observed for every studied LUVs models whereas a slight decrease of DPH anisotropy is shown only with PCG₂₂₆-based LUVs (Fig. 14). These results indicate that CSB interacts with the acyl chains of the lipids regardless of the LUV composition. This interaction is characterized by a slight fluidization in the acyl chain region for each LUVs models and also a fluidization in the polar head region of the PCG₂₂₆-based LUVs.

However, knowing the quenching fluorescence properties of CSB, it should not be excluded the possibility that these results may be due to artifacts between chicao sky blue and TMA-DPH.

3.3.1.3. Assessment of chicao sky blue 6B-membrane interactions by liposome leakage assay

In presence of CSB, no significant membrane disruptive effect was observed on PCG₂₂₆-based LUVs. From DLS measurements performed on these samples at the end of experiments, it appears that all the LUVs remained intact after incubation with the molecule for 24 h (Table 5). From results of these different studies, it seems that no or only very weak interactions between CSB and model membranes exist.

3.3.2. Characterization of the chicao sky blue 6B-A β ₁₋₄₂ interactions

3.3.2.1 Inhibition of A β ₁₋₄₂ aggregation (commercial kit assay) by CSB

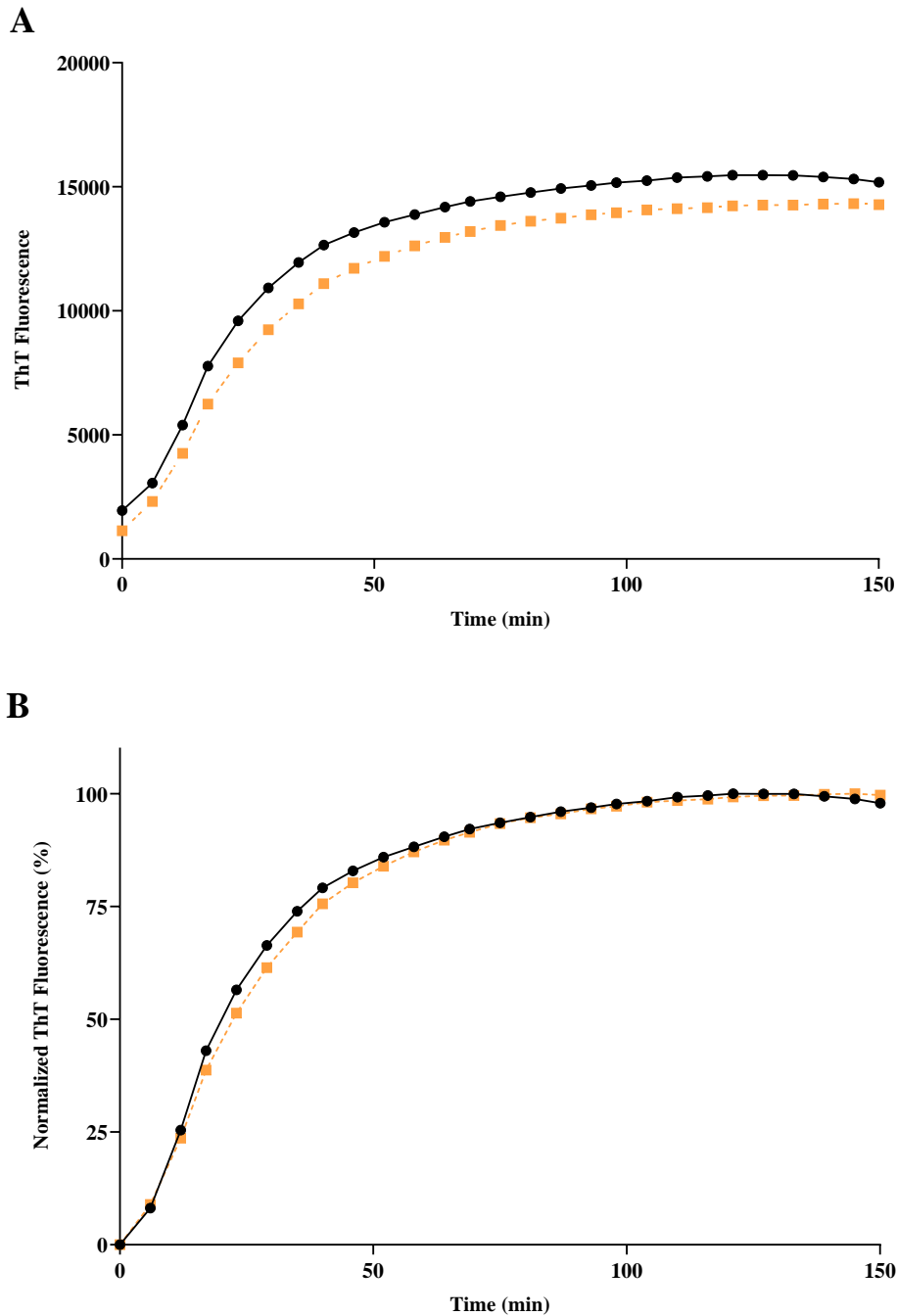


Fig. 15. Evolution of the ThT fluorescence (20 μM) in presence of Aβ₁₋₄₂ alone (46.5 μM, dark dots) or in presence of CSB (10 μM, orange squares): **A.** raw data, **B.** data normalized to the average of steady-state fluorescence intensity values detected for Aβ₁₋₄₂ alone. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

No significant interaction between CSB (10 μM) and Aβ₁₋₄₂ (46.5 μM) were detected using the commercial assay (Fig. 15). The slight decrease in fluorescence intensity should be due to fluorescence quenching since it is observed from the beginning to the end of the kinetics.

3.3.2.2. Modulation of $A\beta_{1-42}$ peptide aggregation by chicago sky blue

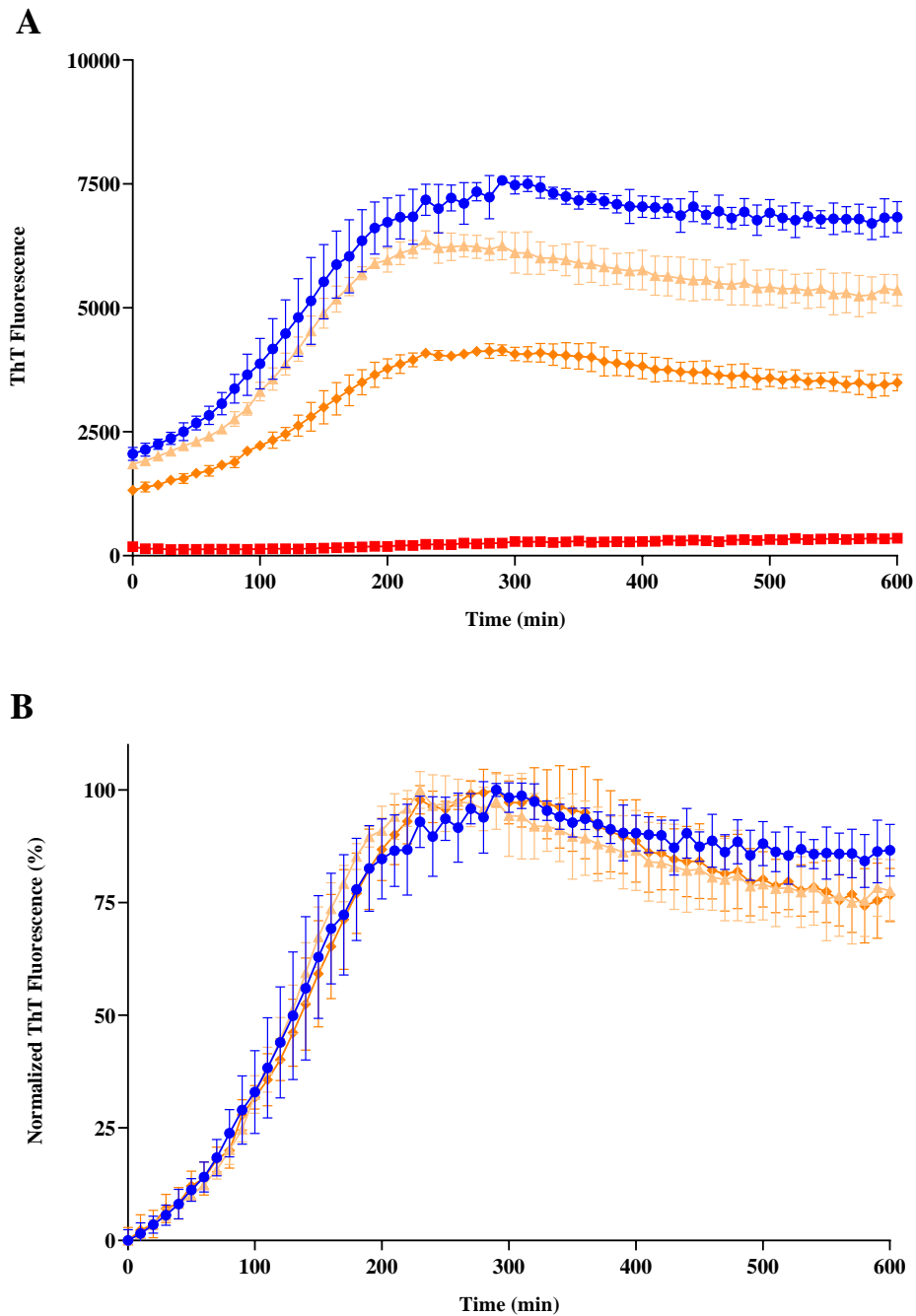


Fig. 16. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for $A\beta_{1-42}$ alone (10 μ M, blue dots), $A\beta_{1-42}$ /CSB 0.1 μ M (beige triangles), 1 μ M (orange diamonds), or 10 μ M (red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

In presence of CSB, a concentration-dependent decrease of the ThT fluorescence signal is observed, and even a total quenching of the ThT fluorescence is shown at the highest tested concentration (10 μ M) (Fig. 16). This is coherent with the conclusions of Necula *et al.* (2007) who also reported the ability of CSB to inhibit A β ₁₋₄₂ fibrillation.

3.3.2.3. Modulation of $A\beta_{1-42}$ peptide aggregation by chicao sky blue in presence of LUVs

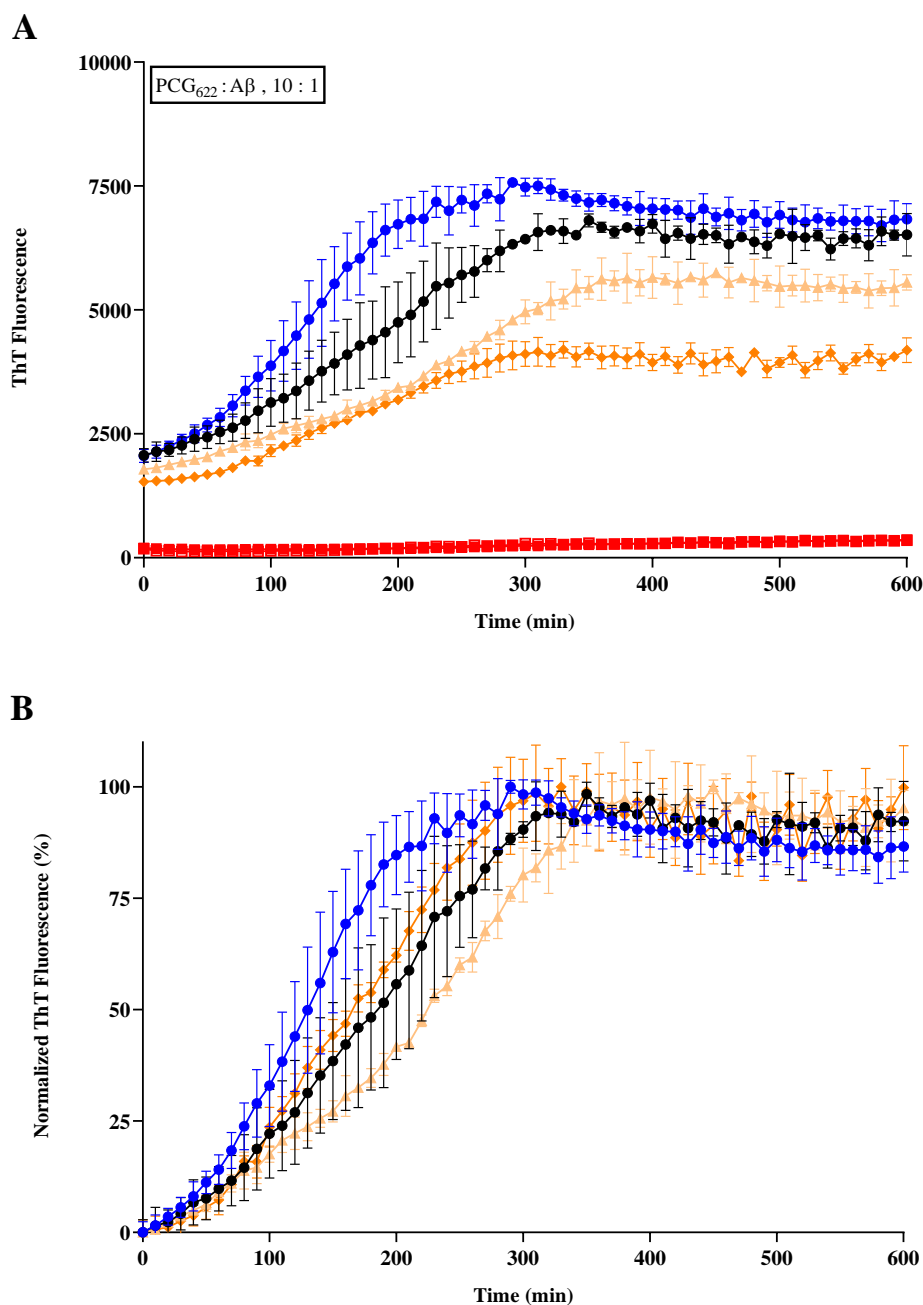


Fig. 17. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for $A\beta_{1-42}$ alone 10 μ M (blue dots), $A\beta_{1-42}$ /CSB 10 μ M (empty red squares), $A\beta_{1-42}$ /PCG₆₂₂-based LUVs 100 μ M (dark dots), $A\beta_{1-42}$ /PCG₆₂₂-based LUVs and CSB 0.1 μ M (beige triangles), 1 μ M (orange diamonds), or 10 μ M (filled red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

In presence of PCG₆₂₂-based LUVs at 100 μ M, the same concentration-dependent decrease of the ThT signal is observed. At a lipids:CSB: A β molar ratio of 10:1:1, there is a nearly total extinction of the ThT fluorescence. In our conditions, the presence of liposomes does not appear to affect the effect of the molecule on A β ₁₋₄₂ aggregation.

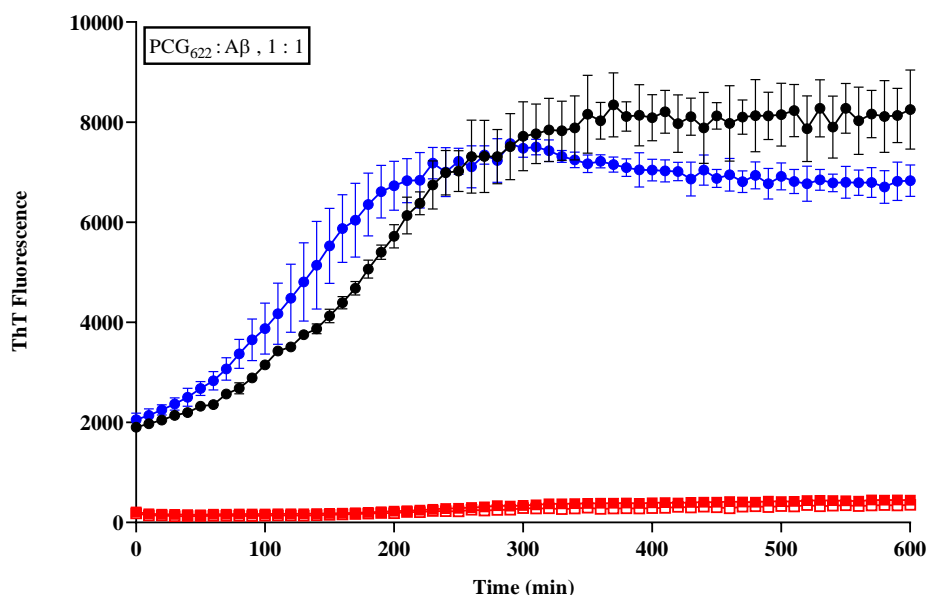


Fig. 18. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for A β ₁₋₄₂ alone 10 μ M (blue dots), A β ₁₋₄₂/CSB 10 μ M (empty red squares), A β ₁₋₄₂/PCG₆₂₂-based LUVs 10 μ M (dark dots) and A β ₁₋₄₂/PCG₆₂₂-based LUVs/CSB 10 μ M (filled red squares). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

At a lipids:CSB:A β molar ratio of 1:1:1, the same effect remains, meaning that the lipids:A β ratios tested doesn't have any detectable consequence on the effects of CSB on A β ₁₋₄₂ (Fig. 18).

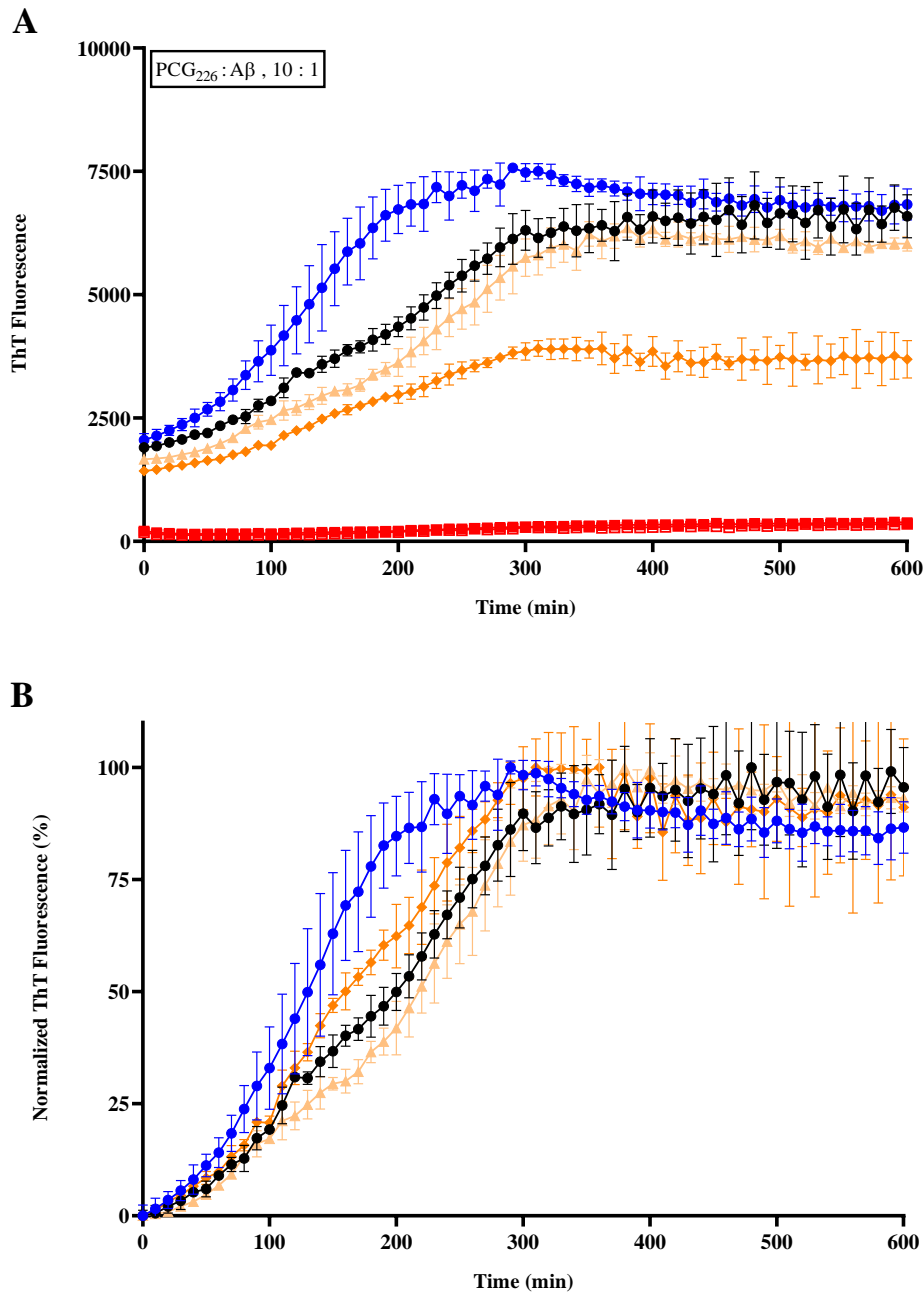


Fig. 19. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for A β ₁₋₄₂ alone 10 μ M (blue dots), for A β ₁₋₄₂/chicago sky blue 6B 10 μ M (empty red squares), A β ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs 100 μ M (dark dots), A β ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs/chicago sky blue 6B 0.1 μ M (beige triangles), 1 μ M (orange diamonds), or 10 μ M (filled red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

In presence of 100 μM PCG₂₂₆-based LUVs, a concentration-dependent decrease of the ThT signal is also observed meaning that there is no impact of the LUV composition on the CSB effect (Fig. 19). Using PCG₂₂₆-based LUVs at lipids:CSB:A β molar ratio of 1:1:1, the same signal decrease is still present (Fig. 20).

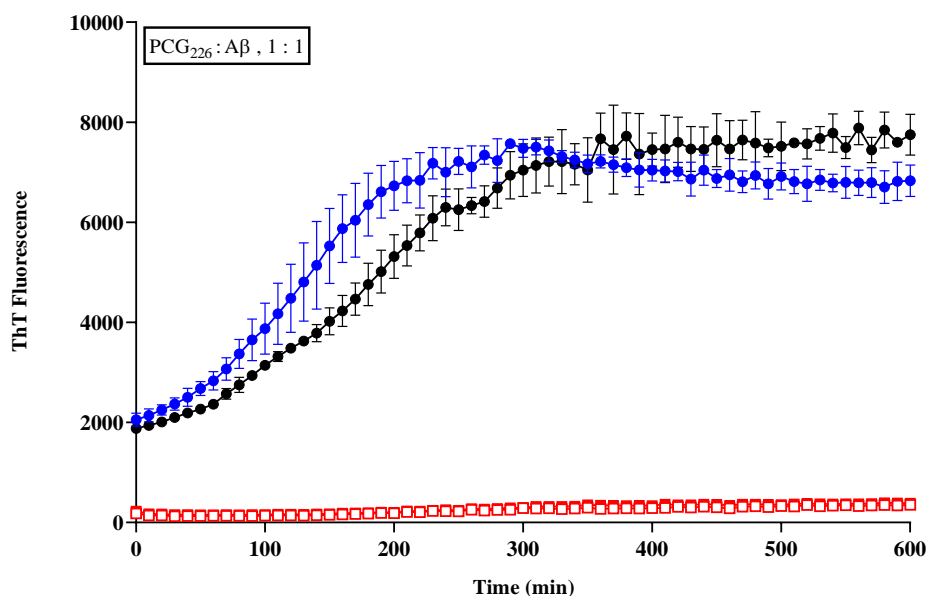


Fig. 20. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for A β ₁₋₄₂ alone 10 μM (blue dots), A β ₁₋₄₂/chicago sky blue 6B 10 μM (empty red squares), A β ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs 10 μM (dark dots) and A β ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs/chicago sky blue 6B 10 μM (filled red squares). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

From all data, it appears that in absence or in presence of LUVs, whatever the lipid composition and the lipids:CSB:A β molar ratio, CSB would be able to totally inhibit A β ₁₋₄₂ fibrillation.

3.3.3. Characterization of the chicago sky blue-oG37C interactions

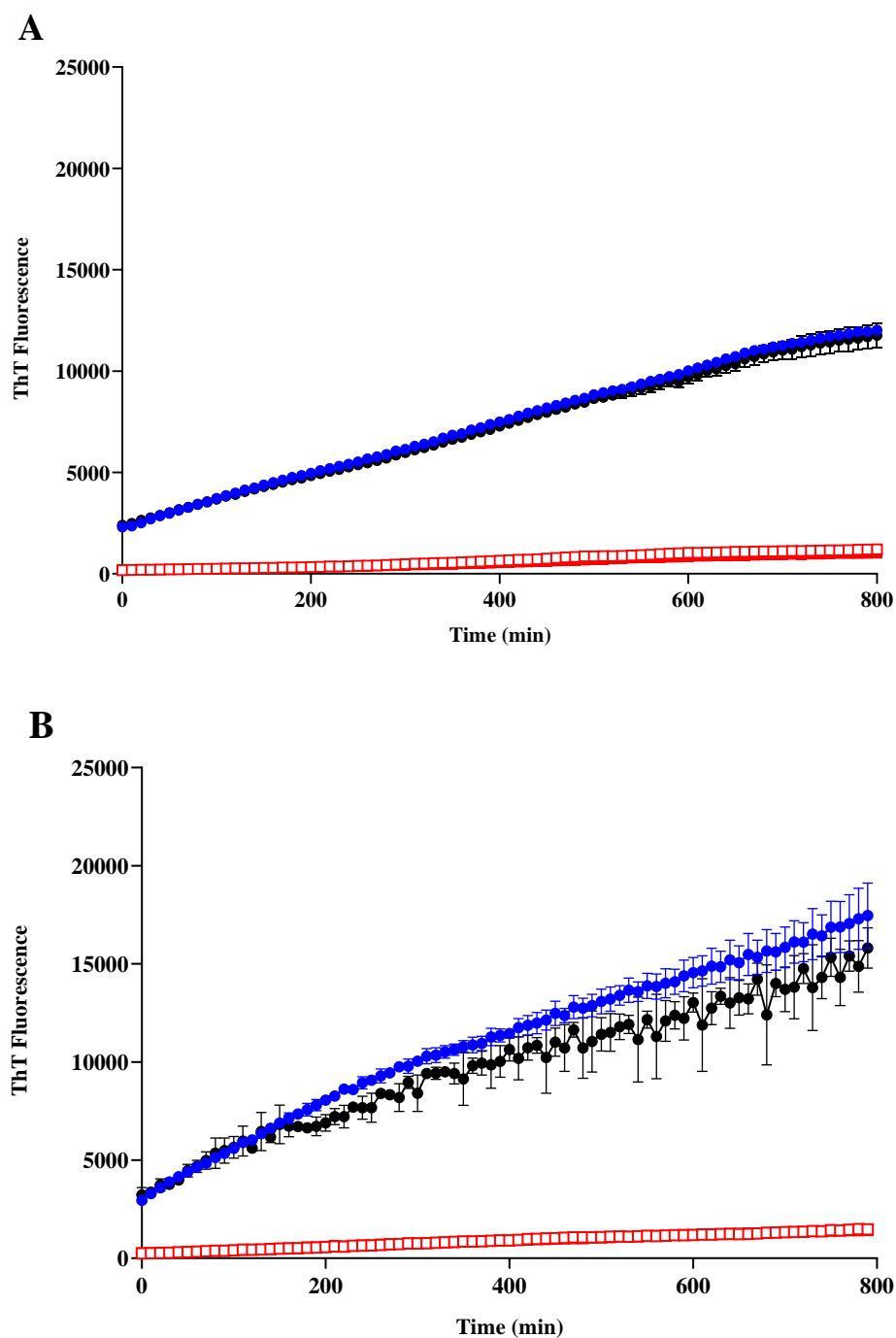


Fig. 21. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for oG37C 10 μM (blue dots), oG37C/chicago sky blue 6B 10 μM (empty red squares), oG37C/LUVs (dark dots) and oG37C/LUVs/chicago sky blue 6B 10 μM (filled red squares) using **A.** PCG₆₂₂-based LUVs (10 μM) or **B.** PCG₂₂₆-based LUVs (10 μM). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

The set of data collected using oG37C, CSB, and liposomes shows a total decrease of the oligomer aggregation regardless of the conditions tested. Thus, from all the results obtained by monitoring the ThT kinetics fluorescence, CSB appears to be very efficient to interact with toxic oligomers, and finally to totally inhibit the fibrillation in a concentration dependent manner, the most effective concentration being 10 μ M. The presence of liposomes appears not to modify these interactions.

Nevertheless, we have to keep in mind that this effect could be a false positive, since CSB is able to quench fluorescence. Such interference may be detrimental for the analysis of the results, as it was already observed in other studies for CSB, e.g. interference of CSB with A11 antibody binding in the primary screening operation in ELISA assays (Necula et al., 2007). In our experiments, we noticed a decrease in the fluorescence background of ThT at 10 μ M CSB. Moreover, if CSB is added at the end of the kinetics of ThT fluorescence monitored for oG37C, a fluorescence quenching is also observed. At this stage, it is impossible to discriminate this quenching from the ability of CSB to directly interact with the peptide leading to aggregation inhibition.

Table 4. Relative abundance of each secondary structure after deconvolution of ATR-FTIR amide I band monitored after incubation at 25°C overnight of oG37C (50 μ M) alone, or mixed with chicago sky blue 6B (50 μ M).

	Center (cm^{-1})	Assignment	oG37C	oG37C + CSB	oG37C + PCG ₂₂₆	oG37C + PCG ₂₂₆ + CSB
Relative	1628	β -sheet	45.8	34.1	33.6	50.7
abundance	1679	anti// β	9.3	17.7	8.8	0.0
(%)	1652	α / random	44.9	48.2	57.6	49.3

Experiments conducted with ATR-FTIR show that, contrary to what the ThT kinetic results might suggest, there is no drastic disappearance of the β -sheet conformation either for oG37C alone or in the presence of PCG₂₂₆-based LUVs. Nevertheless, there is an effect of CSB on the conformation of the peptide (Table 4). Indeed, in presence of CSB, although oG37C alone doesn't show a significant variation in its overall conformation in β -sheets (51.8 % with CSB vs 55.1 % without), a conformational change is shown with a transition to the anti-parallel β -sheets conformation.

In presence of both CSB and PCG₂₂₆-based LUVs, the opposite effect is detected, with a total disappearance of the signal attributed to the anti-parallel β -sheets.

Although from ThT experiments, it was impossible to discriminate a ThT fluorescence quenching in presence of CSB from the formation of peptide species whose conformation limits the binding of ThT, thanks to the use of ATR-FTIR spectroscopy, the interactions between CSB and the peptide are confirmed by conformational changes. Moreover, these experiments highlight the disappearance of the anti-parallel β -sheets in the presence of PCG₂₂₆-based LUVs. The protective effect of CSB is shown by LLA experiments. Indeed, Fig. 3 shows no leakage of liposomes in presence of CSB with oG37C, whereas oG37C alone induces significant LUVs toxicity. It is also objectified by DLS experiments (Table 5). It appears that a higher proportion of the LUVs remains totally intact after incubation with oG37C in presence of CSB for 24 h. The combination of all these results shows that CSB, not only interacts with oG37C, but also limits its toxicity towards the membranes.

Table 5. Granulometric measurements of LUVs made of PCG₂₂₆ (10 μ M), expressed in terms of diameter by volume (nm), peak percentage of each population and PDI, determined immediately after formulation, or after incubation at 25°C for 24h, alone, or in presence of chicago sky blue 6B (10 μ M) or/and oG37C (10 μ M).

Interactome	Ø 1 (nm)	%	Ø 2 (nm)	%	Ø3 (nm)	%	PdI
PCG ₂₂₆ , t ₀	135.5 ± 1.3	100 ± 0.0					0.051 ± 0.016
PCG ₂₂₆ , t ₂₄	141.6 ± 0.8	100 ± 0.0					0.071 ± 0.008
PCG ₂₂₆ , t ₂₄ + CSB	140.6 ± 0.9	100 ± 0.0					0.086 ± 0.014
PCG ₂₂₆ , t ₂₄ + oG37C	176.8 ± 16.3	23.6 ± 3.6	1524.3 ± 237.5	73.1 ± 5.2	3205.3 ± 2782.7	3.4 ± 3.4	0.778 ± 0.024
PCG ₂₂₆ , t ₂₄ + oG37C + CSB	141.1 ± 4.3	49.1 ± 14.1	1488.7 ± 15.9	44.3 ± 25.5	1487.0 ± 2575.6	6.6 ± 11.5	0.383 ± 0.037

3.3.4. Chicago sky blue 6B results discussion

The results obtained from the study of CSB showed a systematic decrease of the ThT signal regardless of the studied peptide (A β ₁₋₄₂ or oG37C), in the absence as well as in the presence of liposomes. We also pointed out that interferences like the quenching of the ThT signal by CSB could challenge the deductions made from these results.

One of the advantages of the implementation of our test is the systematic application of various experiments to correlate the results and to remove the doubt about the presence of eventual artifacts like this. These experiments highlighted the protective effect of CSB on the toxicity of an oligomeric model. Previously, Necula *et al.* (2007) described CSB as a compound only able to inhibit fibrillation of A β peptide but not oligomerization (Necula *et al.*, 2007). Our results are not contradictory because we showed that CSB can modify the structuration and the toxicity of oligomeric species already present in solution but do not allow to conclude on a possible inhibition of their formation.

All results reveal the potential of CSB as a compound of interest for the development of a therapeutic approach despite the subtleties involved in its characterization. Indeed, CSB led to a selective disappearance of the anti-parallel β -sheet only in presence of liposomes. This effect was linked to a protective action in the leakage assay. Such mechanism could be highlighted thanks to our complete procedure to study this tripartite interactome.

The highlighted protective effect of CSB on A β was already objectified by *in vitro* cellular assays (Pollack *et al.*, 1995). However, we have to keep in mind that CSB has been previously showed to inhibit the DNA recombinase Rad51, and the glutamate uptake in the synaptic vesicles (Normand, 2014; Roseth *et al.*, 2002), and with such effects, it appears impossible to further carry this drug in clinics.

3.4 Indomethacin

Indomethacin is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) used for its anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic properties (Lucas, 2016). With regard to the treatment of Alzheimer's disease, this compound has already been included in a clinical trial to evaluate its ability to slow down the progress of AD but the results were inconclusive (de Jong *et al.*, 2008). Necula *et al.* (2007) described indomethacin as a compound able to inhibit A β peptide oligomerization but not its fibrillation (Necula *et al.*, 2007). The finding that indomethacin compounds block oligomerization without inhibiting fibrillation indicates that the inhibited oligomers are not an obligatory step on the pathway leading to fiber formation (Necula *et al.*, 2007). The potency to inhibit *off*-pathway species makes this compound very attractive for the development of our assay.

3.4.1. Characterization of the indomethacin-LUVs interactions

3.4.1.1. Determination of indomethacin partition coefficient

The partition coefficient of indomethacin was found to be equal to 3.09 on SPC-based LUVs, but was not determinable on PCG₆₂₂-based LUVs (Table 1). This may be due to electrostatic interactions because indomethacin is negatively charged (-1) at neutral pH. The use of this compound reinforces the interest of liposomes in the characterization of interactions between molecules and membranes. Indeed, the predicted log $D_{7.4}$ value of 0.68 and the absence of K_p result on PCG₆₂₂ could suggest that this compound have no or only very weak interactions with the membranes. On the contrary, the SPC log K_p value demonstrates that depending on the membrane composition, indomethacin can interact with membranes. This observation is in agreement with previous other studies that provided evidence of possible interactions between indomethacin and biomimetic membranes, that would depend on physicochemical parameters like pH, lipid phase or temperature (Nunes et al., 2013, 2011b).

3.4.1.2. Assessment of indomethacin-membrane interactions by fluorescence anisotropy measurement

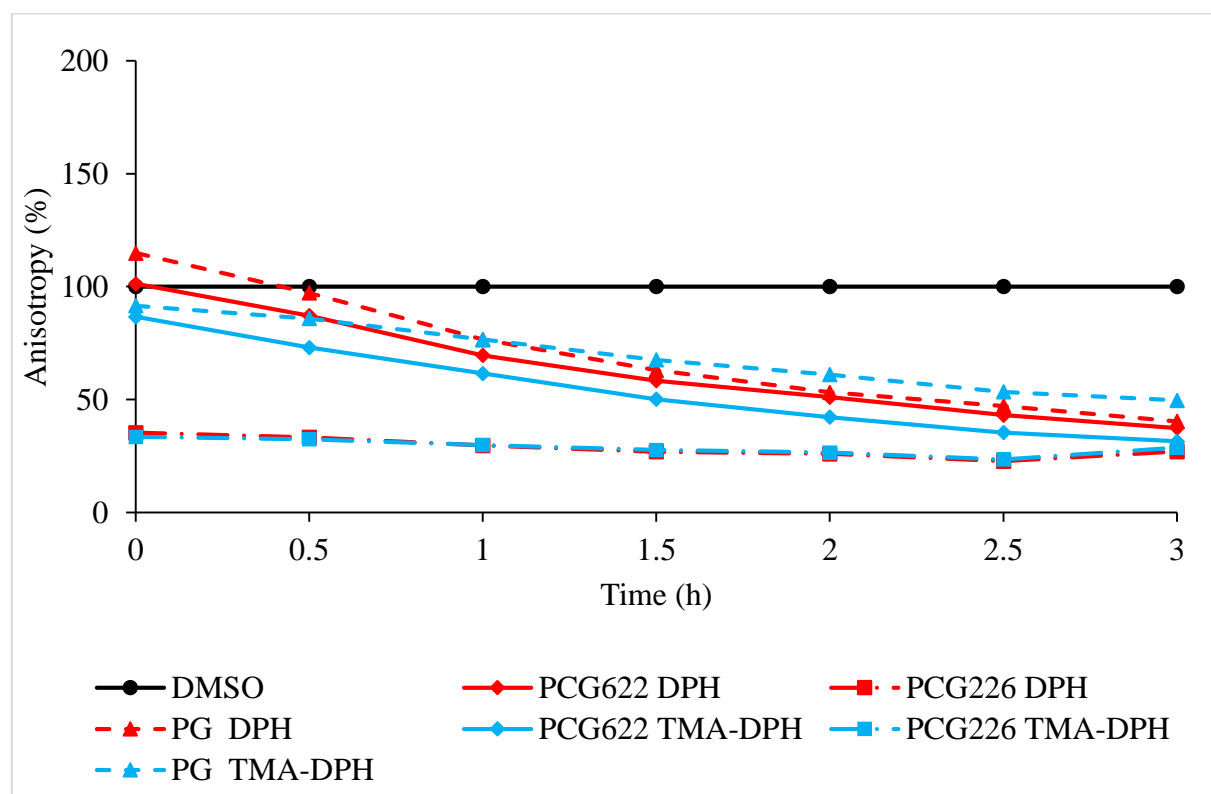


Fig. 22. Steady-state anisotropy of DPH and TMA-DPH as a function of time in each LUV model in absence (only DMSO used as control) and in presence of indomethacin (1 mM).

In presence of indomethacin, changes of DPH and TMA-DPH were observed for every types of tested LUVs (Fig. 22). When indomethacin is incubated with PCG₂₂₆-based LUVs, an immediate decrease of DPH and TMA-DPH anisotropy is observed. In presence of PG and PCG₆₂₂-based LUVs, there is a time dependent decrease of both TMA and TMA-DPH anisotropy. These results show that indomethacin can enhance the fluidity of the tested liposomes LUVs. Depending on the liposomes composition, the incorporation of indomethacin leads to interactions and membrane reorganization, that can be immediate or slow down over time. Zhou *et al.* (2010) examined the ability of indomethacin to alter membrane heterogeneity and phase behavior by fluorescence lifetime imaging, fluorescence polarization and FRET approaches. They showed that indomethacin can enhance phase separation and stabilize cholesterol-dependent nanoclusters in biological membranes (Zhou et al., 2010). Fearon and Stokes (2017) showed that indomethacin can concentrate in lipid bilayers where gel and fluid domains coexist (Fearon and Stokes, 2017). Nunes *et al.* (2011) showed that indomethacin may be located in the higher ordered regions close to the phospholipid head groups (C1-C9) at pH 7.4 (Nunes et al., 2011b). This result is coherent with the effects that we observe in our study, both on DPH and TMA-DPH probes. These data taken together highlight the fact that indomethacin may interact with membranes in different ways depending on the physicochemical parameters like the lipid phase but also on the presence of clusters linked to the presence of cholesterol.

3.4.1.3. Assessment of indomethacin-membrane interactions by liposome leakage assay

In presence of indomethacin, no significant membrane disruptive effect was observed on PCG₂₂₆-based LUVs. From DLS measurements performed on these samples at the end of experiments, it appears that all the LUVs remained intact after incubation with the molecule for 24 h (Table 6). From results of these different studies, indomethacin appears to be able to interact with the membranes of the studied liposomes, contribute to a reorganization of the phospholipid bilayer, without resulting in an associated toxicity.

3.4.2. Characterization of the indomethacin-A β ₁₋₄₂ interactions

3.4.2.1 Inhibition of A β ₁₋₄₂ aggregation (commercial kit assay) by indomethacin

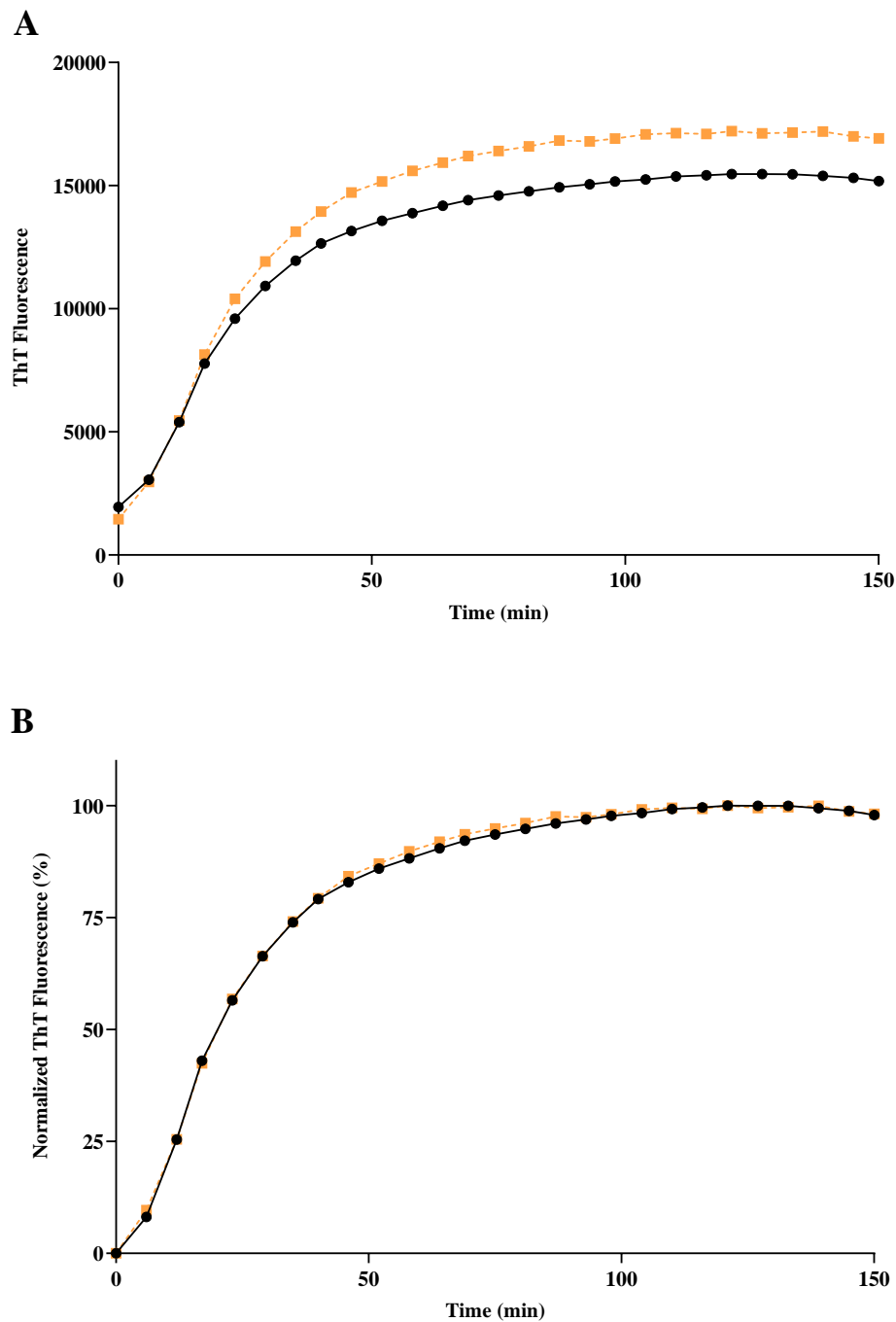


Fig. 23. Evolution of the ThT fluorescence (20 μM) in presence of $\text{A}\beta_{1-42}$ alone (46.5 μM , dark dots) or in presence of indomethacin (1 mM, orange squares): **A.** raw data, **B.** data normalized to the average of steady-state fluorescence intensity values detected for $\text{A}\beta_{1-42}$ alone. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

No interaction between indomethacin (1 mM) and $\text{A}\beta_{1-42}$ (46.5 μM) were detected using the commercial assay (Fig. 23).

3.4.2.2. Modulation of A β ₁₋₄₂ peptide aggregation by indomethacin

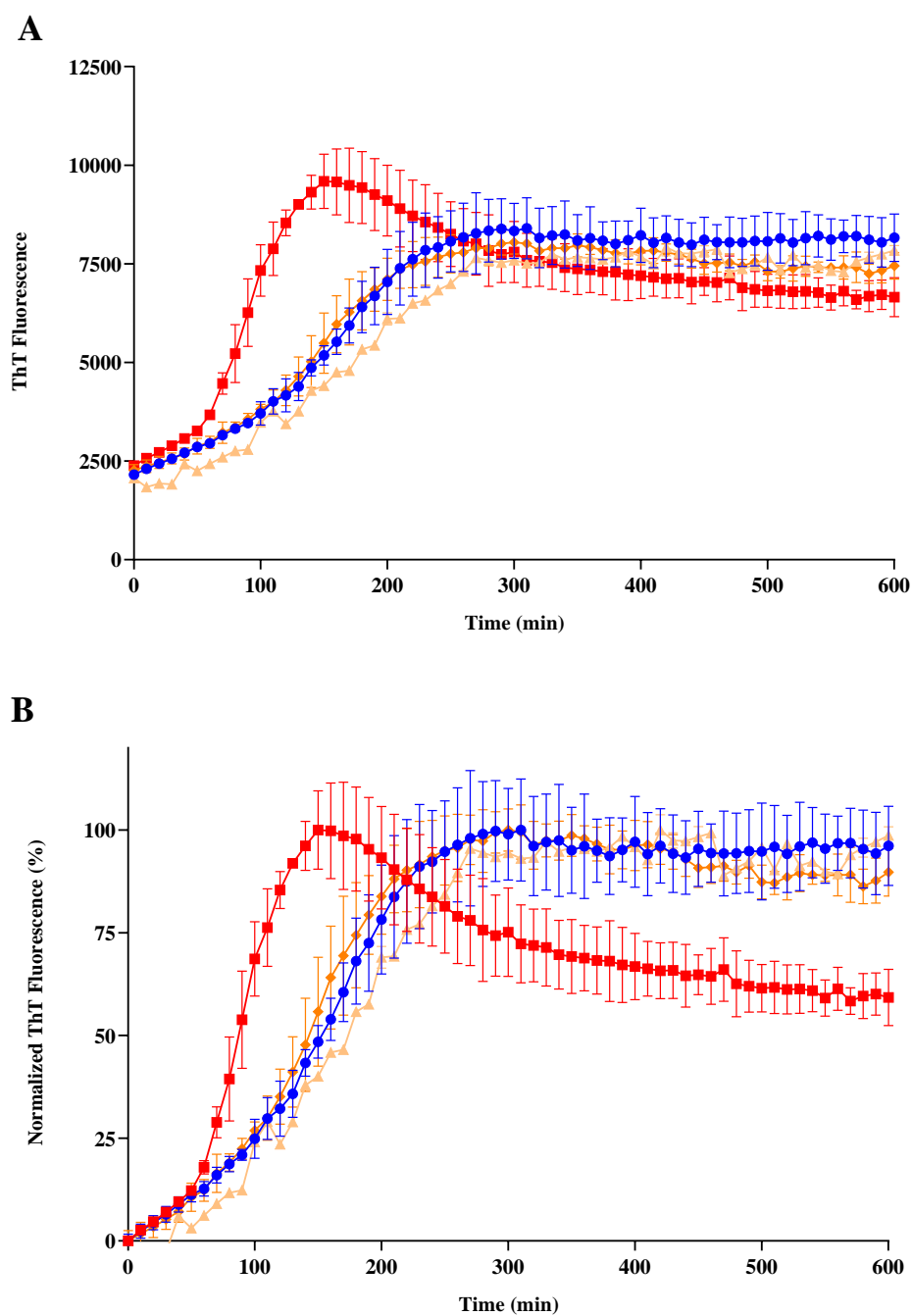


Fig. 24. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for A β ₁₋₄₂ alone (10 μ M, blue dots), A β ₁₋₄₂/indomethacin 10 μ M (beige triangles), 100 μ M (orange diamonds), or 1 mM (red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

According to Fig. 24, no effect is detected using 10 and 100 μM of indomethacin. At the highest concentration (1 mM), an acceleration of the lag phase and the elongation process is observed: instead of reaching the kinetics plateau in 300 min ($\text{A}\beta_{1-42}$ alone), the plateau is reached in 100 min. This result can be explained by the inhibition of the intermediary species formation. By blocking *off*-pathway oligomerization without inhibiting fibrillation (Necula et al., 2007), indomethacin would induce an aggregation kinetics acceleration (*off*-pathway being a kinetic trap) without impacting the fibrillation plateau. It should also be noted that an increase in the fluorescence signal of the ThT was observed during the test with the kit but not on the other test. It was established that the addition of the molecule at the end of the kinetics (600 min after the beginning of the experiments) under our conditions does not lead to an increase in fluorescence (data not shown) but to an immediate decrease which tends to confirm the pro-fibrillation effect with $\text{A}\beta$ in the commercial kit.

3.4.2.3. Modulation of $A\beta_{1-42}$ peptide aggregation by indomethacin in presence of LUVs

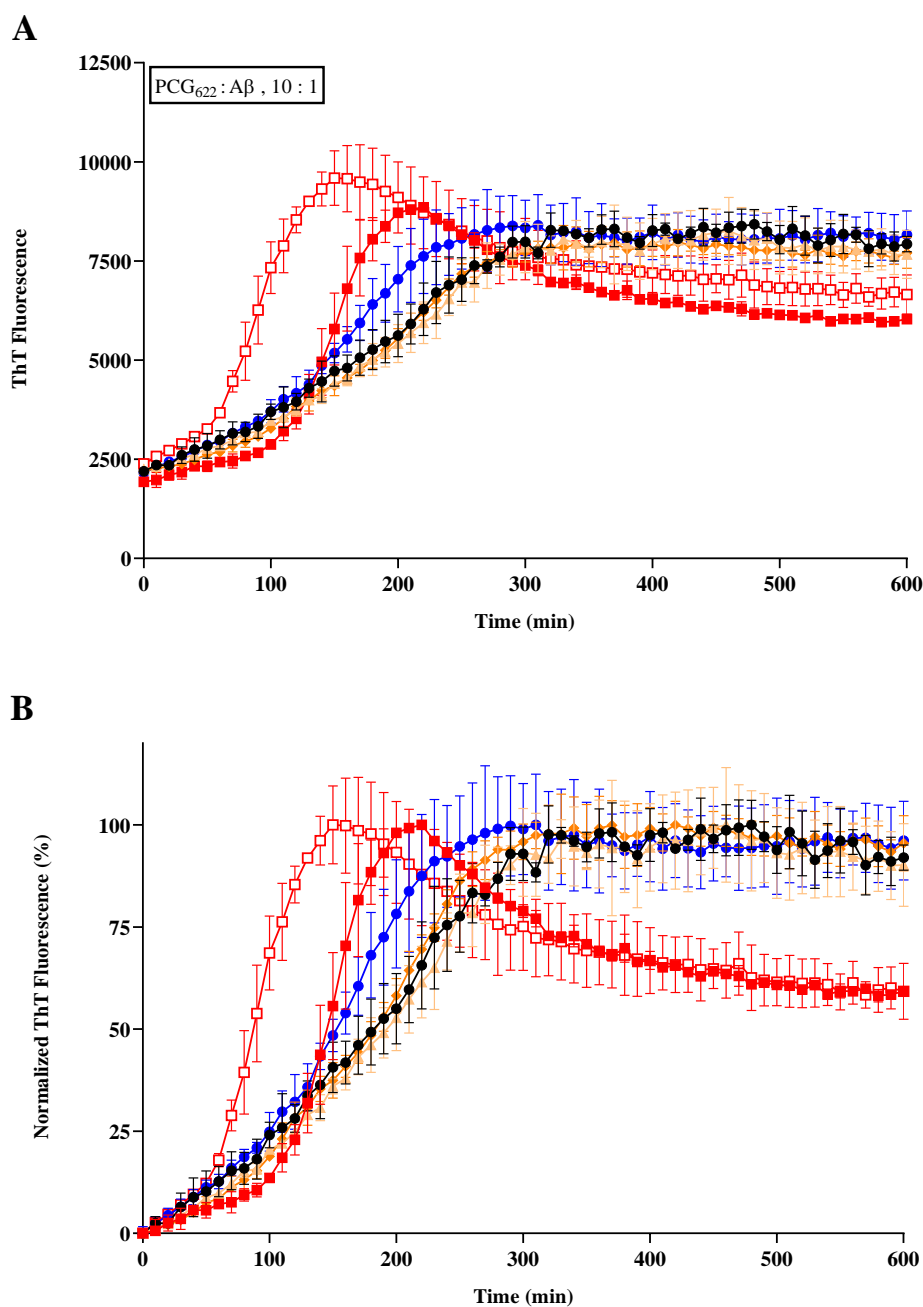


Fig. 25. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for $A\beta_{1-42}$ alone 10 μ M (blue dots), $A\beta_{1-42}$ /indomethacin 1 mM (empty red squares), $A\beta_{1-42}$ /PCG₆₂₂-based LUVs 100 μ M (dark dots), $A\beta_{1-42}$ /PCG₆₂₂-based LUVs and indomethacin 10 μ M (beige triangles), 100 μ M (orange diamonds), or 1 mM (filled red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

In presence of PCG₆₂₂-based LUVs at 100 μM, only the highest concentration of indomethacin (1 mM) leads to a similar effect than the one observed in absence of liposomes, *i.e.* fibrillation acceleration. The indomethacin effect is opposed to that observed with liposomes alone, which cause a fibrillation delay (300 min to reach the plateau for Aβ₁₋₄₂/PCG₆₂₂-based LUVs *vs* 200 min without liposomes). The acceleration of the fibrillation by indomethacin is less important in presence of LUVs (200 min to reach the plateau for Aβ₁₋₄₂/PCG₆₂₂-based LUVs/indomethacin *vs* 150 min without liposomes), which is therefore probably due to a combined effect of indomethacin and liposomes on peptide aggregation (Fig. 25). These observations suggest interactions between the peptide and the molecule, and the building of an interactome implying also lipids. The change to 10 μM of lipids does not seem to have a great influence on the interactions between indomethacin, liposomes and the peptide (Fig. 26).

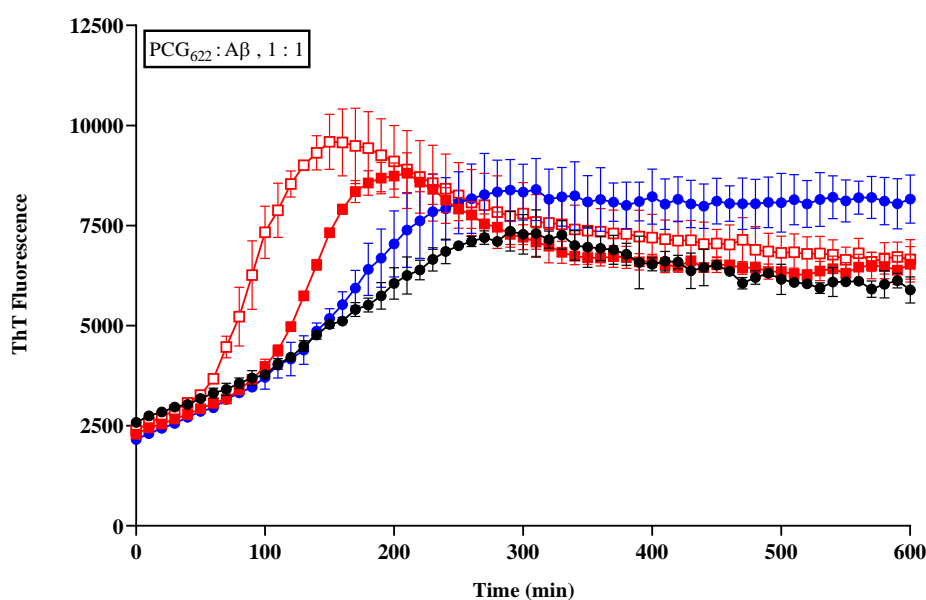


Fig. 26. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for Aβ₁₋₄₂ alone 10 μM (blue dots), Aβ₁₋₄₂/indomethacin 1 mM (empty red squares), Aβ₁₋₄₂/PCG₆₂₂-based LUVs 10 μM (dark dots) and Aβ₁₋₄₂/PCG₆₂₂-based LUVs/indomethacin 1 mM (filled red squares). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

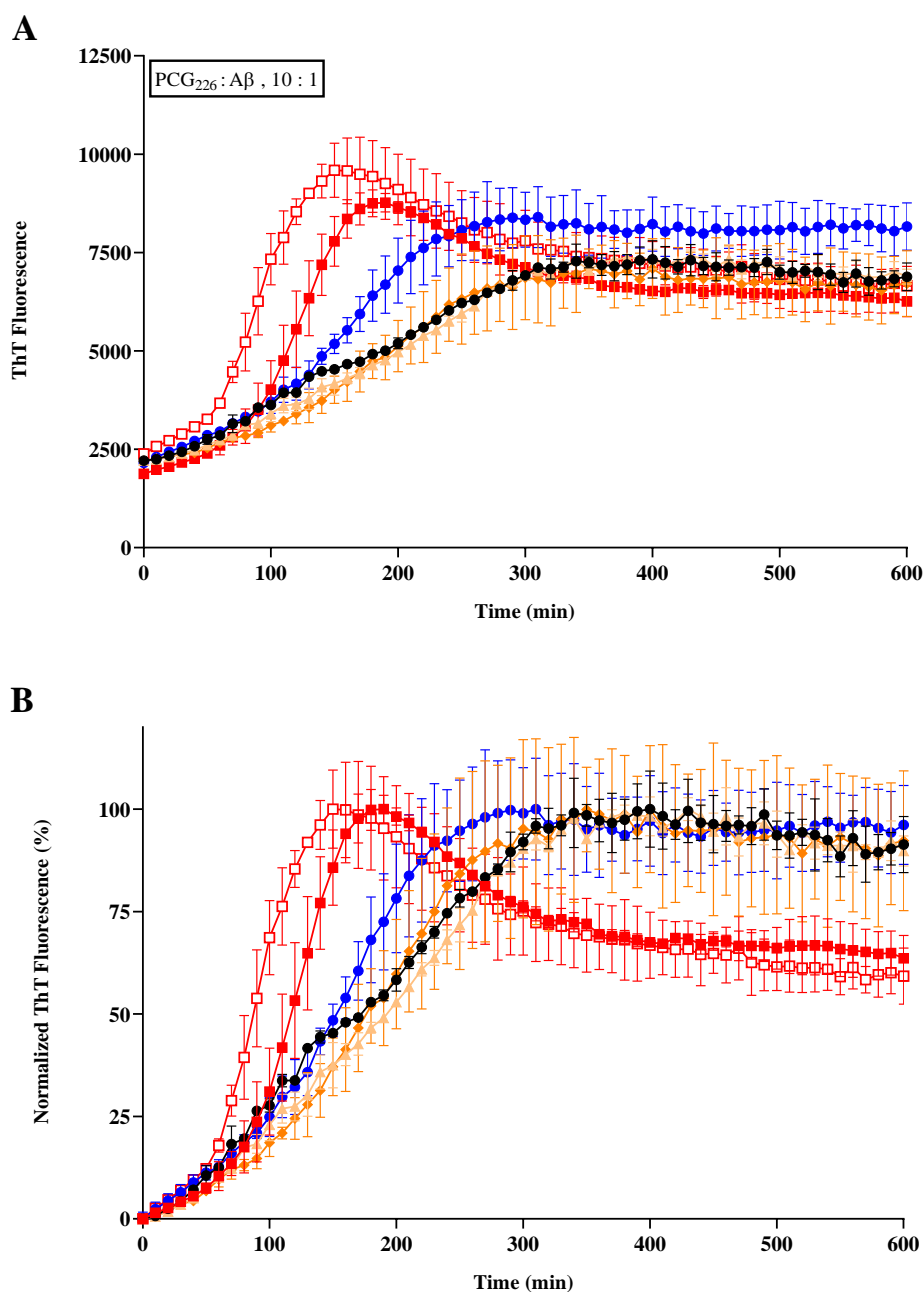


Fig. 27. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for Aβ₁₋₄₂ alone 10 μM (blue dots), for Aβ₁₋₄₂/indomethacin 1 mM (empty red squares), Aβ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs 100 μM (dark dots), Aβ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs/indomethacin 10 μM (beige triangles), 100 μM (orange diamonds), or 1 mM (filled red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

Using PCG₂₂₆-based LUVs at 100 μM, it appears that the composition may slightly modify the effect (Fig. 27).

Indeed, taking into account the fact that there is noise with the fluorescence signal, it is observed that the acceleration of fibrillation was similar when PCG₂₂₆-based LUVs were used *vs* when A β ₁₋₄₂ is incubated alone (~150 min). Only a poor impact of the presence of PCG₂₂₆ is noticed on the lag phase, which appears slightly shorter. The concentration of PCG₂₂₆-based LUVs, that are used seems not be crucial (Fig. 28).

The differences observed between the two compositions tested may be explained by the different interactions of indomethacin with them. Indeed, FPA studies have shown that on PCG₆₂₂-based LUVs, there is a kinetic aspect of the membrane rigidity modification which could correspond to a slow indomethacin incorporation as opposed to PCG₂₂₆-based LUVs, with whom the effect is immediate (Fig. 22). Although indomethacin is immediately incorporated into the PCG₂₂₆ membranes, the effect of the molecule on A β remains strong. In the case of PCG₆₂₂-based LUVs, indomethacin incorporation taking place slowly over time, the effects on the peptide would be slightly more balanced between the action of the molecule and the action of liposomes. Thus, these results tend to show that the peptide preferentially interacts with membranes before interacting with indomethacin.

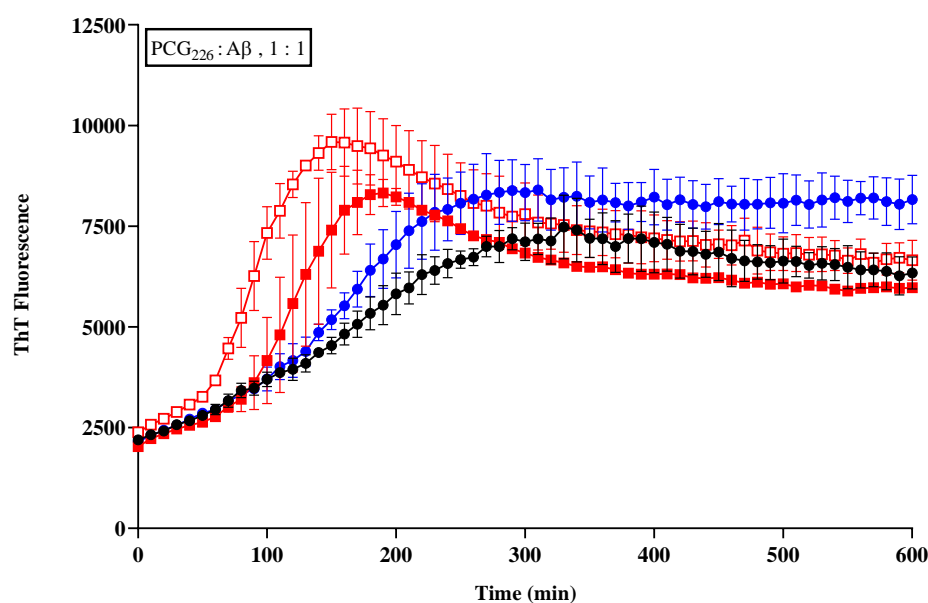


Fig. 28. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for A β ₁₋₄₂ alone 10 μ M (blue dots), A β ₁₋₄₂/indomethacin 1 mM (empty red squares), A β ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs 10 μ M (dark dots) and A β ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs/indomethacin 1 mM (filled red squares). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

3.4.3. Characterization of the indomethacin-oG37C interactions

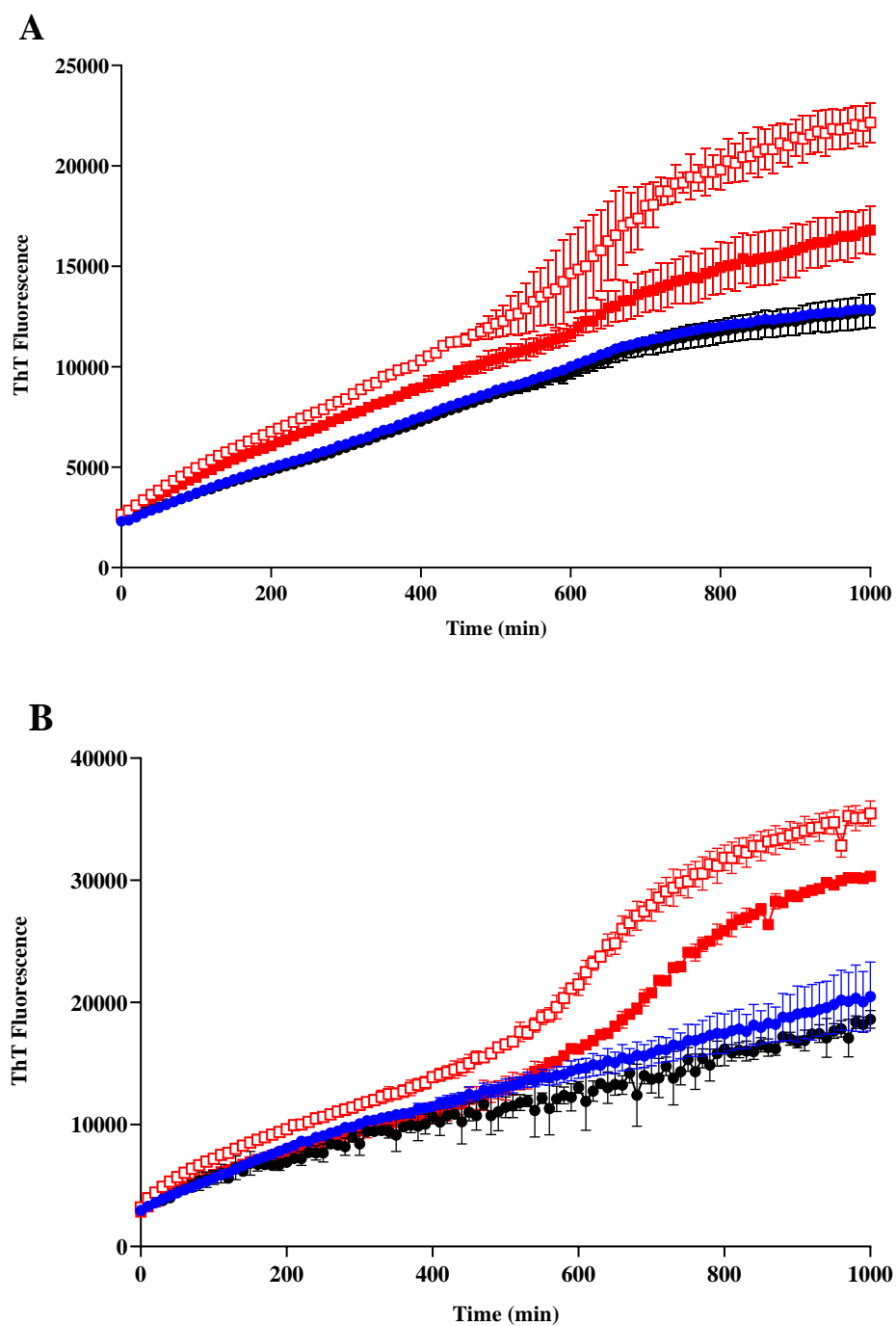


Fig. 29. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for oG37C 10 μM (blue dots), oG37C/indomethacin 1 mM (empty red squares), oG37C/LUVs (dark dots) and oG37C/LUVs/indomethacin 1 mM (filled red squares) using **A.** PCG₆₂₂-based LUVs (10 μM) or **B.** PCG₂₂₆-based LUVs (10 μM) (n=3).

oG37C aggregation is modified by the presence of indomethacin at 1 mM in absence or in presence of liposomes (Fig. 29):

The ThT signal of oG37C aggregation kinetic takes the shape of a sigmoidal curve with a lag phase, an elongation and a saturation phase characteristic of amyloid aggregation. As already said above, in our experimental conditions the oG37C is supposed to follow a linear aggregation kinetic in ThT fluorescence monitoring. Our results suggest that in the presence of indomethacin, another aggregation pathway is created or amplified, and allows the early formation of fibrillary species during the aggregation of oG37C. As observed for A β ₁₋₄₂, the impact of indomethacin remains in presence of LUVS, more particularly with those based on PCG₂₂₆. Unfortunately, it was not possible to further characterize this interactome using ATR-FTIR spectroscopy, considering the overlapping of the C=O group (Fig. 1) signals of indomethacin and oG37C, especially at the high concentration ratio 100:1 indomethacin:oG37C.

Table 6. Granulometric measurements of LUVs made of PCG₂₂₆ (10 μ M), expressed in terms of diameter by volume (nm), peak percentage of each population and PDI, determined immediately after formulation, or after incubation at 25°C for 24h, alone, or in presence of indomethacin (1 mM) or/and oG37C (10 μ M).

Interactome	Ø 1 (nm)	%	Ø 2 (nm)	%	Ø3 (nm)	%	PdI
PCG ₂₂₆ , t ₀	135.5 ± 1.3	100 ± 0.0					0.051 ± 0.016
PCG ₂₂₆ , t ₂₄	141.6 ± 0.8	100 ± 0.0					0.071 ± 0.008
PCG ₂₂₆ , t ₂₄ + IND	142.8 ± 1.7	100 ± 0.0					0.073 ± 0.013
PCG ₂₂₆ , t ₂₄ + oG37C	176.8 ± 16.3	23.6 ± 3.6	1524.3 ± 237.5	73.1 ± 5.2	3205.3 ± 2782.7	3.4 ± 3.4	0.778 ± 0.024
PCG ₂₂₆ , t ₂₄ + oG37C + IND	49.6 ± 8.9	46.6 ± 5.3	250.5 ± 79.6	14.3 ± 3.9	1513.0 ± 16.1	36.0 ± 11.6	0.763 ± 0.094

The CF leakage experiment (Fig. 3) did not showed any significant difference of leakage between oG37C alone (~ 10 %) and oG37C in presence of indomethacin (~ 11 %). DLS experiments (Table 6), showed a surprising membrane reorganization effect with formation of a significant population (~ 46 %) of smaller particles (Ø 49.6 nm).

Among mechanisms that have been suggested to describe interactions between A β peptide and membranes, there are covering of the membrane (carpet effect), permeation of the membrane (pore formation), and membrane dissolution (detergent effect) (Williams and Serpell, 2011).

Apparition of smaller particles in presence of both indomethacin and oG37C calls for a detergent effect.

Interactions between indomethacin and oG37c did not decrease membrane lytic properties of the peptide but may induce the apparition of another aggregation pathway.

3.4.4. *Indomethacin results discussion*

Indomethacin is capable of interacting with the membranes without exerting an exacerbated intrinsic toxicity. On one hand, this compound seems to be able to systematically inhibit the formation of oligomers whether in the absence or presence of liposomes. Indomethacin showed ability to promote oG37C fibrillation, but not accompanied by any convincing protective effect towards liposome membrane since a detergent effect is objectified.

In presence of indomethacin, another aggregation pathway of oG37C is created or amplified. With this organization change, the peptides could have an increased affinity for the membrane. When oG37C species come at the vicinity of PCG₂₂₆-based LUVs, the peptides would quickly diffuse and insert into the membrane. Although the membrane is broken, the peptide, due to its hydrophobicity increased by its new conformation, would remain associated with the phospholipids to form new smaller vesicles corresponding to those measured in DLS. Such a SM/PC/GM1/chol membrane reorganization upon oG37C has been already hypothesized from high speed atomic force microscopy pictures (Ewald et al., 2019). It is the first time that it is described and correlated to the effect of a drug, indomethacin.

Considering A β ₁₋₄₂, our results are in agreement with Necula *et al.* (2007) who described indomethacin as an oligomerization inhibitor that do not promote A β ability to produce fibrils fibrillation (Necula et al., 2007). It should be noted that to observe the effects of indomethacin, it is necessary to use very high concentrations (100 fold greater than peptide concentration in our case), which hardly makes it an ideal candidate for clinical tests or even *in vivo* studies. However, this molecule can be considered as an *in vitro* model molecule that can provide valuable information for understanding the process of peptide aggregation and to go further in the field of drug discovery. The effect observed on oG37C, although not showing any protective effect on liposomes, seems to be of interest for the use of modulators of the A β aggregation. This effect could be besides corroborated by *in vitro* studies. For example, it was established that trodusquemine enhances the rate of aggregation by promoting monomer-dependent secondary nucleation and significantly reduces the toxicity of the resulting oligomers on neuroblastoma cells and on a *C. elegans* model (Limbocker et al., 2019).

3.5 o-vanillin

o-Vanillin is a small organic compound which derives from vanillin by having its hydroxyl moiety in *ortho*-position vs *para*-position for vanillin (Fig 1.C). Unlike its derivatives which have been tested for their potential therapeutic effect in AD (Abuhamdah et al., 2017), *o*-vanillin is mostly used for its antifungal, mutagenesis and antioxidant properties (Kim et al., 2014; Marton et al., 2016; Matsumura et al., 1993; Santosh Kumar et al., 2002). However, Necula *et al.* (2007) described *o*-vanillin as a compound able to inhibit oligomerization and fibrillation of A β peptide (Necula et al., 2007).

3.5.1. Characterization of the o-vanillin-LUVs interactions

3.5.1.1. Determination of o-vanillin partition coefficient

In presence of SPC or PCG₆₂₂-based LUVs no significant spectral shift was observed when the lipid concentration was increased, and no K_p value could be determined for *o*-vanillin. This result probably means that the interactions are too weak to be detected, which is consistent with the low predicted log D_{7.4} value of 1.86 (Table 1), which indicates the low hydrophobicity of this compound.

3.5.1.2. Assessment of o-vanillin-membrane interactions by fluorescence anisotropy measurement

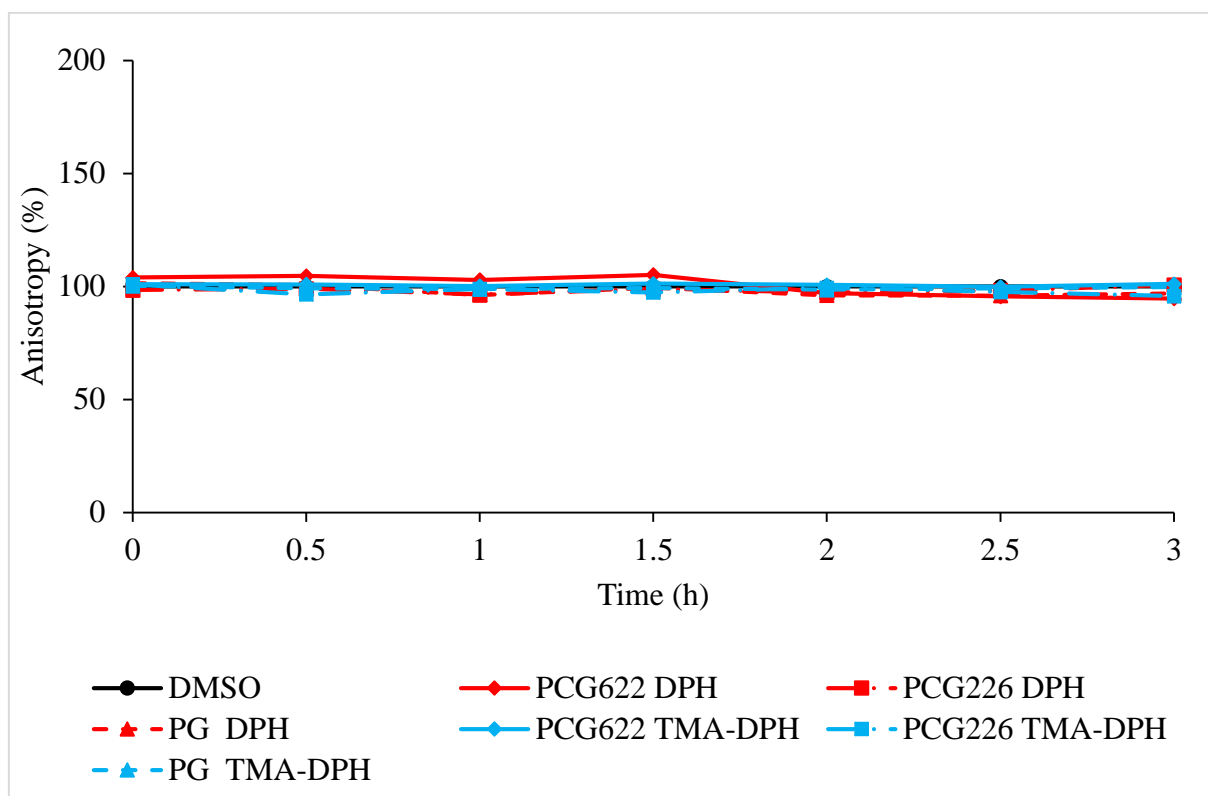


Fig. 30. Steady-state anisotropy of DPH and TMA-DPH as a function of time in each LUV model in absence (only DMSO used as control), and in presence of *o*-vanillin (10 μ M).

In presence of *o*-vanillin, no changes of DPH and TMA-DPH were observed whatever the composition of the LUVs (Fig. 30). These results corroborate the K_p determination results and confirmed that there are no detectable interactions between *o*-vanillin and the membranes.

3.5.1.3. Assessment of *o*-vanillin-membrane interactions by liposome leakage assay

In presence of *o*-vanillin, no significant membrane disruptive effect was observed on PCG₂₂₆-based LUVs. From DLS measurements performed on these samples at the end of experiments, all the LUVs remained intact after incubation with the molecule for 24 h (Table 8). From results of these different studies, interactions between *o*-vanillin and model membranes are rather only weakly objectified, and are not accompanied by significant destabilization effects.

3.5.2. Characterization of the *o*-vanillin- $A\beta_{1-42}$ interactions

3.5.2.1 Inhibition of $A\beta_{1-42}$ aggregation (commercial kit assay) by *o*-vanillin

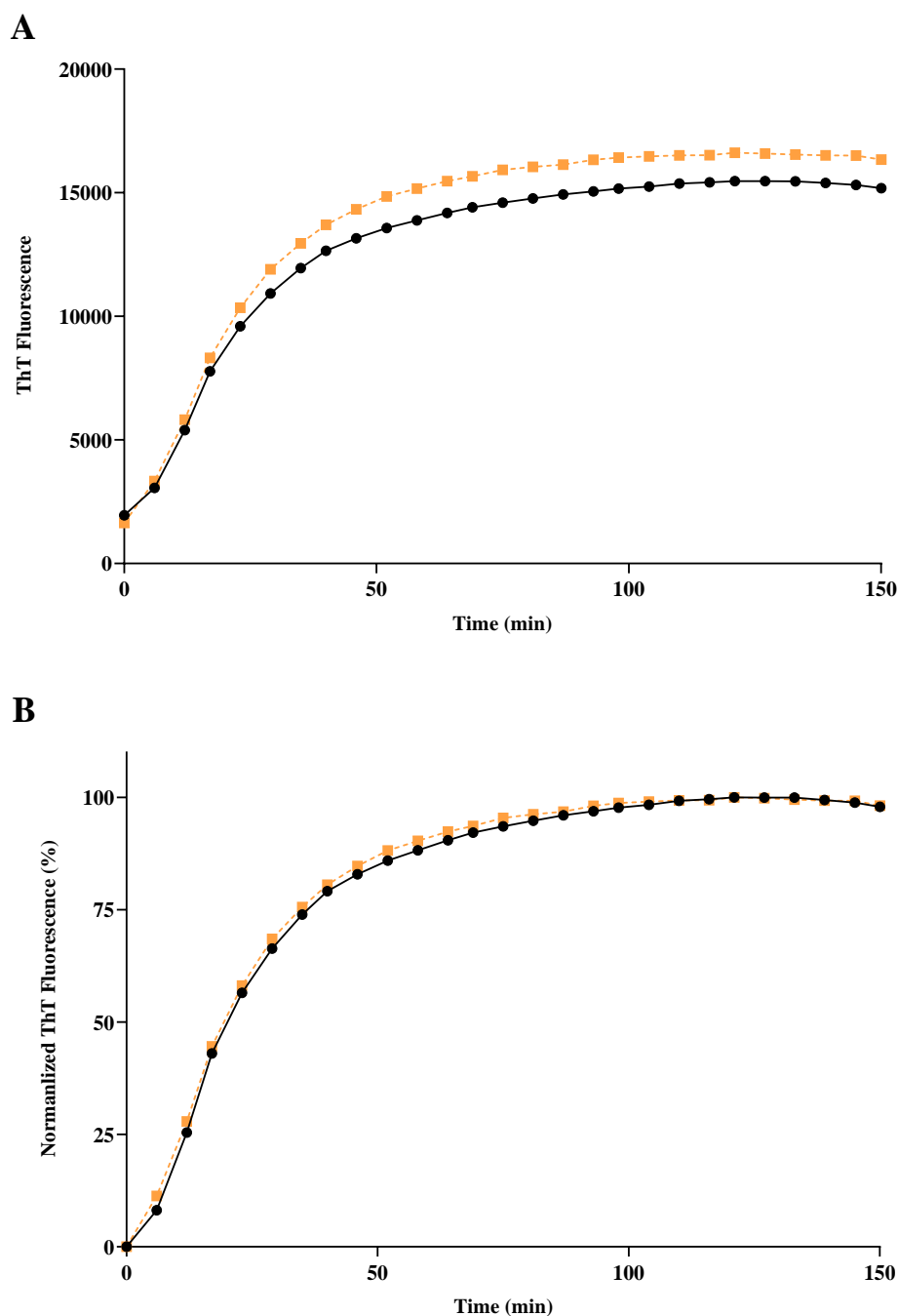


Fig. 31. Evolution of the ThT fluorescence (20 μM) in presence of Aβ₁₋₄₂ alone (46.5 μM, dark dots) or in presence of *o*-vanillin (10 μM, orange squares): **A.** raw data, **B.** data normalized to the average of steady-state fluorescence intensity values detected for Aβ₁₋₄₂ alone. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

Using the commercial assay, no effect due to *o*-vanillin used at the concentration of 10 μM was objectified on the aggregation of the peptide (Fig. 31).

3.5.2.2. Modulation of $A\beta_{1-42}$ peptide aggregation by *o*-vanillin

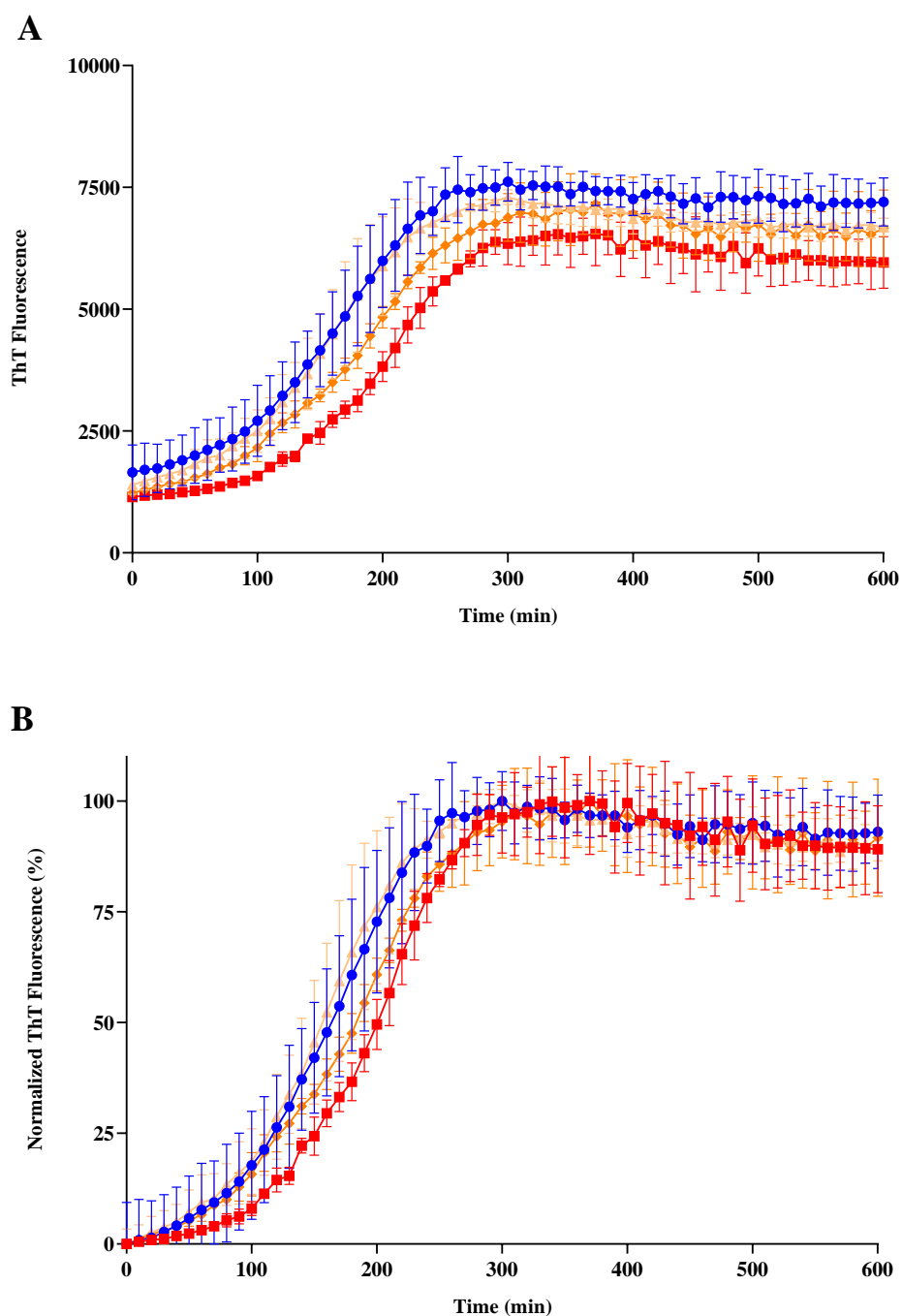


Fig. 32. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for $A\beta_{1-42}$ alone (10 μ M, blue dots), $A\beta_{1-42}/o$ -vanillin 0.1 μ M (beige triangles), 1 μ M (orange diamonds), or 10 μ M (red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

Using our kinetic aggregation conditions, it appears that *o*-vanillin causes a slight delay (~ 100 min at the highest concentration) of the fibrillation process correlated with a quantitative decrease, both effects in concentration-dependent manner (Fig. 14). Our results showed a kinetic effect which could be associated with the inhibition of oligomeric species and a quantitative effect which can be associated with the inhibition of fibrils formation. These results are in agreement with the effects described by Necula *et al.* (Necula et al., 2007).

3.5.2.3. Modulation of $A\beta_{1-42}$ peptide aggregation by *o*-vanillin in presence of LUVs

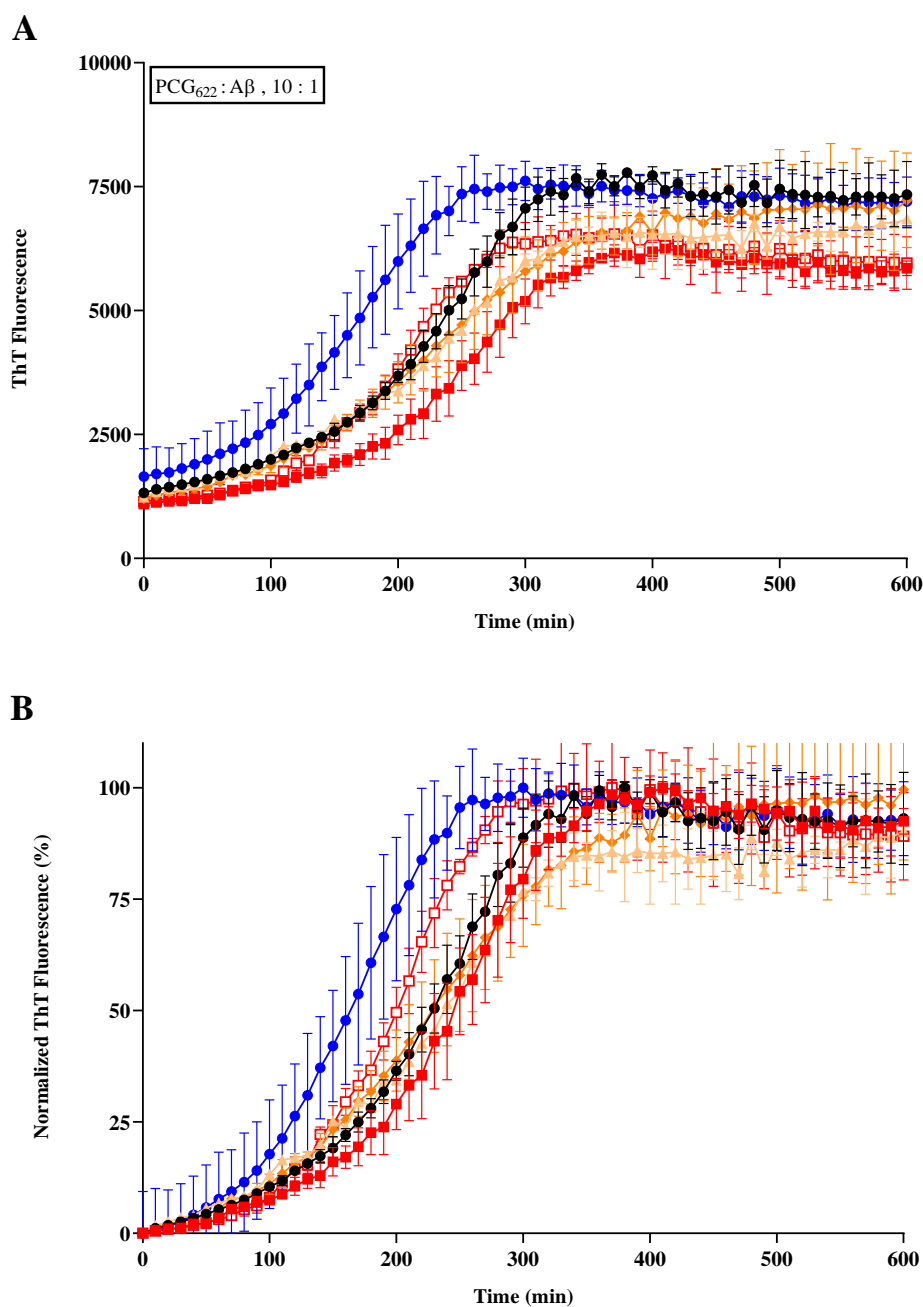


Fig. 33. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for $A\beta_{1-42}$ alone 10 μ M (blue dots), $A\beta_{1-42}$ /o-vanillin 10 μ M (empty red squares), $A\beta_{1-42}$ /PCG₆₂₂-based LUVs 100 μ M (dark dots), $A\beta_{1-42}$ /PCG₆₂₂-based LUVs and o-vanillin 0.1 μ M (beige triangles), 1 μ M (orange diamonds), or 10 μ M (filled red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

In presence of PCG₆₂₂-based LUVs the kinetic effect combined to the diminution of the fluorescence plateau is observed compared to when the peptide is incubated with *o*-vanillin (Fig. 33).

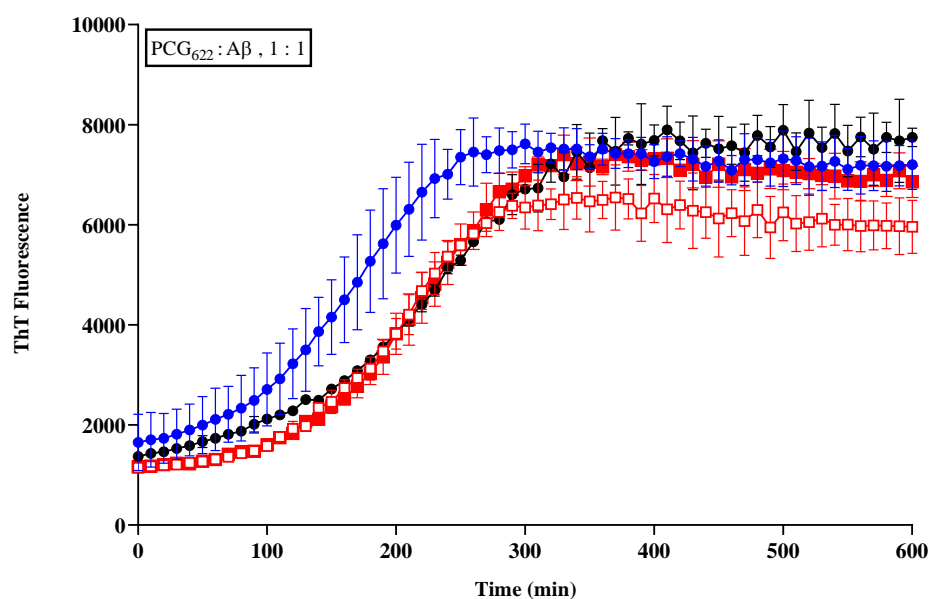


Fig. 34. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for A β_{1-42} alone 10 μM (blue dots), A β_{1-42} /*o*-vanillin 10 μM (empty red squares), A β_{1-42} /PCG₆₂₂-based LUVs 10 μM (dark dots), and A β_{1-42} /PCG₆₂₂-based LUVs/*o*-vanillin 10 μM (filled red squares). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

In the presence of PCG₆₂₂-based LUVs at 10 μM , the effect of *o*-vanillin is practically no longer observable. The lipids:*o*-vanillin:A β molar ratio of 1:1:1 curve can be superposed with that obtained for A β and PCG₆₂₂-based LUVs (dark dots and filled red squares curves, Fig. 34).

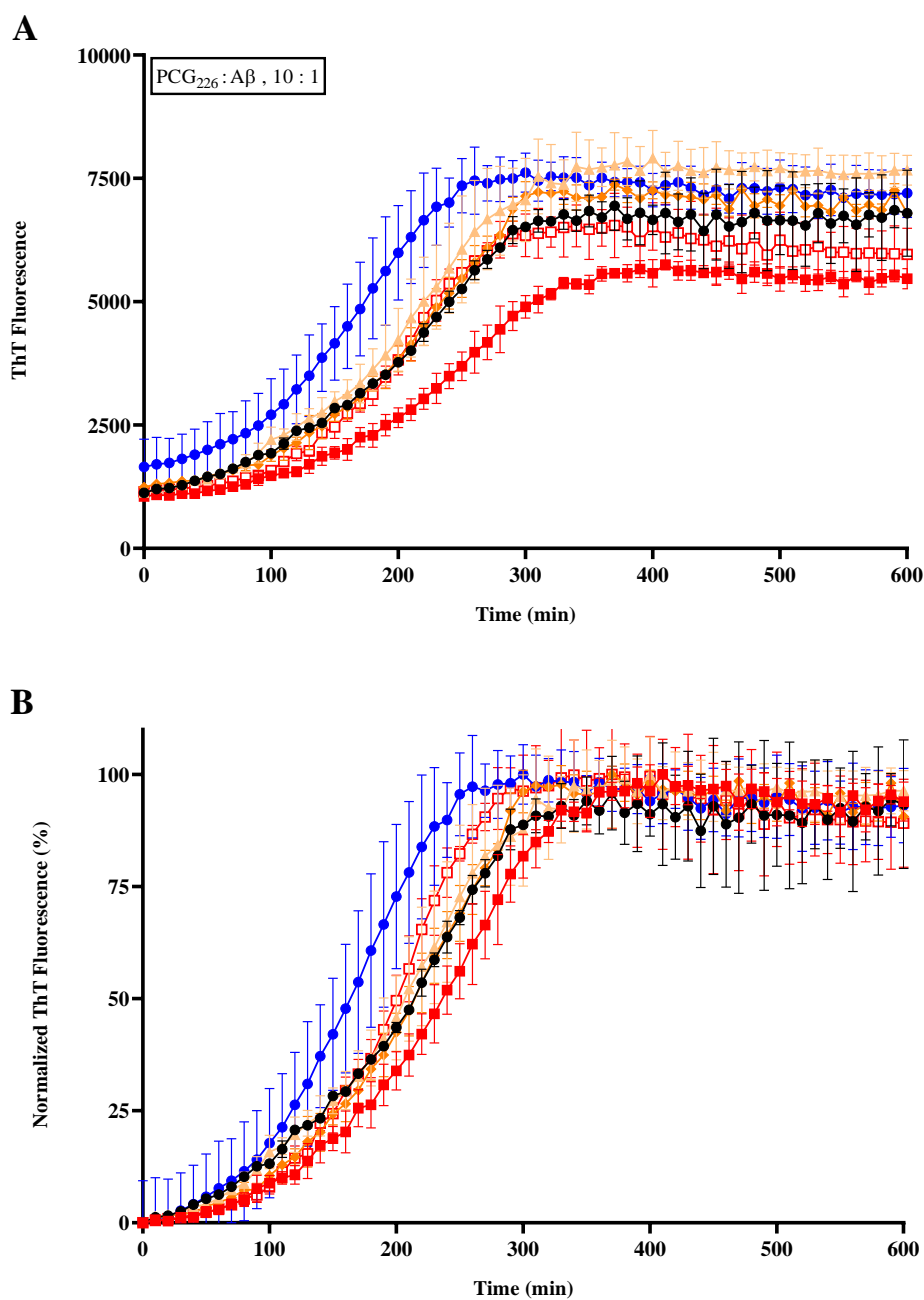


Fig. 35. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for Aβ₁₋₄₂ alone 10 μM (blue dots), for Aβ₁₋₄₂/o-vanillin 10 μM (empty red squares), Aβ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs 100 μM (dark dots), Aβ₁₋₄₂/PCG₂₂₆-based LUVs/o-vanillin 0.1 μM (beige triangles), 1 μM (orange diamonds), or 10 μM (filled red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

From Fig. 35, it appears that a change in the relative composition of liposomes affects the effects of o-vanillin at its lowest concentrations (0.1 and 1 μM).

It becomes therefore difficult to objectify a significant effect because of the small variations. At the highest concentration (10 μM), a quantitative effect with a diminution of the fluorescence intensity at the plateau of the kinetics associated with a kinetic delay is observable.

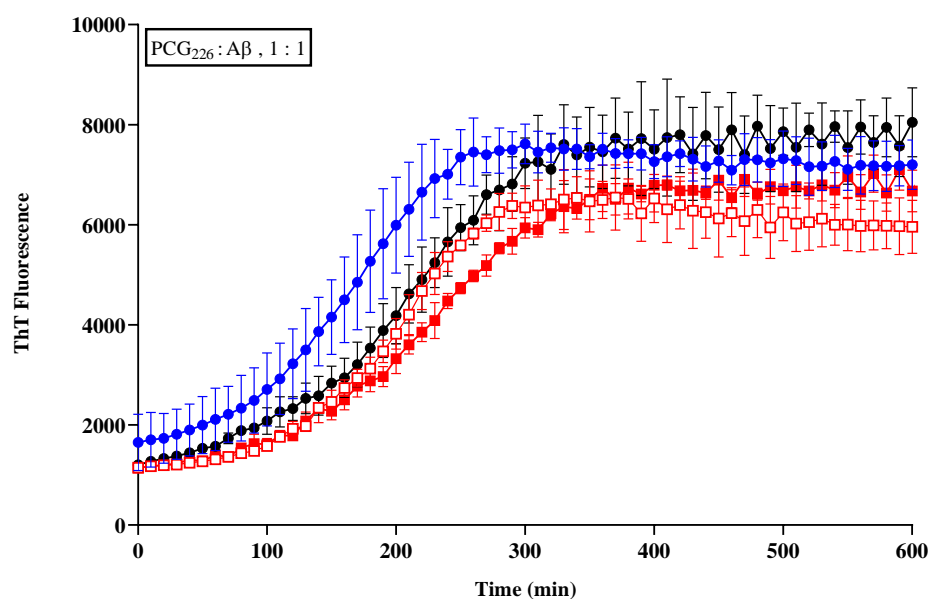


Fig. 36. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for A β_{1-42} alone 10 μM (blue dots), A β_{1-42} /o-vanillin 10 μM (empty red squares), A β_{1-42} /PCG₂₂₆-based LUVs 10 μM (dark dots) and A β_{1-42} /PCG₂₂₆-based LUVs/o-vanillin 10 μM (filled red squares). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

When PCG₂₂₆-based LUVs are used with a molar ratio of 1:1:1 (lipid:o-vanillin:A β), the differences between the plateau curves are overlapped and it is therefore difficult to objectify a distinct quantitative effect (Fig. 36). On the other hand, from the kinetic point of view, we find a similar effect as observed for the ratio 10:1:1 with a kinetic delay.

All the collected data indicate that o-vanillin seems to be able to interfere with the intermediate and final species of peptide aggregation kinetics. This corroborates the results obtained by Necula *et al.* (2007). The presence of liposomes, although o-vanillin does not interact with membranes, seems to be able to affect the different effects observed as a function of the ratio and the composition used.

3.5.3. Characterization of the *o*-vanillin-*o*G37C interactions

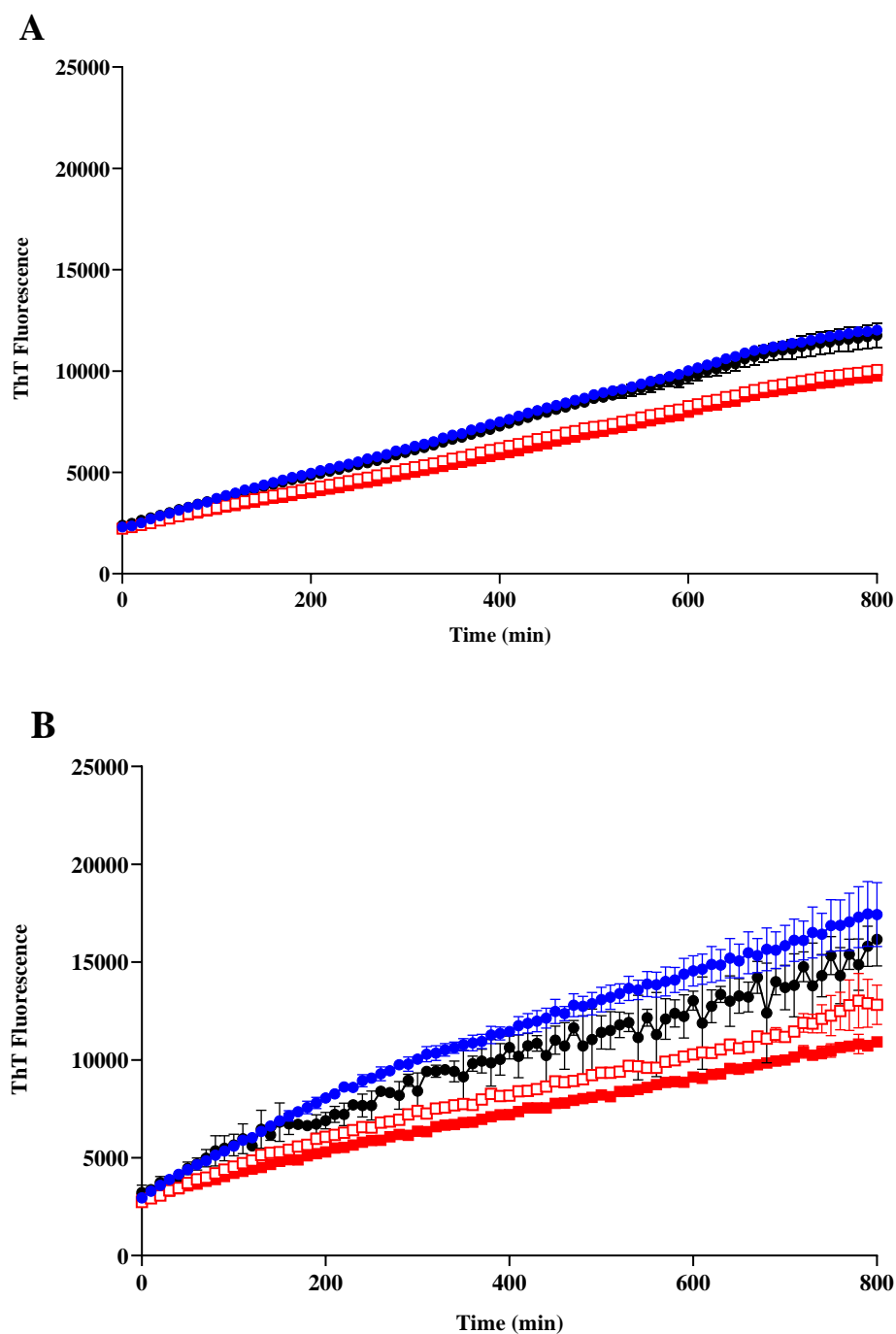


Fig. 37. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for *o*G37C 10 μM (blue dots), *o*G37C/*o*-vanillin 10 μM (empty red squares), *o*G37C/LUVs (dark dots) and *o*G37C/LUVs/*o*-vanillin 10 μM (filled red squares) using **A.** PCG₆₂₂-based LUVs (10 μM) or **B.** PCG₂₂₆-based LUVs (10 μM). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

oG37C aggregation appears to be influenced by the presence of *o*-vanillin at 10 μ M, in the absence and in the presence of liposomes, whatever the composition used (Fig. 37). There is a decrease in the aggregation of oG37C in the presence of *o*-vanillin, which confirms the effects observed on A β ₁₋₄₂.

Table 7. Relative abundance of each secondary structure after deconvolution of ATR-FTIR amide I band monitored after incubation at 25°C overnight of oG37C (50 μ M) alone, or mixed with *o*-vanillin (50 μ M).

	Center (cm ⁻¹)	Assignment	oG37C	oG37C + oVA	oG37C + PCG ₂₂₆	oG37C + PCG ₂₂₆ + oVA
Relative	1628	β -sheet	45.8	43.3	33.6	35.6
abundance	1679	anti// β	9.3	0.0	8.8	0.0
(%)	1652	α / random	44.9	56.7	57.6	64.4

According to the signal fit (see *supporting information*), in presence of *o*-vanillin there is a relative decrease in anti-parallel β -sheet conformation for the oG37C peptide: the contribution associated with this conformation disappear (Table 7), instead there is a ~12% increase of the α -helix conformation in presence and absence of PCG₂₂₆-based LUVs. These results are coherent with the ThT results which showed slight fluorescence intensity diminution. Like the CSB, this compound shows a very interesting effect with the disappearance of the anti-parallel β -sheet signal, however in this case there seems to be no change in this effect due to the presence of liposomes.

Table 8. Granulometric measurements of LUVs made of PCG₂₂₆ (10 μ M), expressed in terms of diameter by volume (nm), peak percentage of each population and PDI, determined immediately after formulation, or after incubation at 25°C for 24h alone, or in presence of *o*-vanillin (10 μ M) or/and oG37C (10 μ M).

Interactome	Ø 1 (nm)	%	Ø 2 (nm)	%	Ø 3 (nm)	%	PdI
PCG ₂₂₆ , t ₀	140.3 ± 1.3	100 ± 0.0					0.052 ± 0.013
PCG ₂₂₆ , t ₂₄	148.9 ± 1.7	100 ± 0.0					0.047 ± 0.011
PCG ₂₂₆ , t ₂₄ + oVA	156.9 ± 6.3	100 ± 0.0					0.069 ± 0.020
PCG ₂₂₆ , t ₂₄ + oG37C	159.4 ± 13.7	14.8 ± 2.2	1102.3 ± 30.7	75.0 ± 6.2	5058.3 ± 248.6	10.2 ± 4.0	0.600 ± 0.151
PCG ₂₂₆ , t ₂₄ + oG37C + oVA	156.4 ± 70.7	16.6 ± 2.3	1185.0 ± 852.9	56.9 ± 36.7	2097.3 ± 2576.2	21.6 ± 30.0	0.815 ± 0.085

The CF leakage experiment (Fig. 3) did not showed any significant difference of leakage between oG37C (~ 10 %) alone and oG37C in presence of *o*-vanillin (~ 9 %). DLS experiments (Table 8), also showed total membrane destabilization in the presence of *o*-vanillin and oG37C.

3.3.4. *o*-Vanillin results discussion

No interaction could be objectified between *o*-vanillin and membranes, which may suggest that the effects observed are due to the interaction between the molecule and the oG37C. However, despite the decrease in the anti-parallel β sheet contribution in the presence of *o*-vanillin, no significant decrease of the peptide toxicity was observed. We also observed kinetic and quantitative effects of *o*-vanillin on A β ₁₋₄₂ expressing an effect of the molecule on oligomerization and fibrillation steps in agreement with Necula et al. (2007) (Necula et al., 2007).

o-vanillin alone has not demonstrated a drastic effect with respect to peptide toxicity but seems to be able to bring about interesting effects such as the reduction of the anti-parallel β sheet conformation in the absence or in the presence of liposomes. Considering the low molecular weight of *o*-vanillin structure, this molecule is often used as a precursor for the chemical synthesis of more complex compounds. Then, it could be considered as promising starting point to conduct a drug design study using a fragment-based approach.

In a recent structure/activity relationship study, the design of curcumin analogues, that hold similar vanillin or *iso*-vanillin groups, have been reported by our lab (Jourdan et al., 2016). New synthesized compounds showed multiple activities of interest for the treatment of AD. Taking into account these results, and its CNS druggability potential, MR32741 has emerged as a promising lead for a therapeutic approach.

3.6 MR32741

MR32741 was a lead obtained during the development of novel benzylidene-phenylpyrrolizinones derivatives as multi targeted drug ligand (MTDL) against AD. Among all compound tested, MR32741 exhibited the best predictive druggability parameters in terms of permeability, lack of cytotoxicity, chemical stability (Jourdan et al., 2016). Moreover, this compound exhibits multiple biochemical activities against AD: antioxidant-, metal ion chelating, and anti A β aggregation activities. The latest was objectified using the same commercial assay kit (Sensolyte[®]) and value was 28.7 ± 3.3 % at 10 μ M (Jourdan et al., 2016).

3.6.1.1. Determination of MR32741 partition coefficient

In presence of 100 % SPC based LUVs, the partition coefficient of MR32741 is 3.29, whereas in presence of PCG622-based LUVs, the value is slightly lower (3.09) (Table 1). These values indicate an interaction of MR32741 with membranes in accordance with the predicted log $D_{7.4}$ value of 3.99, and are coherent with the hydrophobic character of its chemical structure.

3.6.1.2. Assessment of MR32741-membrane interactions by fluorescence anisotropy measurement

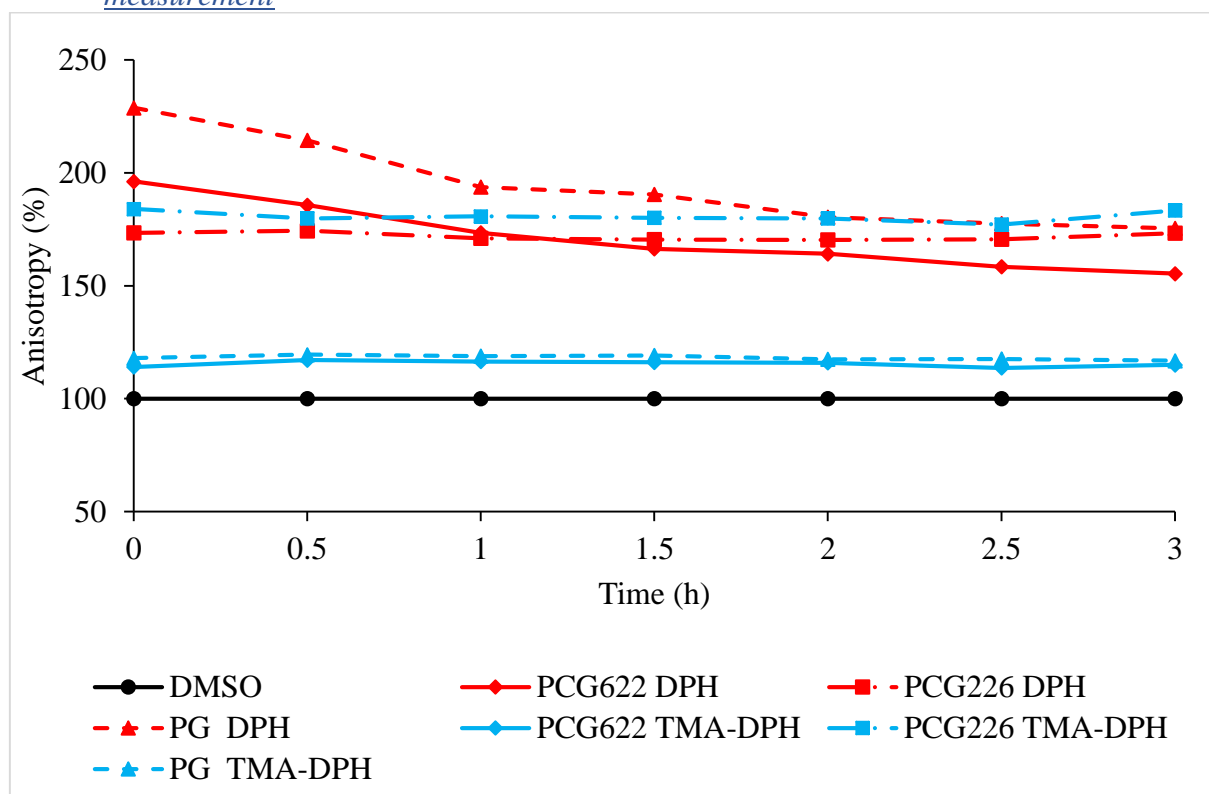


Fig. 38 Steady-state anisotropy of DPH and TMA-DPH as a function of time in each LUV model in absence (only DMSO used as control), and in presence of MR32741 (100 μ M).

In presence of MR32741, the DPH anisotropy increased in all cases. TMA-DPH anisotropy also increased for PCG₂₂₆-based LUVs but showed a slight increasing in presence of 100 % PG and PCG₆₂₂-based LUVs (Fig. 38). These results showed that there is a strong interaction between MR32741 and the LUVs membranes. It seems that the molecule is inserted in the membrane which leads to a stiffening of the bilayer matrix.

3.6.1.3. Assessment of MR32741-membrane interactions by liposome leakage assay

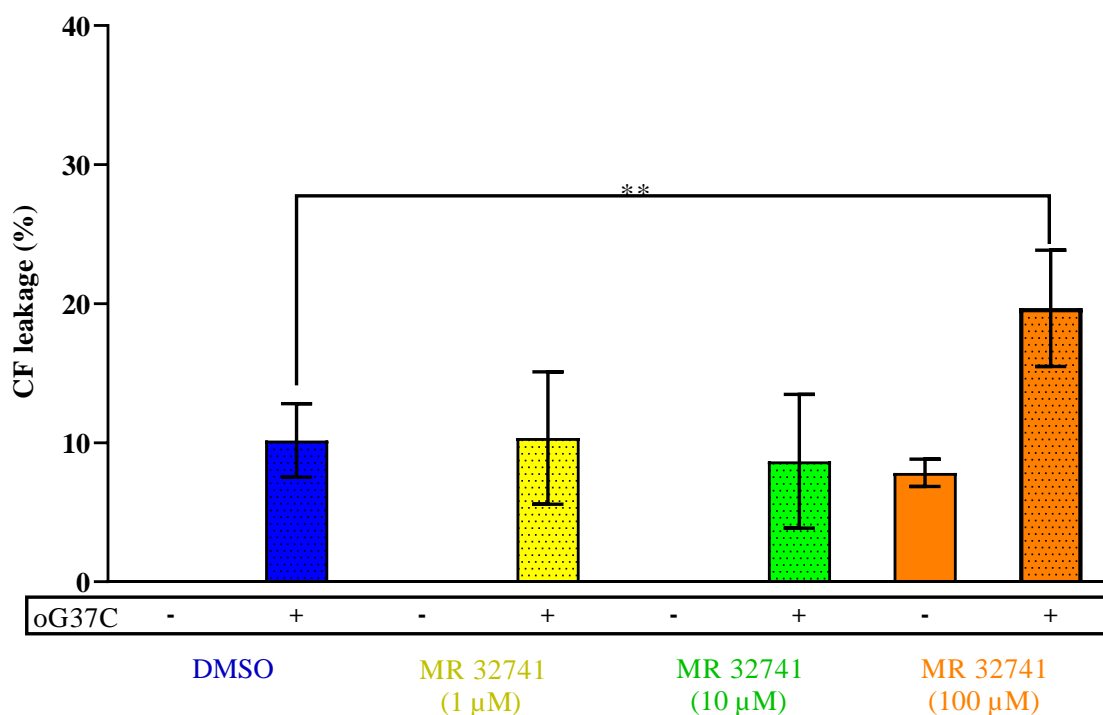


Fig. 39. Carboxyfluorescein leakage from PCG₂₂₆-based LUVs (10 μM) in absence and in presence of oG37C (10 μM) and MR32741 (1, 10 and 100 μM) after 4h of incubation at 25°C. 6 samples data were analyzed by the Mann and Whitney statistical test ($p < 0.05$).

No significant membrane disruptive effect was observed upon exposure to 1 and 10 μM of MR32741. At 100 μM, 8 % of CF leakage is observed indicating a deleterious effect of the molecule on the LUV membranes (Fig. 39). From DLS measurements performed on these samples, for every MR32741 concentration tested, the integrity of liposomes do not appeared to be impacted after incubation with the molecule for 24 h (Table 10). However, the increase in MR32741 concentration was associated with an increase of the average diameter of the liposomes (141.6 < 149.9 < 155.5 < 165.4 nm respectively for 0, 1, 10 and 100 μM of MR32741), and to a larger population at the highest concentration. These results corroborate the incorporation of the compound in the liposome membranes, highlighted from FPA measurements.

3.6.2. Characterization of the MR32741- $A\beta_{1-42}$ interactions

3.6.2.1 Inhibition of $A\beta_{1-42}$ aggregation (commercial kit assay) by MR32741

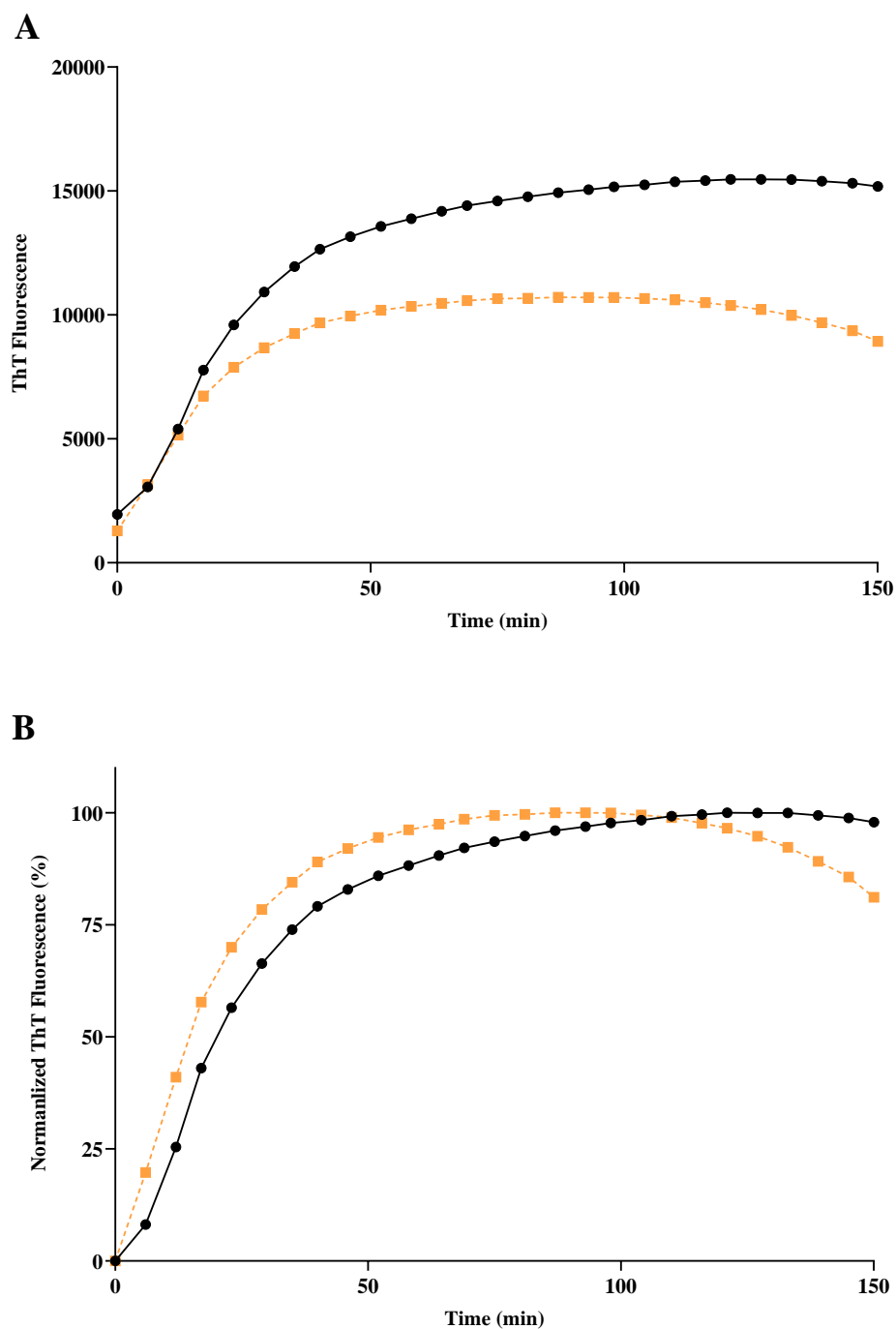


Fig. 40. Evolution of the ThT fluorescence (20 μ M) in presence of $A\beta_{1-42}$ alone (46.5 μ M, dark dots) or in presence of MR32741 (100 μ M, orange squares): **A.** raw data, **B.** data normalized to the average of steady-state fluorescence intensity values detected for $A\beta_{1-42}$ alone.

Using the commercial assay, about half of the ThT signal is lost at the plateau: 36.9 ± 11.2 % of inhibition (Fig. 40). This quantitative effect is associated with a very small kinetic acceleration of the fibrillation step. MR32741 would inhibit the fibrillation and would have an effect on oligomeric species formation. The same kit was applied by Jourdan *et al.* (2016) using $10 \mu\text{M}$ of MR32741 and it was established that the inhibition was about 28.7 ± 3.3 % (Jourdan et al., 2016). MR32741 effect appears as concentration dependent.

3.6.2.2. Modulation of $A\beta_{1-42}$ peptide aggregation by MR32741

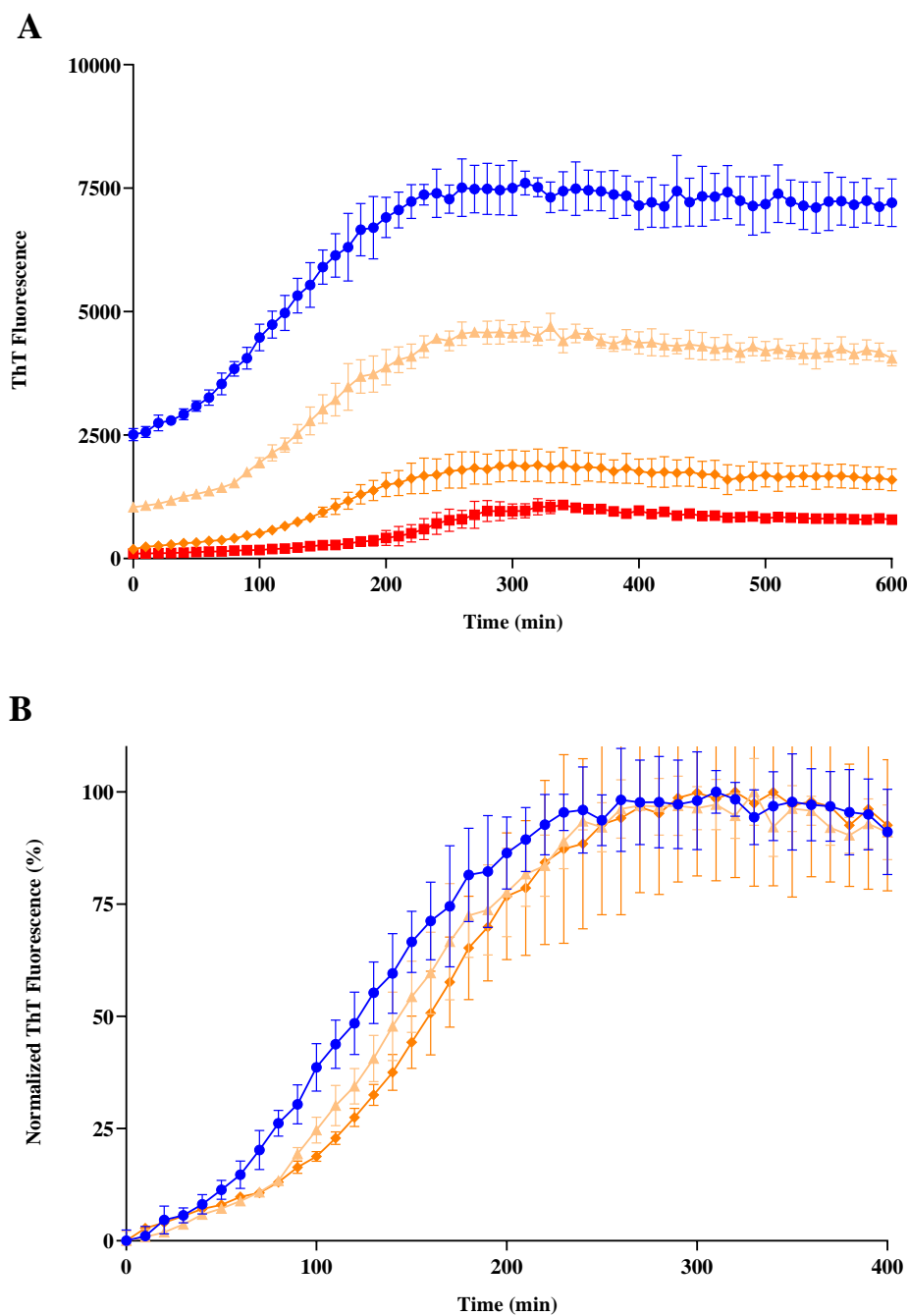


Fig. 41. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for $A\beta_{1-42}$ alone (10 μ M, blue dots), $A\beta_{1-42}$ /MR32741 1 μ M (beige triangles), 10 μ M (orange diamonds), or 100 μ M (red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

Using our kinetic aggregation conditions, the MR32741 exerts a concentration-dependent diminution of the fluorescence at the plateau (Fig. 41).

However, the decrease in the fluorescence intensity at the beginning of the kinetics and the observation of the controls (data not shown) show that there is a quenching of the ThT signal, even at a low MR32741 concentration. This information will be taken into account for the other fluorescence tests. However, whereas diminution of fluorescence intensity of ThT with MR32741 could not be over interpreted, kinetics analysis keeps their meaning with attention. In Fig. 41.B, a slight concentration-dependent delay effect can be observed as MR32741 is added. This result may be an effect of MR32741 on the early species of aggregation, but will not be taken for granted considering the molecule effect on the ThT signal.

3.6.2.3. Modulation of $A\beta_{1-42}$ peptide aggregation by MR32741 in presence of LUVs

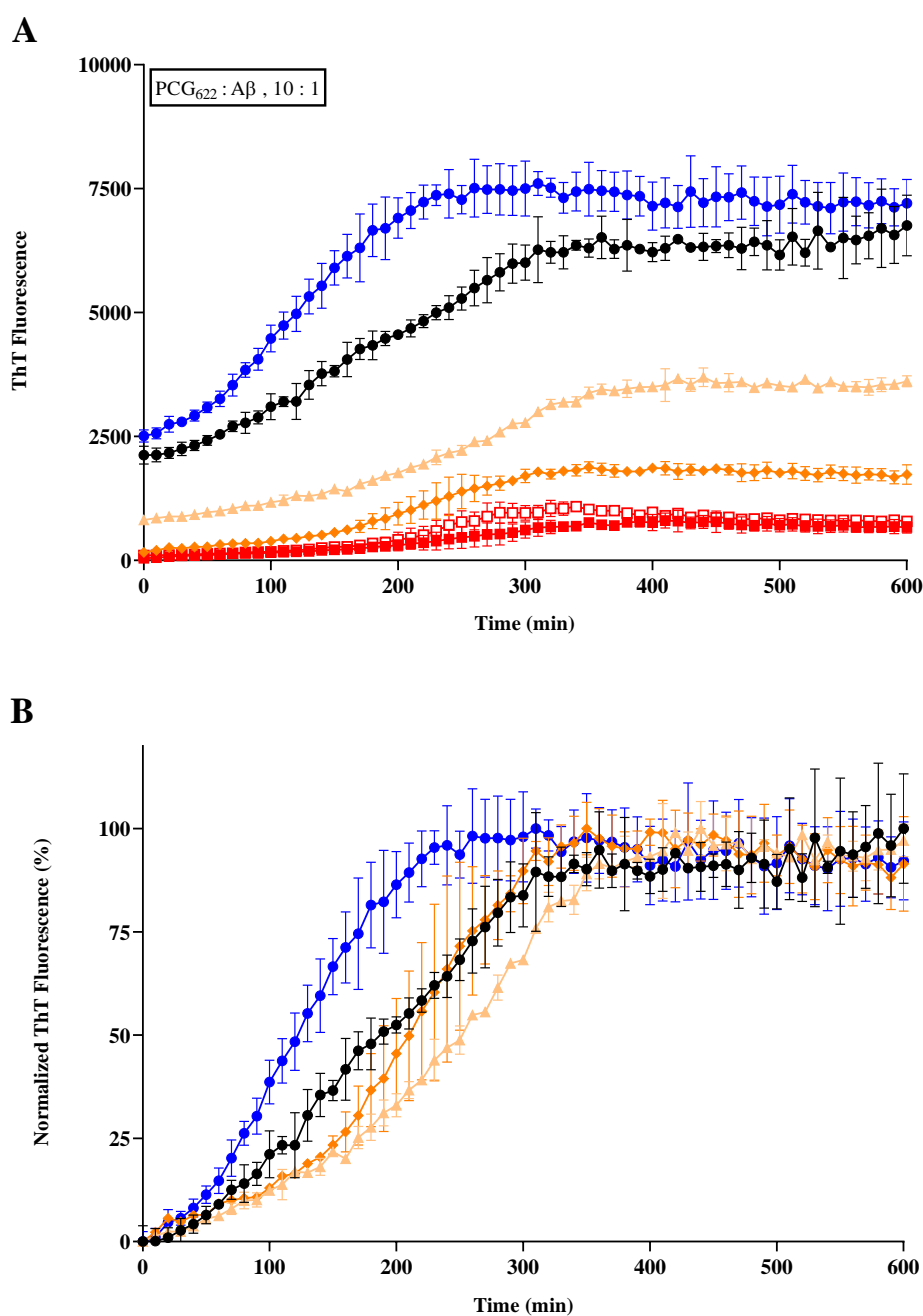


Fig. 42. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for $A\beta_{1-42}$ alone 10 μ M (blue dots), $A\beta_{1-42}$ /MR32741 100 μ M (empty red squares), $A\beta_{1-42}$ /PCG₆₂₂-based LUVs 100 μ M (dark dots), $A\beta_{1-42}$ /PCG₆₂₂-based LUVs and MR32741 1 μ M (beige triangles), 10 μ M (orange diamonds), or 100 μ M (filled red squares) and plotted as **A.** raw data, or **B.** data normalized to the average of maximum steady-state fluorescence intensity values detected for each curve. The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

In the lipids:MR32741:A β molar ratio of 10:10:1, the same concentration-dependent quenching effect observed without liposomes is still present (Fig.42). The PCG₆₂₂-based LUVs do not show a strong interference with the effect of MR32741 on A β ₁₋₄₂ aggregation. However, kinetically, the delay of fibrillation corresponding to an increase of the nucleation phase, is associated with a modification of the curve slope of the kinetic. This result indicates a probable diminution of the elongation rate due to the interaction of the molecule with intermediate species.

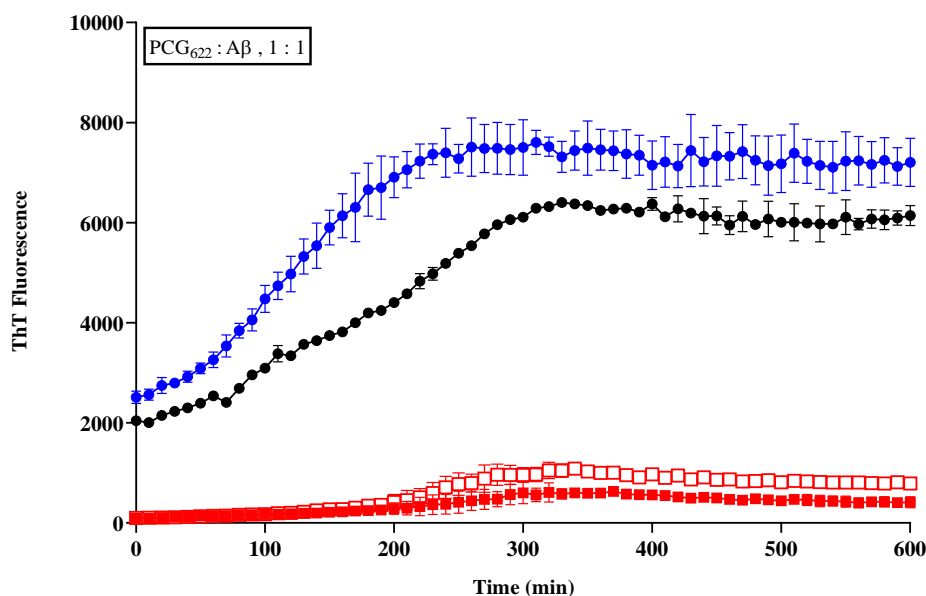


Fig. 43. Kinetics of ThT fluorescence (20 μ M) monitored for A β ₁₋₄₂ alone 10 μ M (blue dots), A β ₁₋₄₂/indomethacin 1 mM (empty red squares), A β ₁₋₄₂/PCG₆₂₂-based LUVs 10 μ M (dark dots) and A β ₁₋₄₂/PCG₆₂₂-based LUVs/indomethacin 1 mM (filled red squares). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

In the lipids:MR32741:A β molar ratio of 1:10:1, no change is observed concerning the MR32741 effect on the A β ₁₋₄₂ (Fig. 43). As in the case of chicago sky blue, fluorescence quenching precludes the ability to carry out a study using the ThT fluorescence monitoring method. We therefore chose to take advantage of the approaches already implemented on the oligomer in order to investigate the effects of the molecule.

3.6.3. Characterization of the MR32741-oG37C interactions

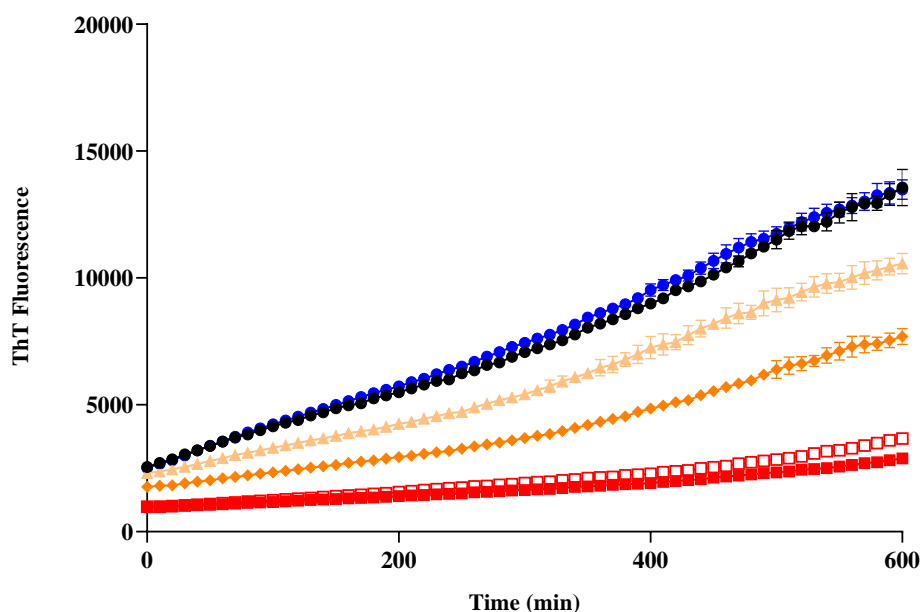


Fig. 44. Kinetics of ThT fluorescence (20 μM) monitored for oG37C alone 10 μM (blue dots), for oG37C/MR32741 100 μM (empty red squares), oG37C/PCG₂₂₆-based LUVs 100 μM (dark dots), oG37C/PCG₂₂₆-based LUVs/MR32741 1 μM (beige triangles), 10 μM (orange diamonds), or 100 μM (filled red squares). The error bars represent the standard deviation of 3 samples.

As observed previously, there is a decrease in the concentration-dependent signal, but we can't discriminate any effect from the ThT fluorescence quenching by MR32741 (Fig. 44). The ATR-FTIR experiments will allow to objectify the effects of MR32741 on the oG37C conformation.

Table 9. Relative abundance of each secondary structure after deconvolution of ATR-FTIR amide I band monitored after incubation at 25°C overnight of oG37C (50 μM) alone, or mixed with MR32741 (500 μM).

	Center (cm^{-1})	Assignment	oG37C	oG37C + MR32741	oG37C + PCG ₂₂₆	oG37C + PCG ₂₂₆ + MR32741
Relative	1628	β -sheet	45.8	65.7	33.6	52.3
abundance	1679	anti// β	9.3	6.7	8.8	0.0
(%)	1652	α / random	44.9	27.6	57.6	47.7

The presence of MR32741 induces an important decrease in the α / random conformation (-17%), and in parallel, an important increase of the β -sheet conformation (+ 20 %) (Table 9). Moreover, a slight decrease in anti-parallel β -sheet conformation (~ 3 %) is shown.

In presence of both MR32741 and PCG₂₂₆-based LUVs (oG37C:lipids ratio of 1:1), similar effects are observed but in different proportions: the decrease in the α / random conformation is less important (- 10%) whereas the increase in β -sheet conformation is higher (+ 19 %). Moreover, there is no signal assigned to anti-parallel β -sheet conformation anymore.

Table 10. Granulometric measurements of LUVs made of PCG₂₂₆ (10 μ M), expressed in terms of diameter by volume (nm), peak percentage of each population and PdI, determined immediately after formulation, or after incubation at 25°C for 24h, alone, or in presence of MR32741 (1, 10 and 100 μ M) or/and oG37C (10 μ M).

Interactome	Ø 1 (nm)	%	Ø 2 (nm)	%	Ø 3 (nm)	%	PdI
PCG₂₂₆, t₀	135.5 ± 1.3	100 ± 0.0					0.051 ± 0.016
PCG₂₂₆, t₂₄	141.6 ± 0.8	100 ± 0.0					0.071 ± 0.008
PCG₂₂₆, t₂₄+MR1	149.9 ± 1.2	100 ± 0.0					0.060 ± 0.031
PCG₂₂₆, t₂₄+MR10	155.5 ± 0.2	100 ± 0.0					0.046 ± 0.020
PCG₂₂₆, t₂₄+MR100	165.4 ± 3.1	100 ± 0.0					0.134 ± 0.016
PCG₂₂₆, t₂₄ + oG37C	176.8 ± 16.3	23.6 ± 3.6	1524.3 ± 237.5	73.1 ± 5.2	3205.3 ± 2782.7	3.4 ± 3.4	0.778 ± 0.024
PCG₂₂₆, t₂₄+oG37C+MR1	118.5 ± 86.8	14.4 ± 7.2	978.6 ± 777.3	56.4 ± 38.2	2026.7 ± 2474.3	28.1 ± 43.5	0.554 ± 0.042
PCG₂₂₆, t₂₄+oG37C+MR10	103.4 ± 41.5	13.9 ± 0.8	579.3 ± 579.2	38.6 ± 35.9	3034.0 ± 1724.7	47.6 ± 35.2	0.864 ± 0.027
PCG₂₂₆, t₂₄+oG37C+MR100	46.8 ± 5.0	37.1 ± 4.9	256.0 ± 45.7	20.7 ± 3.7	1380.3 ± 242.5	37.1 ± 12.8	0.487 ± 0.025

The CF leakage experiment (Fig. 39) did not showed any significant difference of leakage between oG37C (~ 10 %) alone and in presence of 1 μ M (~ 10 %) and 10 μ M (~ 8 %) of MR32741. At the highest concentration (100 μ M), a higher CF leakage is observed compared to the incubation of the peptide alone. This result is probably due to the intrinsic toxicity of the molecule combined with that of the peptide: the total leakage value (~ 20%) could be the result of the addition of both effects (~10 % for both).

DLS experiments (Table 10) also showed total membrane destabilization in the presence of oG37C and MR32741, whatever the concentration tested. It is interesting to note that for the highest concentration (100 μM), we also observe the formation of a population characterized by a smaller diameter (~ 47 nm), as it was the case for indomethacin.

3.6.4. MR32741 results discussion

From these results, MR32741 is able to interact and remain anchored within membranes, modifying their stiffness, and their rigidity. Such an integration leads to a reorganization of the LUVs when it is used at a concentration of 100 μM . It is not a detergent effect since LUVs remain intact whereas they become able to release CF, probably because of local membrane reorganization through pore formation. The different experiments carried out in ThT fluorescence monitoring on this compound demonstrated once again that a screening approach only based on this methodology would not be appropriate. Even if MR32741 is able to change oG37C conformation and $\text{A}\beta_{1-42}$ aggregation kinetics, no protecting effect against oligomer membrane toxicity would have been highlighted. It can still be emphasized that this compound has shown effects similar to the known compounds treated with the developed assay. Like *o*-vanillin, this compound decreased the anti-parallel β -sheet contribution of our oligomeric model. Like indomethacin, this compound causes a specific rearrangement of liposomes in the presence of oligomers with formation of smaller vesicles ($\sim \text{\O} 50$ nm). However, with this molecule, the organization of the interactome would be different.

One hypothesis could be that MR32741 quickly diffuses and remains inserted within the membrane, and from this reservoir, can continuously interact with the $\text{A}\beta$ peptide, forming small vesicles after disruption of the membrane, and inducing a deep reorganization of the $\text{A}\beta$ peptide.

Although a doubt remains concerning the risk of over interpretation of the ThT fluorescence results, effects of MR32741 on the $\text{A}\beta$ peptide are clearly objectified by our used complementary methods, and maybe, it could be interesting to study the effect of this molecule on the $\text{A}\beta_{1-42}$ peptide with methods that do not depend on fluorimetric detection such as the use of specific antibodies (Necula et al., 2007). It could be the object of further studies to define the plus value of antibodies in our multiparametric approach, enabling the highlighting and the characterization of compounds of potential interest in AD's treatment.

3.7. General discussion

Our main objective was to set up a multiparametric test, using simple approaches adapted to screening, to be able to characterize A β peptide aggregation modulators. The results were correlated from 3 peptide models, a commercial version obtained by chemical synthesis included in a kit, a commercial recombinant version and an oligomer model.

The kit is intended to ensure the good reproducibility of the aggregation and highlight an inhibition capacity of the molecules. However, it seems that the use of low molecule concentration which is usual in the field of screening does not allow to work with an adapted peptide/molecule ratio. In fact, the same effects are not necessarily observed between the use of the kit and the peptide incubated alone. The compounds selected for this study showed various effects on A β aggregation.

The CSB, *o*-vanillin and MR32741 exhibited interesting effects on the A β peptide like the diminution of the anti-parallel β -sheet contribution and even a protective effect on the liposomes (CSB). Other compounds have demonstrated singular effects such as the activation of fibrillation by indomethacin or an increase in membrane toxicity in the case of bexarotene (Fig. 45). In some cases, these results could remain questionable because of the bias provided by the fluorescence (quenching cases) or relevance of the chosen models. However, the use of a multiparametric assay as we proposed can correct these doubts.

In a new compound screening approach, such results will provide valuable data on the molecule effects to sort the molecules potentially interesting, toxic or subject to artifacts during analyses. The use of liposomes in the early screening of modulators of aggregation of amyloid peptide proves to be a major asset for drug discovery. The reproducibility of the liposomes production, their stability, the possibility to work on a small scale, to modulate the experimental conditions and the low cost associated (Akbarzadeh et al., 2013) make liposomes an undeniable tool for this type of approach. Liposomes versatility makes it possible to use them *via* different approaches making it possible not only to study the interactions between the membrane and the compounds which is essential for drug characterization (Ribeiro et al., 2010) but also the interactions with the peptide.

Being able to combine approaches like LLA to study peptide/membranes, molecule/membranes and peptide/molecule/membranes interactions is a major advantage for a screening approach. The A β peptide self-aggregation kinetic assay performed by ThT fluorescence monitoring is essential to characterized, although, in some cases, precautions must be taken in interpreting the results if compounds interfere or quench the ThT fluorescence.

It was for example the case with chicao sky blue and MR32741. Then, it is possible to use other further methods to avoid this kind of issues. Necula *et al.* (2007) proposed the use of specific antibodies. If they were applied alone, they would not allow studying the kinetic aspect of the contribution of membrane to the interactome. Because of their cost, and the need to develop and use yet another test, they could be put only in some ambiguous cases. Heavier methodologies like electronic or atomic force microscopy appear not really suitable for screening many compounds.

It therefore seems more interesting to propose our multiparametric approach for early screening, and add some methodologies to confirm effects on emerging hits. Obviously, the effects on A β of the molecules that we studied need to be further assessed by *in vitro* cellular tests to confirm the relevance of our approach. It may be mentioned, that for example, the highlighted protective effect of CSB on A β was already objectified by *in vitro* cellular assays (Pollack et al., 1995), making our results very encouraging.

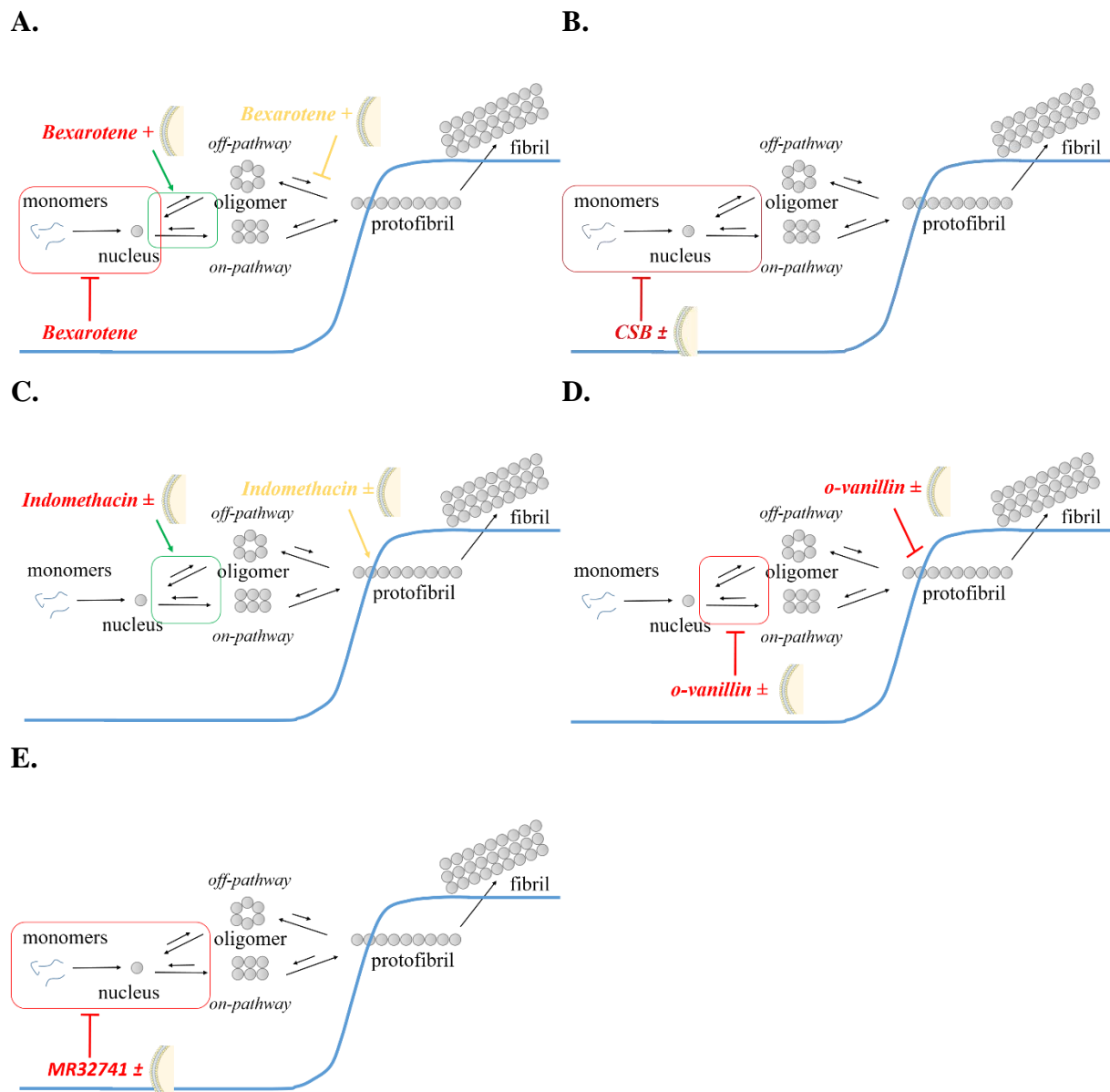


Fig. 45. Proposal schematic representation of the effects of the studied molecules on A β , in presence of LUVs, highlighted from the results of the present study.

4. Conclusion

After selection of 6 molecules with potentially different effects on A β peptide, we developed a simple and rapid test adapted to the early screening of new compounds, and established its interest to screen and identify original leads for the potential treatment of AD. The use of methods such those we propose, mainly based on spectroscopy and spectrophotometry, permit to work with small product quantities, which is indispensable at the drug discovery level. They permit to obtain crucial experimental data in order to describe an interactome between the molecules, the peptide and the membranes. It appears also that it is already possible to differentiate action mechanisms of molecules in the absence or in the presence of membranes, confirming the need of the LUVs introduction in the drug characterization assays. Such a physico-chemical approach well adapted to the drug discovery proves to be an undeniable asset for the rapid characterization of compounds of therapeutic interest for Alzheimer's disease.

References associated with this article

- Abuhamdah, S., Thalji, D., Abuirmeile, N., Bahnassi, A., Salahat, I., Abuirmeile, A., 2017. Behavioral and Neurochemical Alterations Induced by Vanillin in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Int. J. Pharmacol.* 13, 573–582.
- Afshar, P., Vahedi, L., Rouhanizadeh, H., 2018. A comparison of conventional rapid methods in diagnosis of superficial and cutaneous mycoses based on KOH, Chicago sky blue 6B and calcofluor white stains. *Iran. J. Microbiol.* 10, 8.
- Agopian, A., Guo, Z., 2012. Structural origin of polymorphism of Alzheimer's amyloid β -fibrils. *Biochem. J.* 447, 43–50.
- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J.I., Van Nostrand, W.E., Smith, S.O., 2010. Structural conversion of neurotoxic amyloid- β 1–42 oligomers to fibrils. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 561–567.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K., 2013b. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* 8, 102.
- Arosio, P., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., Knowles, T.P.J., 2014. Chemical kinetics for drug discovery to combat protein aggregation diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 127–135.
- Arrondo, J.L.R., Muga, A., Castresana, J., Goñi, F.M., 1993. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59, 23–56.
- Ashley, R.H., Harroun, T.A., Hauss, T., Breen, K.C., Bradshaw, J.P., 2006. Autoinsertion of soluble oligomers of Alzheimer's A β (1–42) peptide into cholesterol-containing membranes is accompanied by relocation of the sterol towards the bilayer surface. *BMC Struct. Biol.* 6, 21.
- Attar, A., Rahimi, F., Bitan, G., 2013. Modulators of amyloid protein aggregation and toxicity: EGCG and CLR01. *Transl. Neurosci.* 4.
- Baddireddy, K., Poojary, S., 2019. A Novel Contrast Stain for the Rapid Diagnosis of Dermatophytes: A Cross-Sectional Comparative Study of Chicago Sky Blue 6B Stain, Potassium Hydroxide Mount and Culture. *Indian J. Dermatol.* 64, 311–314.
- Bagatolli, L.A., Gratton, E., 1999. Two-Photon Fluorescence Microscopy Observation of Shape Changes at the Phase Transition in Phospholipid Giant Unilamellar Vesicles. *Biophys. J.* 77, 2090–2101.
- Bangham, A.D., Standish, M.M., Watkins, J.C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238–IN27.
- Bartolini, M., Bertucci, C., Bolognesi, M.L., Cavalli, A., Melchiorre, C., Andrisano, V., 2007. Insight Into the Kinetic of Amyloid β (1–42) Peptide Self-Aggregation: Elucidation of Inhibitors' Mechanism of Action. *ChemBioChem* 8, 2152–2161.
- Beirith, A., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 2002. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.* 924, 219–228.
- Berthelot, K., Cullin, C., Lecomte, S., 2013. What does make an amyloid toxic: Morphology, structure or interaction with membrane? *Biochimie* 95, 12–19.
- Bharadwaj, P.R., Dubey, A.K., Masters, C.L., Martins, R.N., Macreadie, I.G., 2009. A β aggregation and possible implications in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 412–421.
- Biancalana, M., Koide, S., 2010. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1804, 1405–1412.

- Bieschke, J., Herbst, M., Wiglenda, T., Friedrich, R.P., Boeddrich, A., Schiele, F., Kleckers, D., Lopez del Amo, J.M., Grüning, B.A., Wang, Q., Schmidt, M.R., Lurz, R., Anwyll, R., Schnoegl, S., Fändrich, M., Frank, R.F., Reif, B., Günther, S., Walsh, D.M., Wanker, E.E., 2012. Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic β -sheet-rich amyloid fibrils. *Nat. Chem. Biol.* 8, 93–101.
- Bobo, C., Chaignepain, S., Henry, S., Vignaud, H., Améadan, A., Marchal, C., Prado, E., Douch, J., Schmitter, J.-M., Nardin, C., Lecomte, S., Cullin, C., 2017. Synthetic toxic A β 1–42 oligomers can assemble in different morphologies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1861, 1168–1176.
- Boehm, M.F., Zhang, L., Zhi, L., McClurg, M.R., Berger, E., Wagoner, M., Mais, D.E., Suto, C.M., Davies, P.J.A., Heyman, R.A., Nadzan, A.M., 1995. Design and Synthesis of Potent Retinoid X Receptor Selective Ligands That Induce Apoptosis in Leukemia Cells. *J. Med. Chem.* 38, 3146–3155.
- Bonhommeau, S., Talaga, D., Hunel, J., Cullin, C., Lecomte, S., 2017. Tip-Enhanced Raman Spectroscopy to Distinguish Toxic Oligomers from A β 1–42 Fibrils at the Nanometer Scale. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 1771–1774.
- Brites, J., Lúcio, M., Nunes, C., Lima, J.L.F.C., Reis, S., 2010. Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. *Chem. Phys. Lipids* 163, 747–754.
- Brogden, R.N., Goa, K.L., 1997. Adapalene: A Review of its Pharmacological Properties and Clinical Potential in the Management of Mild to Moderate Acne. *Drugs* 53, 511–519.
- Chaibva, M., Gao, X., Jain, P., Campbell, W.A., Frey, S.L., Legleiter, J., 2018. Sphingomyelin and GM1 Influence Huntingtin Binding to, Disruption of, and Aggregation on Lipid Membranes. *ACS Omega* 3, 273–285.
- Cizas, P., Budvytyte, R., Morkuniene, R., Moldovan, R., Broccio, M., Lösche, M., Niaura, G., Valincius, G., Borutaite, V., 2010. Size-dependent neurotoxicity of β -amyloid oligomers. *Arch. Biochem. Biophys.* 496, 84–92.
- Cline, E.N., Bicca, M.A., Viola, K.L., Klein, W.L., 2018. The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J. Alzheimers Dis.* 64, S567–S610.
- Cohen, S.I., Linse, S., Luheshi, L.M., Hellstrand, E., White, D.A., Rajah, L., Otzen, D.E., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., Knowles, T.P., 2013. Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 9758–9763.
- Cramer, P.E., Cirrito, J.R., Wesson, D.W., Lee, C.Y.D., Karlo, J.C., Zinn, A.E., Casali, B.T., Restivo, J.L., Goebel, W.D., James, M.J., Brunden, K.R., Wilson, D.A., Landreth, G.E., 2012. ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models. *Science* 335, 1503–1506.
- Crespo, R., Villar-Alvarez, E., Taboada, P., Rocha, F.A., Damas, A.M., Martins, P.M., 2016. What Can the Kinetics of Amyloid Fibril Formation Tell about Off-pathway Aggregation? *J. Biol. Chem.* 291, 2018–2032.
- Cummings, J.L., Zhong, K., Kinney, J.W., Heaney, C., Moll-Tudla, J., Joshi, A., Pontecorvo, M., Devous, M., Tang, A., Bena, J., 2016. Double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial of bexarotene in moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 8, 4.
- de Jong, D., Jansen, R., Hoefnagels, W., Jellesma-Eggenkamp, M., Verbeek, M., Borm, G., Kremer, B., 2008. No Effect of One-Year Treatment with Indomethacin on Alzheimer's Disease Progression: A Randomized Controlled Trial. *PLoS ONE* 3, e1475.

- Dumery, L., Bourdel, F., Soussan, Y., Fialkowsky, A., Viale, S., Nicolas, P., Reboud-Ravaux, M., 2001. β -Amyloid protein aggregation: its implication in the physiopathology of Alzheimer's disease. *Pathol. Biol.* 49, 72–85.
- Engelke, M., Bojarski, P., Bloß, R., Diehl, H., 2001. Tamoxifen perturbs lipid bilayer order and permeability: comparison of DSC, fluorescence anisotropy, Laurdan generalized polarization and carboxyfluorescein leakage studies. *Biophys. Chem.* 90, 157–173.
- Ewald, M., Henry, S., Lambert, E., Feuillie, C., Bobo, C., Cullin, C., Lecomte, S., Molinari, M., 2019. High speed atomic force microscopy to investigate the interactions between toxic A β ₁₋₄₂ peptides and model membranes in real time: impact of the membrane composition. *Nanoscale* 11, 7229–7238.
- Fantini, J., Di Scala, C., Yahi, N., Troadec, J.-D., Sadelli, K., Chahinian, H., Garmy, N., 2014. Bexarotene Blocks Calcium-Permeable Ion Channels Formed by Neurotoxic Alzheimer's β -Amyloid Peptides. *ACS Chem. Neurosci.* 5, 216–224.
- Fearon, A.D., Stokes, G.Y., 2017. Thermodynamics of Indomethacin Adsorption to Phospholipid Membranes. *J. Phys. Chem. B* 121, 10508–10518.
- Ghiso, J., Frangione, B., 2002. Amyloidosis and Alzheimer's disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 1539–1551.
- Ghosal, K., Haag, M., Verghese, P.B., West, T., Veenstra, T., Braunstein, J.B., Bateman, R.J., Holtzman, D.M., Landreth, G.E., 2016. A randomized controlled study to evaluate the effect of bexarotene on amyloid- β and apolipoprotein E metabolism in healthy subjects. *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* 2, 110–120.
- Gibson Wood, W., Eckert, G.P., Igbavboa, U., Müller, W.E., 2003. Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1610, 281–290.
- Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M., Raussens, V., 2006. Evaluation of the Information Content in Infrared Spectra for Protein Secondary Structure Determination. *Biophys. J.* 90, 2946–2957.
- Gu, L., Tran, J., Jiang, L., Guo, Z., 2016. A new structural model of Alzheimer's A β 42 fibrils based on electron paramagnetic resonance data and Rosetta modeling. *J. Struct. Biol.* 194, 61–67.
- Habchi, J., Arosio, P., Perni, M., Costa, A.R., Yagi-Utsumi, M., Joshi, P., Chia, S., Cohen, S.I.A., Müller, M.B.D., Linse, S., Nollen, E.A.A., Dobson, C.M., Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., 2016. An anticancer drug suppresses the primary nucleation reaction that initiates the production of the toxic A β 42 aggregates linked with Alzheimer's disease. *Sci. Adv.* 2, e1501244.
- Habchi, J., Chia, S., Galvagnion, C., Michaels, T.C.T., Bellaiche, M.M.J., Ruggeri, F.S., Sanguanini, M., Idini, I., Kumita, J.R., Sparr, E., Linse, S., Dobson, C.M., Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., 2018. Cholesterol catalyses A β 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes. *Nat. Chem.* 10, 673–683.
- Habchi, J., Chia, S., Limbocker, R., Mannini, B., Ahn, M., Perni, M., Hansson, O., Arosio, P., Kumita, J.R., Challa, P.K., Cohen, S.I.A., Linse, S., Dobson, C.M., Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., 2017. Systematic development of small molecules to inhibit specific microscopic steps of A β 42 aggregation in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E200–E208.
- He, Z., Yan, L., Yong, Z., Dong, Z., Dong, H., Gong, Z., 2013. Chicago sky blue 6B, a vesicular glutamate transporters inhibitor, attenuates methamphetamine-induced hyperactivity and behavioral sensitization in mice. *Behav. Brain Res.* 239, 172–176.
- Hein, R., Uzundal, C.B., Hennig, A., 2016. Simple and rapid quantification of phospholipids for supramolecular membrane transport assays. *Org. Biomol. Chem.* 14, 2182–2185.

- Henry, S., Vignaud, H., Bobo, C., Decossas, M., Lambert, O., Harte, E., Alves, I.D., Cullin, C., Lecomte, S., 2015. Interaction of A β 1–42 Amyloids with Lipids Promotes “Off-Pathway” Oligomerization and Membrane Damage. *Biomacromolecules* 16, 944–950.
- Hortschansky, P., Schroeckh, V., Christopeit, T., Zandomenighi, G., Fändrich, M., 2005. The aggregation kinetics of Alzheimer’s β -amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. *Protein Sci.* 14, 1753–1759.
- Huy, P.D.Q., Thai, N.Q., Bednarikova, Z., Phuc, L.H., Linh, H.Q., Gazova, Z., Li, M.S., 2017. Bexarotene Does Not Clear Amyloid Beta Plaques but Delays Fibril Growth: Molecular Mechanisms. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 1960–1969.
- Illinger, D., Duportail, G., Mely, Y., Poirel-Morales, N., Gerard, D., Kuhry, J.-G., 1995. A comparison of the fluorescence properties of TMA-DPH as a probe for plasma membrane and for endocytic membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1239, 58–66.
- Jackson, M., Mantsch, H.H., 1995. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 95–120.
- Jimah, J., Schlesinger, P., Tolia, N., 2017. Liposome Disruption Assay to Examine Lytic Properties of Biomolecules. *BIO-Protoc.* 7.
- Jourdan, J.-P., Since, M., El Kihel, L., Lecoutey, C., Corvaisier, S., Legay, R., Sopkova-de Oliveira Santos, J., Cresteil, T., Malzert-Fréon, A., Rochais, C., Dallemagne, P., 2016. Novel benzylidenephénylpyrrolizinones with pleiotropic activities potentially useful in Alzheimer’s disease treatment. *Eur. J. Med. Chem.* 114, 365–379.
- Kamp, F., Scheidt, H.A., Winkler, E., Basset, G., Heinel, H., Hutchison, J.M., LaPointe, L.M., Sanders, C.R., Steiner, H., Huster, D., 2018. Bexarotene Binds to the Amyloid Precursor Protein Transmembrane Domain, Alters Its α -Helical Conformation, and Inhibits γ -Secretase Nonselectively in Liposomes. *ACS Chem. Neurosci.* 9, 1702–1713.
- Kim, J.H., Lee, H.-O., Cho, Y.-J., Kim, J., Chun, J., Choi, J., Lee, Y., Jung, W.H., 2014. A Vanillin Derivative Causes Mitochondrial Dysfunction and Triggers Oxidative Stress in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE* 9, e89122.
- Lakowicz, J.R., 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. Springer US.
- Landau, M., Sawaya, M.R., Faull, K.F., Laganowsky, A., Jiang, L., Sievers, S.A., Liu, J., Barrio, J.R., Eisenberg, D., 2011. Towards a pharmacophore for amyloid. *PLoS Biol.* 9, e1001080.
- Lim, S.-L., Lim, C.S.-H., 2008. New Contrast Stain for the Rapid Diagnosis of Pityriasis Versicolor. *Arch. Dermatol.* 144.
- Limbocker, R., Chia, S., Ruggeri, F.S., Perni, M., Cascella, R., Heller, G.T., Meisl, G., Mannini, B., Habchi, J., Michaels, T.C.T., Challa, P.K., Ahn, M., Casford, S.T., Fernando, N., Xu, C.K., Kloss, N.D., Cohen, S.I.A., Kumita, J.R., Cecchi, C., Zasloff, M., Linse, S., Knowles, T.P.J., Chiti, F., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., 2019. Trodusquemine enhances A β 42 aggregation but suppresses its toxicity by displacing oligomers from cell membranes. *Nat. Commun.* 10, 225.
- Loureiro, Daniela R.P., Soares, J.X., Lopes, D., Macedo, T., Yordanova, D., Jakobtorweihen, S., Nunes, C., Reis, S., Pinto, M.M.M., Afonso, C.M.M., 2018. Accessing lipophilicity of drugs with biomimetic models: A comparative study using liposomes and micelles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 115, 369–380.
- Lucas, S., 2016. The Pharmacology of Indomethacin: Headache. *Headache J. Head Face Pain* 56, 436–446.
- Magalhães, L.M., Nunes, C., Lúcio, M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., 2010a. High-throughput microplate assay for the determination of drug partition coefficients. *Nat. Protoc.* 5, 1823–1830.

- Marton, A., Kúsz, E., Kolozsi, C., Tubak, V., Zagotto, G., Buzás, K., Quintieri, L., Vizler, C., 2016. Vanillin Analogues o-Vanillin and 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde Inhibit NFκB Activation and Suppress Growth of A375 Human Melanoma. *Anticancer Res.* 36, 5743–5750.
- Matsumura, H., Watanabe, K., Ohta, T., 1993. o-Vanillin enhances chromosome aberrations induced by alkylating agents in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res. Toxicol.* 298, 163–168.
- Matsuzaki, K., 2014. How Do Membranes Initiate Alzheimer's Disease? Formation of Toxic Amyloid Fibrils by the Amyloid β-Protein on Ganglioside Clusters. *Acc. Chem. Res.* 47, 2397–2404.
- Miller, L.M., Bourassa, M.W., Smith, R.J., 2013. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828, 2339–2346.
- Morigaki, K., Tanimoto, Y., 2018. Evolution and development of model membranes for physicochemical and functional studies of the membrane lateral heterogeneity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1860, 2012–2017.
- Murphy, M.P., LeVine, H., 2010. Alzheimer's Disease and the Amyloid-β Peptide. *J. Alzheimers Dis.* 19, 311–323.
- Necula, M., Kaye, R., Milton, S., Glabe, C.G., 2007. Small Molecule Inhibitors of Aggregation Indicate That Amyloid β Oligomerization and Fibrillization Pathways Are Independent and Distinct. *J. Biol. Chem.* 282, 10311–10324.
- Normand, A., 2014. Identification and characterization of human Rad51 inhibitors by screening of an existing drug library 8.
- Nunes, C., Brezesinski, G., Lopes, D., Lima, J.L.F.C., Reis, S., Lúcio, M., 2011a. Lipid-Drug Interaction: Biophysical Effects of Tolmetin on Membrane Mimetic Systems of Different Dimensionality. *J. Phys. Chem. B* 115, 12615–12623.
- Nunes, C., Brezesinski, G., Pereira-Leite, C., Lima, J.L.F.C., Reis, S., Lúcio, M., 2011b. NSAIDs Interactions with Membranes: A Biophysical Approach. *Langmuir* 27, 10847–10858.
- Nunes, C., Lopes, D., Pinheiro, M., Pereira-Leite, C., Reis, S., 2013. In Vitro Assessment of NSAIDs-Membrane Interactions: Significance for Pharmacological Actions. *Pharm. Res.* 30, 2097–2107.
- Pham, H.D.Q., Thai, N.Q., Bednarikova, Z., Linh, H.Q., Gazova, Z., Li, M.S., 2018. Bexarotene cannot reduce amyloid beta plaques through inhibition of production of amyloid beta peptides: *in silico* and *in vitro* study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 24329–24338.
- Piskin, S., Uzunali, E., 2007. A review of the use of adapalene for the treatment of acne vulgaris. *Ther. Clin. Risk Manag.* 3, 4(621-624).
- Pollack, S.J., Hawtin, S.R., Taylor, V.J., Shearman, M.S., 1995. Sulfonated dyes attenuate the toxic effects of amyloid in a structure-specific fashion 4.
- Poojari, C., Kukul, A., Strodel, B., 2013. How the amyloid-β peptide and membranes affect each other: An extensive simulation study. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828, 327–339.
- Rangachari, V., Dean, D.N., Rana, P., Vaidya, A., Ghosh, P., 2018a. Cause and consequence of Aβ – Lipid interactions in Alzheimer disease pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1860, 1652–1662.
- Ribeiro, M.M.B., Melo, M.N., Serrano, I.D., Santos, N.C., Castanho, M.A.R.B., 2010. Drug-lipid interaction evaluation: why a 19th century solution? *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 449–454.

- Risse, E., Nicoll, A.J., Taylor, W.A., Wright, D., Badoni, M., Yang, X., Farrow, M.A., Collinge, J., 2015. Identification of a Compound That Disrupts Binding of Amyloid- β to the Prion Protein Using a Novel Fluorescence-based Assay. *J. Biol. Chem.* 290, 17020–17028.
- Roseth, S., Fykse, E.M., Fonnum, F., 2002. Uptake of L-Glutamate into Rat Brain Synaptic Vesicles: Effect of Inhibitors that Bind Specifically to the Glutamate Transporter. *J. Neurochem.* 65, 96–103.
- Santosh Kumar, S., Priyadarsini, K.I., Sainis, K.B., 2002. Free radical scavenging activity of vanillin and *o*-vanillin using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. *Redox Rep.* 7, 35–40.
- Šarić, A. Jela, Chebaro, Y.C., Knowles, T.P., Frenkel, D., 2014. Crucial role of nonspecific interactions in amyloid nucleation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 17869–17874.
- Sarroukh, R., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M., Raussens, V., 2013. ATR-FTIR: A “rejuvenated” tool to investigate amyloid proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828, 2328–2338.
- Sengupta, U., Nilson, A.N., Kayed, R., 2016. The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine* 6, 42–49.
- Severcan, M., Haris, P.I., Severcan, F., 2004. Using artificially generated spectral data to improve protein secondary structure prediction from Fourier transform infrared spectra of proteins. *Anal. Biochem.* 332, 238–244.
- Smeralda, W., Since, M., Corvaisier, S., Legay, R., Voisin-Chiret, A.-S., Malzert-Freon, A., 2019. Microplate assay for lipophilicity determination using intrinsic fluorescence of drugs: Application to a promising anticancer lead, pyridoclox. *Eur. J. Pharm. Sci.* 131, 75–83.
- Stefani, M., Rigacci, S., 2013. Protein Folding and Aggregation into Amyloid: The Interference by Natural Phenolic Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 12411–12457.
- Stein, H., Spindler, S., Bonakdar, N., Wang, C., Sandoghdar, V., 2017. Production of Isolated Giant Unilamellar Vesicles under High Salt Concentrations. *Front. Physiol.* 8.
- Terzi, E., Hölzemann, G., Seelig, J., 1997. Interaction of Alzheimer β -Amyloid Peptide(1–40) with Lipid Membranes [†]. *Biochemistry* 36, 14845–14852.
- Tetko, I.V., Tanchuk, V.Yu., Kasheva, T.N., Villa, A.E.P., 2001. Estimation of Aqueous Solubility of Chemical Compounds Using E-State Indices. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41, 1488–1493.
- Tousi, B., 2015. The emerging role of bexarotene in the treatment of Alzheimer’s disease: current evidence. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 311.
- Vestergaard, M., Hamada, T., Morita, M., Takagi, M., 2010. Cholesterol, lipids, amyloid Beta, and Alzheimer’s. *Curr. Alzheimer Res.* 7, 262–270.
- Vignaud, H., Bobo, C., Lascu, I., Sörgjerd, K.M., Zako, T., Maeda, M., Salin, B., Lecomte, S., Cullin, C., 2013. A Structure-Toxicity Study of A β 42 Reveals a New Anti-Parallel Aggregation Pathway. *PLoS ONE* 8, e80262.
- Vivoli Vega, M., Cascella, R., Chen, S.W., Fusco, G., De Simone, A., Dobson, C.M., Cecchi, C., Chiti, F., 2019. The Toxicity of Misfolded Protein Oligomers Is Independent of Their Secondary Structure. *ACS Chem. Biol.* 14, 1593–1600.
- Weinstein, J.N., Blumenthal, R., Klausner, R.D., 1986. [38] Carboxyfluorescein leakage assay for lipoprotein-liposome interaction. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 657–668.
- Williams, T.L., Serpell, L.C., 2011. Membrane and surface interactions of Alzheimer’s A β peptide - insights into the mechanism of cytotoxicity: Membrane interactions of Alzheimer’s A β peptide. *FEBS J.* 278, 3905–3917.

Zhou, Y., Plowman, S.J., Lichtenberger, L.M., Hancock, J.F., 2010. The Anti-inflammatory Drug Indomethacin Alters Nanoclustering in Synthetic and Cell Plasma Membranes. *J. Biol. Chem.* 285, 35188–35195.

Supplementary Information

Attenuated Total Reflectance –Fourier Transform InfraRed spectroscopy spectra fitting

After blank subtraction, water signal is removed by FFT filtering (Fast Fourier Transform, Fig. S1.A). A low-pass filter is applied to eliminate all frequencies above the cutting value. By choosing carefully the cutting frequency with a large difference with the one of signal prevent spectrum distortion. The resulting spectrum is subsequently processed by applying a multiple peak fit using the Voigt function on the amide band I (1700-1600 cm^{-1}) (Fig. S1. B). Considering that the peak of the α -Helix (1660-1648 cm^{-1}) contribution and the peak of the unordered contribution (1648-1640 cm^{-1}) often overlap we decided to assign a single peak for both (Jackson and Mantsch, 1995; Miller et al., 2013; Sarroukh et al., 2013).

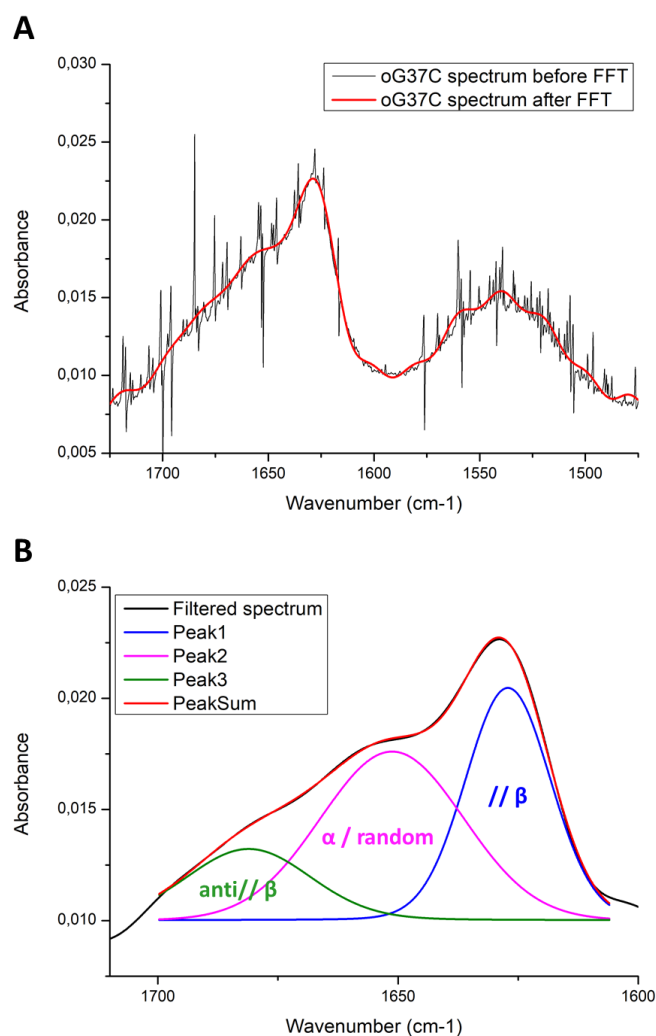


Fig. S1. A. ATR-FTIR spectrum FFT filtration using a low band pass **B.** Multiple peak fit of amide band I spectrum using the Voigt function.

4. DISCUSSION GENERALE

4.1 Objectif 1 : Etude des interactions molécules/membranes

Le premier axe développé est la caractérisation des interactions molécules/membranes. Dans ce cadre, notre premier travail a été la mise au point d'une **méthode expérimentale de détermination du coefficient de partage en présence de liposomes**. Ce coefficient sert à évaluer la lipophilie des composés qui est un paramètre crucial dans le développement de nouvelles molécules. En effet, ce paramètre influant directement les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, il paraissait essentiel de pouvoir le déterminer expérimentalement, de façon précoce, au cours du processus de développement du médicament.

Notre étude a tout d'abord cherché à transposer et optimiser les aspects techniques d'une méthode existante. Initialement développé par Magalhaes, *et al.* (2010),¹³⁶ le protocole était déjà miniaturisé et se basait principalement sur un mode de détection simple, la spectroscopie UV-visible. Ce protocole était donc adapté à la démarche de drug discovery de par son mode de détection et par la quantité réduite de produits utilisés. La détermination du coefficient de partage est un paramètre essentiel, notamment pour les composés nouveaux, généralement produits à l'échelle de quelques milligrammes lors des premières étapes de développement. L'utilisation de méthodes de détection comme la spectrophotométrie permet notamment de ne pas être soumis aux contraintes techniques qu'entraînent les méthodes de séparations physiques telles que la chromatographie ou la dialyse entre les différentes phases.¹⁸²

Afin de pouvoir appliquer ce test en routine, il est essentiel de pouvoir normaliser les données entre elles et donc d'avoir des points de contrôles qualitatifs et quantitatifs. La méthodologie repose sur la titration du composé à concentration fixe en présence d'une concentration croissante de lipides. La méthode de production des liposomes, la réhydratation des films lipidiques expose l'expérimentateur à de nombreuses pertes pouvant impacter la quantité de lipides présente dans l'échantillon final : solubilisation des lipides, séchage du film, perte lors de l'extrusion et de façon évidente la dilution lorsqu'une étape de chromatographie est nécessaire (encapsulation de la carboxyfluoresceine pour les expériences de *liposome leakage assay*).¹⁸³ Il était donc primordial de disposer d'une méthode de dosage rapide et précise afin de maîtriser la concentration lipidique lors des expériences.

II-4. DISCUSSION GENERALE

La méthode classiquement utilisée est le dosage phosphate, elle repose sur la réaction des ions phosphates (PO_4^{3-}) en milieu acide avec le molybdate d'ammonium pour former un complexe phosphomolybdique de couleur bleue après réduction par l'acide ascorbique. Un dosage par spectrophotométrie (720 nm) est par la suite réalisé en utilisant une courbe d'étalonnage obtenue à partir d'une gamme étalon. L'absorbance de l'analyte est mesurée afin de déterminer sa concentration en ions phosphate par comparaison avec la courbe d'étalonnage.²²² Cette méthode reste chronophage et complexe et peut être difficilement envisagée en routine pour du screening à haut débit. Hein, *et al.* (2016)¹⁸⁵ ont développé un **protocole de dosage par RMN** que nous avons utilisé en routine.

Cet aspect novateur nous permet de bénéficier d'une méthodologie rapide (pas de gamme à préparer), précise et pouvant s'adapter à des compositions liposomales simples et complexes grâce à la possibilité de doser par rapport aux groupements méthyles des chaînes d'acides gras mais aussi, de façon tout à fait originale, par rapport au C18, du cholestérol (cf chapitre IV). Il peut être noté que nous avons tout de même apporté une modification avec le fait de chauffer à 50°C les échantillons contenant du cholestérol car nous avons observé une légère précipitation de celui-ci à température ambiante dans le méthanol deutéré.

Pour optimiser la méthodologie du **traitement de données**, un fichier excel a été créé afin d'obtenir les concentrations en lipides des préparations en rentrant simplement les valeurs d'intensité obtenues après traitement du spectre ^1H (Figure 38). Celui-ci permet d'obtenir la concentration quelles que soient les proportions utilisées, que ce soit pour des préparations en ratio massique, molaire ou à partir de solutions lipidiques. Il peut donc être facilement pris en main par tout formulateur de liposomes soucieux de vérifier la composition de ses membranes avant leur utilisation.

II-4. DISCUSSION GENERALE

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Step 1: calcul des concentrations théoriques					Liste de PL non exhaustive						
2						Source MW : Lipoid (sauf Chol)						
3	masse pesée (mg)	MW (g.mol-1)	Vol (L)	Lipid (%)	C _{théo} (mM) Tot		Name	Data MW (g.mol-1)		Name	Data MW (g.mol-1)	
4				100	#VALEUR!		Cholestérol	386.66		DPPE	630	
5	masse pesée (mg)	MW (g.mol-1)	Vol (L)	Lipid (%)	C _{théo} (mM) Tot		EPC	775		DPPG	745	
6				100	#VALEUR!		EPE	733		DSPA	664	
7							EPG	785		DSPC	790	
8	masse pesée (mg)	MW (g.mol-1)	Vol (L)	Lipid (%)	C _{théo} (mM) Tot		DLPC	622		DSPF	748	
9				100	#VALEUR!		DMPC	678		DSPG	801	
10							DMPE	636		POPC	760	
11							DMPG	888		POPG	766	
12							DOPC	787		SPA	723	
13	NB: en dehors du cholestérol ce calculateur ne peut s'utiliser qu'avec des phospholipides (2 chaînes d'AG)						DOPE	744		SPC	786	
14	Step 2: concentration mesurée par dosage RMN						DOPG	797		SPE	744	
15							DPPA	671		SPG	797	
16							DPPC	734				
17	Pour 1 ou plusieurs PL											
18	PL (%)	C _{théo} (mM) Tot	I _{max} RMN	C _{mes} (mM) Tot	% différence							
19				#VALEUR!	#VALEUR!							
20												
21	Pour 1 ou plusieurs PL en présence de Chol											
22	PL (% molaire)	CHOL (% molaire)	C _{théo} (mM) Tot	I _{max} RMN	C _{mes} (mM) Tot	% différence	C _{théo} (mM) Chol	I _{max} RMN	C _{mes} (mM) Chol	% différence	C Tot (mM) déduite	
23					#VALEUR!	#VALEUR!			#VALEUR!	#VALEUR!	#VALEUR!	
24												
25	Pour 1 PL en présence de Chol (travail en masse)											
26	m pesée PL (mg)	(mg)	MW (g.mol-1) PL	MW (g.mol-1) Chol								
27				386.66								
28	PL (% molaire)	CHOL (% molaire)	C _{théo} (mM) Tot	I _{max} RMN	C _{mes} (mM) Tot	% différence	C _{théo} (mM) Chol	I _{max} RMN	C _{mes} (mM) Chol	% différence	C Tot (mM) déduite	
29	#VALEUR!	#VALEUR!			#VALEUR!	#VALEUR!			#VALEUR!	#VALEUR!	#VALEUR!	
30												
31	Pour 2 PL en présence de Chol (travail en masse)											
32	m pesée PL1 (mg)	m pesée PL2 (mg)	(mg)	MW (g.mol-1) PL1	MW (g.mol-1) PL2	MW (g.mol-1) Chol						
33						386.66						
34	PL1 (% molaire)	PL2 (% molaire)	CHOL (% molaire)	C _{théo} (mM) Tot	I _{max} RMN	C _{mes} (mM) Tot	% différence	C _{théo} (mM) Chol	I _{max} RMN	C _{mes} (mM) Chol	% différence	C Tot (mM) déduite
35	#VALEUR!	#VALEUR!	#VALEUR!			#VALEUR!	#VALEUR!			#VALEUR!	#VALEUR!	#VALEUR!

Figure 38. Fichier de calcul des concentrations lipidiques après dosage RMN

La comparaison des données obtenues sur des molécules standard en utilisant les liposomes avec celles obtenues par l'utilisation du modèle *n*-octanol/eau classique montre un grand écart pour certaines molécules. L'utilisation de liposomes a permis de prendre en compte des interactions électrostatiques entre les molécules et les membranes. Les différences entre le log $D_{7,4}$ prédit et le log K_p mesuré avec des LUVs de phosphatidylcholine ont été plus importantes pour les molécules ionisées à l'exemple de l'indométacine avec un log $D_{7,4}$ de 0,68 et le log K_p de 3,09. Nous avons pu également étudier les effets d'autres paramètres tels que la température de transition de phase avec l'utilisation du DPPC et la composition en acides gras avec l'utilisation de l'EPC pour constater que ceux-ci pouvaient également influencer de façon plus ou moins importante les interactions entre le pyridoclast et les membranes. Ces données montrent que l'expression de la lipophilie brute par les coefficients de partage déterminés de façon classique (prédiction ou utilisation du système *n*-octanol/eau), bien qu'essentielles, ne suffisent pas à prédire le comportement que certains composés peuvent adopter vis-à-vis des membranes biologiques.

La plupart des molécules développées et mises sur le marché sont des molécules ionisables.¹⁸³ L'utilisation de ce type d'approche doit devenir, à notre sens, une procédure systématique afin de compléter les banques de données incluant le coefficient de partage classique par celui déterminé à l'aide de liposomes. Cela pourrait permettre de grandement améliorer la compréhension du devenir des principes actifs dans l'organisme et *in fine* d'optimiser la démarche de Drug design s'il est déterminé précocement.

Un des principaux apports de notre travail a été le fait d'utiliser la fluorescence intrinsèque du pyridoclast afin de confirmer les résultats obtenus en spectroscopie UV-visible.¹⁸³ En effet, l'utilisation de la spectrophotométrie de fluorescence fournit une méthode alternative de détection plus sensible ne nécessitant pas de transformation mathématique importante (*vs* dérivée seconde en UV-visible). Cela peut non seulement s'appliquer aux composés bénéficiant d'une fluorescence intrinsèque comme le pyridoclast mais aussi à des composés qui ne fluorescent pas *via* l'utilisation de sondes.¹⁸²

Tous ces aspects permettent d'obtenir une **méthodologie innovante et robuste pour la détermination du coefficient de partage dans une approche de screening de composés nouveaux.**

Les méthodes basées sur l'utilisation de vésicules lipidiques permettent aussi de choisir la composition lipidique ce qui peut être un aspect capital pour l'étude des interactions avec les membranes. En appliquant ce procédé à un lead, le pyridoclast, nous avons notamment pu démontrer que la présence de cholestérol, connu pour jouer un rôle important dans les membranes biologiques, avait un impact sur la capacité de ce composé à interagir avec les membranes. Sans modifier significativement le K_p , l'introduction du cholestérol a notamment permis de grandement diminuer la déstabilisation membranaire qu'entraînait le pyridoclast sur les membranes de liposomes. Par cette évaluation de la perméabilisation membranaire utilisant le quenching de fluorescence, il devient alors possible de caractériser l'effet de la molécule sur la membrane, voire d'évaluer sa toxicité membranaire. Cela implique clairement la nécessité de pouvoir contrôler la composition des membranes lorsque des paramètres tels que la **toxicité membranaire** des composés devra être évaluée.

Enfin, les liposomes peuvent également offrir des applications plus complexes avec notamment la possibilité d'inclure des transporteurs ou des récepteurs au sein des bicouches afin d'avoir des indications encore plus fines sur les interactions qui seront en jeu une fois le composé absorbé dans l'organisme.

Pour aller plus loin, il faut également avoir conscience que les échecs dans le développement d'un médicament peuvent s'expliquer par l'inadéquation des tests *in vitro* ou des modèles animaux utilisés pour imiter les processus physiologiques chez l'homme.

Des technologies innovantes, sensibles et rapides comme celle développée dans le premier axe de ce projet de thèse, capables d'analyser plusieurs candidats-médicaments doivent être adoptées. De plus, il y a un besoin de normalisation dans l'industrie pharmaceutique afin d'utiliser des paramètres universels auxquels tous les chercheurs et techniciens pourront se référer. Cette stratégie s'intègre parfaitement dans la stratégie des 3R (*Replace, Reduce, Refine*) visant à diminuer les tests sur animaux, notamment vis-à-vis du point de vue éthique qui de nos jours est devenu plus que jamais un point majeur dans la recherche scientifique.

Cette évaluation des interactions molécule/membrane représente le premier volet d'un protocole plus global qui a pour but de décrire l'interactome molécule/membrane/peptide A β . Les résultats décrivant les interactions entre des composés modulateurs du processus d'agrégation du peptide avec les membranes ont pu servir de premier contrôle qui a permis d'expliquer les résultats obtenus avec les trois acteurs de l'interactome.

4.2 Objectif 2 : Etude des interactions peptide A β /membranes

4.2.1 Approches méthodologiques

Production et traitement du peptide A β_{1-42}

Le second contrôle a été obtenu par la description des interactions membranes/A β peptide. Pour cela, il a fallu dans un premier temps définir les conditions opératoires permettant la mise en solution à l'état monomérique du peptide afin de pouvoir objectiver ensuite les différentes étapes de son agrégation. Cette mise au point s'est réalisée en utilisant préalablement un peptide obtenu par synthèse chimique fourni par Anaspec (AS-20276). Le protocole fourni par le commerçant stipulait que les étapes à suivre étaient les suivantes :

- ajout 1,0% NH₄OH directement sur le lyophilisat de peptide (35-40 μ L pour 0,5 mg de peptide), qui permet de bien solubiliser le peptide mais aussi de garantir sa monomérisation²²³
- mélange par vortex.

Toutefois, les essais réalisés après ce protocole ont conduit à un peptide qui s'était déjà agrégé. Nous avons donc inclus une étape de traitement au 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), solvant communément utilisé dans la littérature pour solubiliser les peptides et pour monomériser les agrégats de protéines structurées en feuillets β .^{224,225}

II-4. DISCUSSION GENERALE

Les essais ont été concluants car nous avons pu obtenir des cinétiques en ThT, avec des courbes sigmoïdales reproductibles, présentant les phases attendues pour l'agrégation du peptide : nucléation, élongation et plateau (Figure 39).

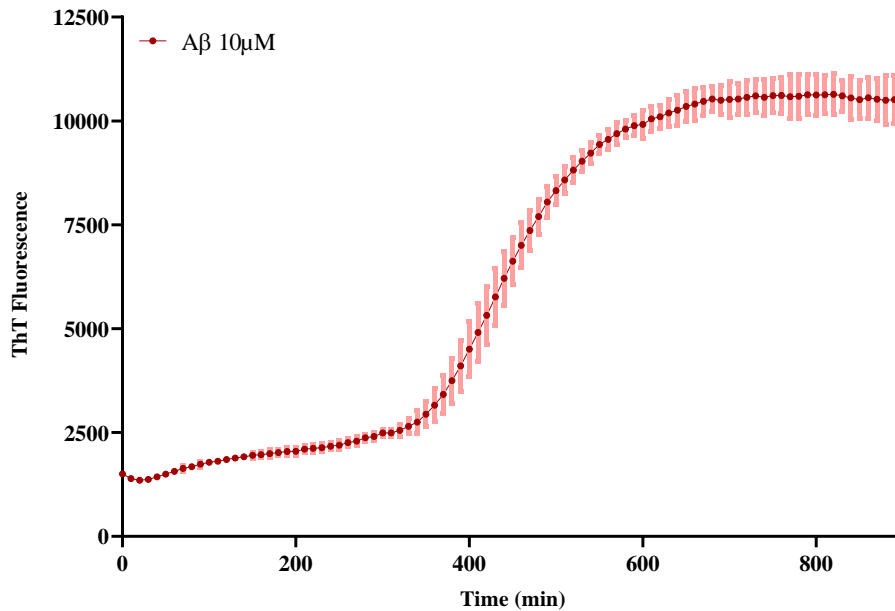


Figure 39. Suivi cinétique de l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ (Anaspec[®])

La cinétique est obtenue après incubation à 25°C, dans du PBS pH 7,4 avec 10 μM de peptide. La température a été fixée à 25°C afin de ralentir le processus et de pouvoir observer les différentes phases d'agrégation, en particulier, l'étape de nucléation. Après avoir effectué des contrôles en fin d'expérience, nous nous sommes rendus compte que le pH des échantillons était très basique (entre 10 et 11) et que cela était dû à l'utilisation de l'ammoniaque (NH₄OH) pour la solubilisation du peptide. L'utilisation de tampon PBS plus concentré (5 ou 10 fois) afin de compenser la charge basique et la préparation de solutions peptidiques plus concentrées n'ont pas permis de ramener le pH à 7,4. Nous avons donc décidé d'abaisser le pH du tampon utilisé pour sa solubilisation afin de compenser avec la basicité du NH₄OH. Fixer la valeur du tampon PBS à 6,30 nous a permis d'obtenir un pH final d'environ 7,4 en microplaque.

Une fois ce souci réglé, des premières expériences de caractérisation des interactions peptide/molécules ont été entreprises.

Toutefois, nous nous sommes heurtés à un nouveau problème : suite à un changement de lot de la part du fournisseur, le peptide traité et utilisé dans nos conditions habituelles ne s'agrègeait plus.

II-4. DISCUSSION GENERALE

Après avoir vérifié toutes les étapes du protocole et essayé différentes solutions (préparation de solutions neuves, changement de lots pour les différents éléments inclus dans le protocole), des expériences complémentaires ont été réalisées afin d'élucider le problème. Nous avons réalisé des analyses en spectrométrie de masse (MS/MS) afin de vérifier qu'il n'y avait pas de protéolyse (résultats non montrés).

Dans le cadre d'une collaboration avec le CBMN à Bordeaux (Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets), nous avons pu réaliser des expériences de micro-fluidique afin de mesurer la taille des espèces présentes après le traitement peptidique. Ces expériences ont été faites à l'aide du système Fluidity One (nommé comme étant une des dix meilleures innovations en 2018 par *The Scientist*), développé par Fluidic Analytics (Cambridge, Royaume-Unis), permettant de mesurer la taille et la concentration des protéines dans leur état naturel, sans utiliser de surfaces ou de matrices.²²⁶ Le principe repose sur la mesure du coefficient de diffusion de la protéine étudiée. Les résultats ont montré que le peptide après traitement avait un rayon hydrodynamique d'environ 611 pm alors que la taille attendue pour les monomères est d'environ 1,5 nm (résultats non montrés). Ces données indiquaient un repliement important du peptide, également confirmé par la suite avec des expériences de purification sur colonne Superdex-75 10/300. Ce repliement pouvait s'expliquer par un traitement HFIP trop long, mais des essais de traitement plus court n'ont pas donné de résultats.

Limités par le temps, nous avons décidé de nous tourner vers une solution alternative, et donc, de changer de source peptidique, à savoir un peptide produit par expression recombinante dans *Escherichia Coli* (rPeptide, USA). C'est ce peptide qui a été utilisé pour obtenir la totalité des résultats présentés dans ce travail. Cette expérience met en exergue la difficulté associée à la mise en œuvre du peptide « sauvage » A β ₁₋₄₂. Elle peut expliquer des résultats parfois contradictoires entre publications, le recours à des kits prêts à l'emploi ou encore le développement de modes de production « maison » du peptide.

De fait, dans ce travail de thèse, a été utilisé un kit Sensolyte Thioflavine T A β ₁₋₄₂ (Anaspec), bien adapté au Drug discovery.²⁰³ Ce kit a en effet été élaboré pour garantir le maintien à l'état de monomère du peptide A β ₁₋₄₂ au début de l'expérience et une reproductibilité de l'agrégation.

II-4. DISCUSSION GENERALE

Outre un peptide $A\beta_{1-42}$ humain lyophilisé, il comprend une solution tampon (mélange de Tris 50 mM /150 mM NaCl (pH=7,2), tampon HEPES 20 mM /150 mM NaCl (pH=7,2), tampon phosphate 10 mM /150 mM NaCl (pH=8,0)), une solution de ThT à 20 mM dans un tampon dont la composition n'est pas indiquée par le fournisseur et 2 références (morin et rouge de phénol à une concentration de 20 mM dans un tampon dont la composition n'est pas précisée). Il a été mis en œuvre selon le protocole fourni par le fabricant pour caractériser les différentes molécules. Ainsi, les molécules (10 μ M) sont mises à incuber avec le peptide $A\beta_{1-42}$ (46,5 μ M), dans un ratio défini, et la formation des fibres est suivie par mesure de la fluorescence de la ThT pendant 150 min. Dans ces conditions, toutefois, on ne visualise pas l'étape de nucléation dans sa globalité.

En parallèle, le test multiparamétrique a été mené sur le **peptide « sauvage » $A\beta_{1-42}$ fourni par rPeptide**. Le traitement de ce peptide est réalisé par solubilisation dans le NH_4OH , puis par reprise dans le tampon PBS pour aboutir à un pH final de 7,4. Les phases de reprises sont uniquement faites avec la pipette (pas de vortex ni d'agitation forte) afin de ne pas provoquer d'agrégation avant l'incubation du peptide. Nous avons pu obtenir une cinétique d'agrégation reproductible, présentée dans les chapitres V et VI, en réalisant les expériences à 25°C, en 10h environ. Toutefois, des expériences supplémentaires (purification ou AFM) devront être conduites afin de confirmer de façon précise les espèces présentes tout le long des cinétiques d'agrégation.

En outre, nous avons entrepris la **production de l'oG37C** (cf chapitre V et VI), dans le cadre de la collaboration avec le CBMN, avec l'aide du professeur Christophe Cullin. Nous avons également tenté la production du peptide $A\beta_{1-42}$. Tandis que la production de l'oG37C a été un succès et a permis ensuite la réalisation des différentes études, la production de la version *wild-type* ou sauvage n'a pas été aussi concluante car nous nous sommes heurtés à des problèmes d'agrégation du peptide lors des différentes étapes de purification. Le développement de la mise au point n'étant pas envisageable dans la durée impartie par ce travail de thèse, nous nous sommes cantonnés à la version commerciale rPeptide du peptide sauvage qui est apparu satisfaisant. Appliquer un traitement au peptide $A\beta_{1-42}$ permettant de partir de l'état monomérique et d'assurer une cinétique d'agrégation reproductible dans des délais compatibles avec des expériences conduites au stade du drug discovery (<24h) n'est donc pas forcément aisé. Cela est toutefois indispensable pour pouvoir mettre en évidence des modulateurs spécifiques de l'agrégation.

Enregistrement et traitement du signal obtenu en ATR-FTIR

La spectroscopie ATR-FTIR est utilisée afin d'analyser la structure secondaire des peptides et protéines notamment par l'analyse de la bande amide I ($1700-1600\text{cm}^{-1}$) correspondant à la vibration du C=O (élongation) de la liaison peptidique. Une mise au point des protocoles associés à cette étude a été nécessaire afin de pouvoir enregistrer et analyser les changements de structure secondaire du peptide, en absence et en présence des modulateurs de l'agrégation du peptide. Pour cela, une collaboration a été mise en place avec le Dr Julien Cardin, M. Michael Boisserie et Sylvain Duprey du Centre de recherche sur les Ions, les MAériaux et la Photonique (CIMAP)

Ensemble, nous avons mis au point une méthodologie de **traitement spectral** afin de limiter les biais trop nombreux que pouvaient laisser les approches habituelles. Dans un premier temps, une soustraction du blanc (échantillon sans le peptide), communément réalisée dans ce type d'approche, est effectuée par rapport au spectre brut obtenu (échantillon avec le peptide), permettant ainsi d'isoler les données propres au signal du peptide. Cette approche est possible si le signal du blanc est inférieur au signal du spectre brut (Figure 40).

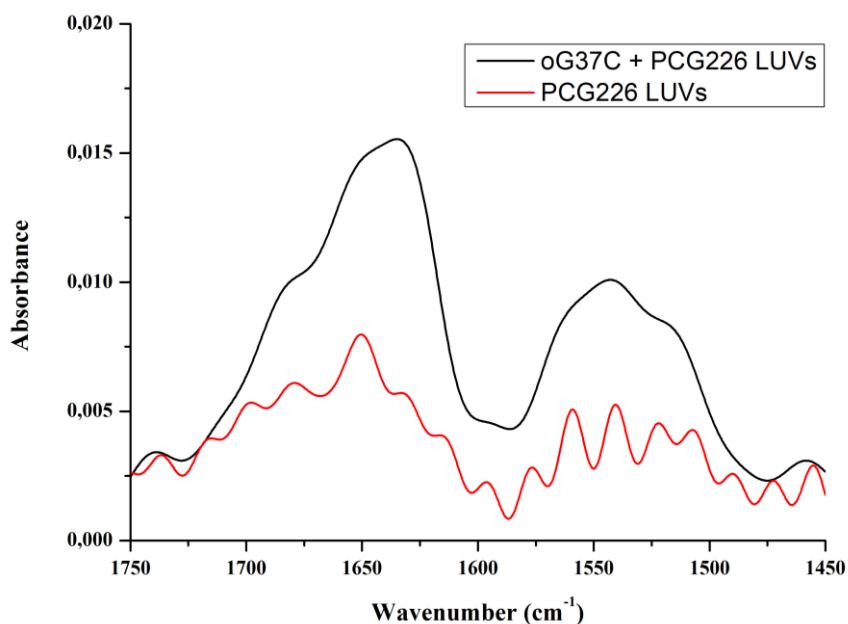


Figure 40. Spectre ATR-FTIR du signal brut de l'oG37C avec des liposomes et le blanc correspondant

Afin d'améliorer le signal des spectres, notamment à faible concentration de peptide, un séchage de l'échantillon est réalisé jusqu'à former un film à la surface du cristal pour apporter le maximum de matériel dans la zone de pénétration de l'onde évanescente (cf paragraphe III). Afin de minimiser l'impact de ce séchage, nous avons normalisé les temps de séchage à 10 min pour des dépôts de 3 μL , avec une hauteur et un flux fixés, le tout dans une salle thermo-régulée (25°C).

Une fois le spectre obtenu, il reste généralement des traces de vapeur d'eau sous la forme de petits pics présents entre 4000 et 3500 cm^{-1} et 2000 et 1250 cm^{-1} . Ces traces sont habituellement retirées par lissage à l'aide de l'algorithme de Savitzky-Golay. Il s'agit d'une méthode de lissage de courbe en définissant un point sur le spectre comme étant la moyenne d'un nombre défini de points voisins.²²⁷ Toutefois, l'utilisation d'une telle méthode peut entraîner une perte d'information importante et impacter de façon significative le résultat final.

Nous avons donc décidé d'appliquer un filtre FFT (*Fast Fourier Transform*) (cf *Supporting information*, chapitre V et VI). Ce filtre permet de décomposer les données en composantes de fréquence par un algorithme de transformation rapide de Fourier.²²⁸⁻²³⁰ En appliquant un filtre de fréquence, on peut par la suite laisser passer certaines fréquences et en bloquer d'autres. Ainsi il est possible de bloquer des fréquences, lorsqu'il y a une période différente entre le bruit de fond et le signal. Cette méthodologie peut bien évidemment elle aussi également entraîner des biais, mais elle nous semble plus correcte du point de vue physique qu'un lissage spectral et minimise l'apparition d'artefacts. C'est celle-ci qui a été retenue pour le traitement de nos échantillons.

4.2.2 Résultats et perspectives

Les résultats obtenus ont montré que **selon la composition de la membrane et le ratio peptide/lipide, la présence des modèles liposomaux utilisés a principalement un effet cinétique de ralentissement sur le peptide $\text{A}\beta_{1-42}$. Sur l'oG37C nous avons observé un impact structural avec une contribution de la conformation du peptide en hélice α /random plus importante en présence de liposomes. La membrane pourrait ainsi servir de réservoir de peptide, ralentissant son agrégation. En parallèle, les espèces oligomères peuvent exercer rapidement leur toxicité sur les membranes riches en PG. Un effet similaire sur le peptide sauvage serait imaginable.**

Les données conformationnelles par ATR-FTIR du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ sauvage sont manquantes et empêchent l'interprétation fine des mécanismes d'agrégation en présence des liposomes et la validation de notre hypothèse. Les résultats seront complétés prochainement.

Le CBMN avec qui nous avons collaboré a développé en parallèle de l'oG37C, d'autres formes mutantes du peptide, le mG37C qui est la forme monomérique de l'oG37C, et le L34T qui a pour particularité de former des fibres.^{104,231} Il serait également intéressant d'élargir le système à ces formes du peptide afin d'isoler le mécanisme associé à chaque espèce prédominante, monomère ou fibrilles.

Il paraîtrait par ailleurs tout à fait original mais réalisable d'appliquer la détermination du coefficient de partage par utilisation de liposomes au peptide pour caractériser plus avant ces interactions. Le modèle neuronal biomimétique que nous avons mis en œuvre dans nos études s'appuie sur des liposomes de composition relativement simple afin de pouvoir l'utiliser en routine en diminuant les coûts de production.

Il pourrait être intéressant de comparer les effets observés avec des liposomes plus complexes en y intégrant notamment le ganglioside GM1 en plus du cholestérol, voire la sphingomyéline. Cela permettra d'étudier le comportement de déstabilisation et de définir dans quelle mesure notre modèle est comparable aux modèles mimant de façon encore plus précise les compositions membranaires neuronales.

4.3 Objectif 3 : Etude des interactions molécules/A β /membranes

4.3.1 Prise en considération de quelques limites des méthodologies utilisées

Une étape cruciale avant la finalisation de notre interactome était de vérifier la compatibilité des molécules avec les différentes approches proposées, notamment pour la mesure de la fluorescence de la ThT. Nous avons donc dans un premier temps vérifié que les molécules n'absorbaient pas au niveau des longueurs d'onde d'intérêt pour la fluorescence de la ThT ($\lambda_{em}=484$ nm) et de la carboxyfluoresceine ($\lambda_{em}=528$ nm) (Figure 41).

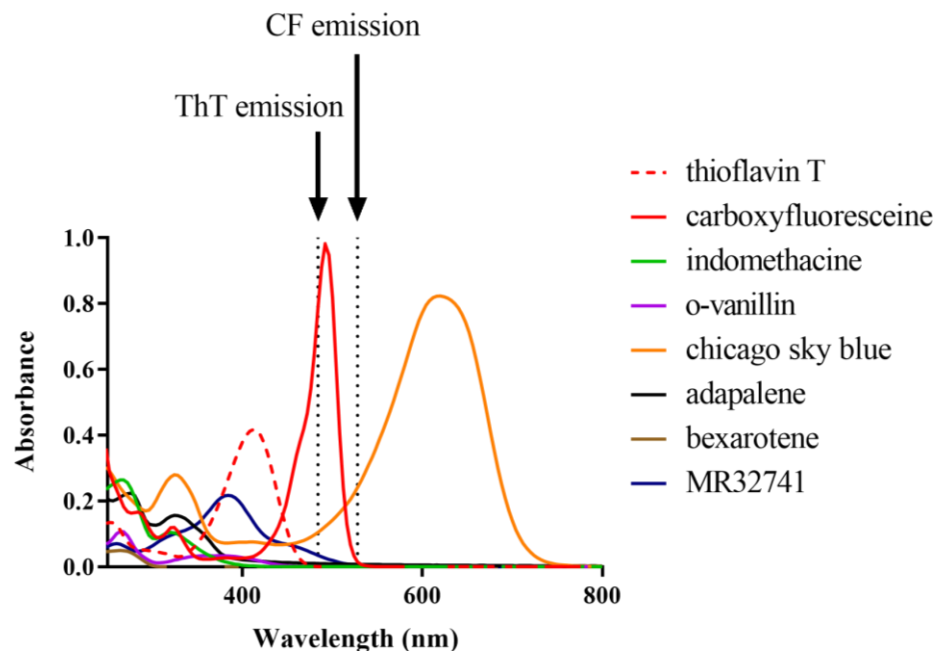


Figure 41. Spectres d'absorption des molécules étudiées
 ([molécules] = 16 μ M, tampon PBS, pH 7,4)

Les résultats laissent présager une interaction possible entre le MR32741 et la ThT (Figure 41). Nous avons tout de même lancé les études afin de voir dans quelle dimension cela pouvait être gênant et à partir de quelle concentration.

Au vu des résultats obtenus, il est apparu que le chicago sky blue et le MR32741 sont capables d'induire un quenching de la ThT (cf chapitre VI), dépendant de la concentration utilisée, et de façon plus intense pour le MR32741 que pour le chicago sky blue.

Ces résultats indiquent qu'il est indispensable, en plus de la détermination des spectres d'absorbance des molécules, de réaliser des lectures de fluorescence de la ThT en présence des composés avant même de mesurer les cinétiques d'agrégation du peptide. Lorsque les modifications de fluorescence de la ThT seront linéaires, il est envisageable de réaliser les soustractions spectrales en conséquence. Ces précautions ont été prises de façon systématique dans nos études.

Dans le cas de molécules capables d'éteindre le signal de la ThT, comme le chicago sky blue et le MR32741, il demeure indispensable de ne pas chercher à surinterpréter les résultats de fluorescence et de coupler ces analyses à d'autres méthodes de caractérisation.

II-4. DISCUSSION GENERALE

Doig, *et al.* (2018)²⁰⁵ avaient notamment stipulé dans la liste des probables causes des échecs de l'hypothèse amyloïde que les molécules pouvaient interférer avec la fluorescence des molécules couramment utilisées pour suivre l'agrégation du peptide A β , comme la ThT, par un effet de filtre interne. L'alternative est justement de disposer de plusieurs méthodes, à l'image de notre test multiparamétrique qui peuvent permettre de répondre à ces manquements. Toutefois, les mesures par suivi cinétique de la fluorescence de la ThT restent indispensables dans l'optique du screening de modifications de l'agrégation du peptide A β . D'autres méthodes de suivi, comme l'utilisation d'anticorps²³² pourraient permettre de compenser ce défaut, mais restent selon nous coûteuses pour une application en screening précoce. En revanche elles pourraient très bien être utilisées pour lever les biais, une fois une première sélection des composés réalisée. Durant ce projet de thèse, nous avons commencé à mettre en place un suivi cinétique de la formation des espèces agrégées en utilisant la DLS. Cette piste en cours de développement pourra être un outil puissant qui permettra de remédier à ce problème. De plus, on peut noter que le chicago sky blue absorbe au niveau de l'émission de la carboxyfluorescéine (Figure 41). Les résultats de leakage assay sont donc à considérer avec certaines précautions. Toutefois, le fait de les combiner aux mesures de DLS a permis de lever le doute existant. Cela confirme l'intérêt qu'il y a de combiner plusieurs méthodologies et plusieurs méthodes de détection pour l'analyse d'un paramètre. Les expériences de spectroscopie ATR-FTIR ont pu être menées pour toutes les molécules sauf l'indométacine qui est utilisée à une concentration trop élevée pour pouvoir appliquer un traitement de signal. Ce genre de situation pourrait également nécessiter de faire appel à d'autres méthodes comme le dichroïsme circulaire²³³ qui nécessitent des quantités trop importantes de protéine pour être envisagées en screening mais qui pourront servir d'alternative. Dans le traitement par déconvolution des spectres, nous avons volontairement choisi de considérer la contribution en hélice α et la contribution random en tant que seul pic (Tableau 3).

Structure	Amide I wavenumber (cm⁻¹)
Anti-parallel β -sheet	1675-1695
3_{10} -Helix	1660-1670
α -Helix	1648-1660
Unordered	1640-1648
β -sheet	1625-1640
Aggregated strands	1610-1628

Tableau 3. Conformations secondaires des peptides et protéines en ATR-FTIR^{234,235}

En effet, au vu de l'allure des spectres (cf chapitre V et VI), il nous paraissait incorrect de considérer ces deux contributions comme étant distinctes. Pour cela, il aurait fallu des pics beaucoup plus fins que l'on pourrait obtenir en laissant vieillir les agrégats beaucoup plus longtemps par exemple. Cependant, il faut trouver un juste équilibre si on souhaite maintenir des durées d'expérimentation compatibles avec l'interprétation des résultats obtenus par les autres méthodes de ce test multiparamétrique.

4.3.2 Résultats et perspectives

Après avoir sélectionné six molécules connues ayant des effets potentiellement différents sur l'agrégation du peptide A β , nous avons développé une procédure visant à décrire de façon exhaustive l'interactome composé/membrane/peptide A β . Le développement de ce projet nous permet dorénavant d'avoir à disposition une boîte à outils pour caractériser les composés visant à interagir avec le peptide A β_{1-42} à plusieurs niveaux.

Ce travail de thèse a conduit notre équipe à mettre au point plusieurs tests simples et miniaturisés.

Les mesures de K_p permettent d'accéder au coefficient de partage des molécules, ce qui traduit l'affinité de celles-ci pour les membranes en prenant en compte non seulement la lipophilie mais aussi d'autres phénomènes en jeu comme les interactions électrostatiques. Ces interactions peuvent se traduire par des effets de déstabilisation membranaire, observés à l'aide du LLA, mais aussi par des modifications de fluidité membranaire, qui elles, sont observées et localisées à l'aide de l'anisotropie de fluorescence.

Le suivi de fluorescence de la ThT permet de suivre l'agrégation du peptide amyloïde dans le temps et de voir les modifications cinétiques et quantitatives en fonction de la présence des modulateurs (molécules et liposomes). Les interactions résultantes peuvent modifier la toxicité engendrée par la présence du peptide sur les membranes, celles-ci sont étudiées à l'aide du LLA combiné aux mesures de DLS. Finalement, ces interactions peuvent également modifier la conformation secondaire du peptide, ce paramètre est étudié à l'aide de la spectroscopie ATR-FTIR.

Grâce à la combinaison de ces approches, il est ainsi apparu possible de discriminer certains effets des molécules sur le processus d'agrégation du peptide A β et dans certains cas, objectiver des interactions particulières avec les membranes. L'ensemble de cette approche a permis de montrer que :

II-4. DISCUSSION GENERALE

- le bexarotène pouvait influencer la phase de nucléation (lag phase) de l' $A\beta_{1-42}$ en la ralentissant mais que la présence de liposomes pouvait changer cet effet, en l'accéléralant au contraire. Ces effets sont concentration dépendant. Le bexarotène semble également augmenter la propension de l'oG37C à former des feuillettes β , résultant en une augmentation de la toxicité sur les liposomes,
- le chicago sky blue, en interagissant avec le peptide $A\beta$, est capable de modifier ses interactions avec les membranes en induisant un effet protecteur sur les liposomes testés. Cet effet est associé à des changements conformationnels de l'oG37C : une augmentation de la formation des feuillettes β , une disparition du signal associé aux feuillettes β anti-parallèles et une diminution de la contribution en hélice α en présence de liposomes,
- l'indométacine a démontré une capacité à promouvoir la fibrillation, ce quel que soit le modèle peptidique et liposomal utilisé, associé à une réorganisation des lipides due à un effet détergent en présence d'oG37C,
- l'*o*-vanilline entraîne une augmentation de la phase de nucléation et une diminution quantitative des fibres associées au peptide $A\beta_{1-42}$. Sur l'oG37C, une légère diminution cinétique a été détectée, associée à une augmentation du signal des hélices α et une disparition du signal des feuillettes β anti-parallèles. Ces effets ne sont pas modifiés de façon significative en présence de liposomes,
- le MR32741 a entraîné un effet détergent des membranes en présence d'oG37C, associé à une augmentation du signal des hélices α et une disparition du signal des feuillettes β anti-parallèles.
- les résultats obtenus pour l'adapalène restent limités, la solubilité de la molécule limitant les expériences pouvant être entreprises. Ce composé avait été étudié dans d'autres travaux d'étude de l'inhibition de la cinétique d'agrégation du peptide $A\beta$,²³⁶ sans que soient signalés de problèmes de précipitation. C'est en mettant en œuvre nos tests complémentaires que les limites concernant l'utilisation de l'adapalène sont apparues.

Les effets détergents sur les membranes spécifiques, mis en évidence, lors de la présence concomitante de l'oG37C et d'indométacine ou du MR32741 sont très étonnants. Nous avons cherché à les visualiser par microscopie électronique à transmission (TEM). Toutefois, dans les conditions de traitement des échantillons que nous avons utilisées, la coloration négative pouvait avoir un impact par elle-même sur l'intégrité des liposomes, rendant difficile l'interprétation des résultats (Figure 42).

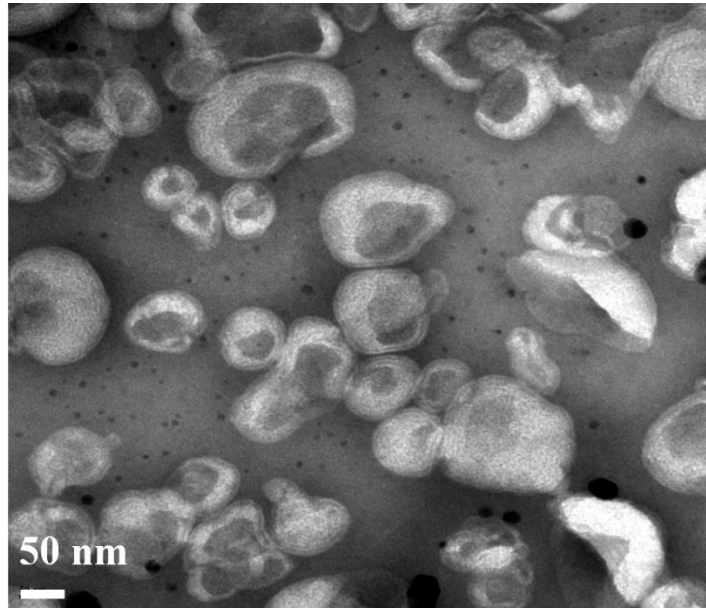


Figure 42. Observation des LUVs à base de PCG₂₂₆ en TEM

Henry, *et al.* (2018) et Ewald, *et al.* (2019) ont utilisé la microscopie à force atomique (AFM) afin d'étudier les interactions de l'oG37C avec des membranes contenant notamment du GM1, de la sphingomyéline et du cholestérol.^{237,238} Il s'agit d'une méthodologie puissante qui permet d'aller à l'échelle moléculaire et d'obtenir des informations extrêmement fines sur les interactions entre le peptide, les molécules et les membranes. Cette approche pourrait être envisagée pour investiguer plus avant les effets.

Les études conformationnelles ont été réalisées sur l'oligomère oG37C afin de pouvoir caractériser les effets des molécules sur un peptide réputé soluble, stable en solution, et toxique vis-à-vis des membranes.¹⁰⁴ Les études des changements de conformation par ATR-FTIR sous l'effet de l'interactome pourront également être entreprises sur le peptide A β ₁₋₄₂ tout comme celles de toxicité membranaire pour corroborer les effets objectivés. Les approches de mesure de rigidité membranaire par anisotropie de fluorescence pourraient par ailleurs être réalisées en présence de peptide mais cela nécessitera une mise au point expérimentale préalable.

Les résultats obtenus sur les six molécules ont permis de discriminer des effets intéressants vis-à-vis des paramètres cinétiques, conformationnels et toxiques.

Le chicago sky blue avec son effet protecteur sur les liposomes, l'indométacine et le MR32741 qui modifient les interactions de l'oG37C avec les liposomes semblent être trois molécules dont les effets méritent d'être analysés de façon plus fine.

II-4. DISCUSSION GENERALE

Toutefois ces composés ne possèdent pas tous d'intérêt thérapeutique : le chikago sky blue a des effets d'inhibition sur la DNA recombinaise Rad51 et la recapture du glutamate,^{239,240} et l'indométacine n'est active qu'à concentration très élevée (1 mM). De par les différents résultats obtenus, le composé MR32741, initialement considéré comme un hit, apparait dorénavant comme un lead.

Ainsi, ce travail a contribué à la proposition d'une boîte à outil polyvalente pour la caractérisation de composés pouvant moduler l'agrégation du peptide A β . Il est possible d'utiliser chaque approche de façon indépendante lorsqu'on étudie un paramètre en particulier mais également de faire une caractérisation plus complète des composés afin de pouvoir déterminer lesquels pourront faire l'objet d'un développement plus poussé, dans le cadre d'un travail de Drug discovery, l'objectif étant de pouvoir disposer *in fine* d'un médicament efficace contre la maladie d'Alzheimer.

Dans cet objectif, il paraîtrait intéressant de relier les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse avec des études *in vitro* puis des études *in vivo*. Toutefois les modèles *in vivo* disponibles à ce jour sont également discutés quant à leur relevance vis-à-vis du développement de la MA chez l'homme.^{241,242} Il faudra donc améliorer non seulement la pertinence des modèles *in vivo* mais développer des tests *in vitro* qui permettront de maximiser la caractérisation et la prédiction des effets des molécules dans l'organisme. En dépit des artefacts rencontrés, notre test a notamment démontré un effet protecteur du chikago sky blue vis-à-vis des membranes. Celui-ci avait également été mis en lumière sur des essais cellulaires *in vitro*,²⁴³ ce qui représente un résultat très encourageant vis-à-vis de la pertinence du développement de notre méthodologie.

II-4. DISCUSSION GENERALE

III. CONCLUSION ET **PERSPECTIVES**

III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La maladie d'Alzheimer est un enjeu socioéconomique majeur en matière de soins de santé. Le vieillissement de la population, l'allongement de l'espérance de vie et le mode de vie moderne laissent présager un pic des cas de démences dans les prochaines années à venir. Il est important de trouver des solutions efficaces et rapides, et cela passe par l'implémentation de méthodologies simples permettant de recueillir un maximum de données pour la caractérisation de nouveaux agents anti-Alzheimer.

La présente étude, nous a permis de combiner des méthodes expérimentales pour permettre une caractérisation multiparamétrique de modulateurs potentiels de la fibrillation du peptide $A\beta_{1-42}$. Elle a été réalisée avec des liposomes en tant que modèles membranaires, dont la composition en phospholipides a été modulée. D'après les résultats obtenus à ce jour, il apparaît que les modulateurs testés présentent une gamme d'effets pouvant affecter des étapes définies de l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$. Toutes ces expériences fournissent un test multiparamétrique permettant la caractérisation physico-chimique fine et la discrimination de modulateurs de l'agrégation d' $A\beta$ nouvellement synthétisés par les chimistes et pouvant même être étendu à d'autres maladies amyloïdes. L'ensemble des méthodologies utilisées, essentiellement basées sur des analyses spectroscopiques, est bien adapté au Drug discovery puisqu'utilisant des tests miniaturisés, peu consommateurs de matières premières, robustes et avec des temps d'acquisition et de traitement des données optimisés.

Cette approche nous a permis d'obtenir des données expérimentales cruciales afin de décrire un interactome entre les molécules, le peptide et les membranes. Il est déjà possible de différencier des mécanismes d'action de molécules en l'absence ou en présence de membranes, confirmant ainsi la nécessité d'introduire des liposomes dans les tests de caractérisation des médicaments. Ce travail constitue la pierre angulaire d'un projet qui une fois complété va permettre au CERMN de disposer d'une méthodologie puissante pour la caractérisation de composés visant à interagir avec le peptide $A\beta_{1-42}$. Des projets de thèse menés en parallèle au sein du laboratoire pourront bénéficier de cette méthodologie.

La chimiothèque du CERMN possède plus de 18 000 molécules, cela laisse imaginer la nécessité de disposer de moyens techniques comme le test proposé afin de réaliser des screening sur des familles de molécules.

III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette méthodologie est d'autant plus forte qu'elle pourra être transposée aux protéines amyloïdes de façon générale qui partagent des caractéristiques communes, à l'image de la protéine Tau, devenue également une cible d'intérêt majeur depuis que l'hypothèse amyloïde est parfois remise en cause.

Il m'est d'avis que l'hypothèse amyloïde ne doit pas être écartée aussi facilement. Plusieurs groupes de chercheurs font depuis quelques années remonter l'idée que le souci majeur des échecs pour la thérapie de la maladie d'Alzheimer ne vient pas nécessairement des approches dans l'absolu mais dans le fait qu'elles soient systématiquement évaluées de façon trop tardive chez les malades, lorsque les mécanismes pathologiques sont déjà trop développés chez l'homme. A mon sens, le développement d'une thérapie ne sera accessible que si les diagnostics deviennent plus performants, plus précis et plus précoces. La mise en place en 2019 d'un test de dépistage sanguin, évoquée au début de ce manuscrit, est à mon sens le type d'avancée qui, associée aux approches classiques, pourrait grandement changer la donne.

IV. REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Reisberg, B. The Global Deterioration Scale for Assessment of Primary Degenerative Dementia. *Am. J. Psychiatry* **139**, 1136–1139 (1982).
2. Wolters, F. J. & Ikram, M. A. Epidemiology of Dementia: The Burden on Society, the Challenges for Research. in *Biomarkers for Alzheimer's Disease Drug Development* (ed. Perneczky, R.) vol. 1750 3–14 (2018).
3. Bérard, A., Gervès, C., Aquino, J.-P., Fontaine, R. & Plisson, J.-P. Etude socio-économique portant sur les malades Alzheimer jeunes. 35 (2014).
4. Ologi.fr [site web], consulté le 01-09-2019. <https://www.ologi.fr/>.
5. *Arrêté du 29 mai 2018 portant radiation de spécialités pharmaceutiques de la liste mentionnée au premier alinéa de l'article L. 162-17 du code de la sécurité sociale.*
6. Bérard, A. & Fontaine, R. Combien coûte la maladie d'Alzheimer. 98 (2015).
7. Knopman, D. S., Petersen, R. C. & Jack, C. R. A brief history of “Alzheimer disease”: Multiple meanings separated by a common name. *Neurology* **92**, 1053–1059 (2019).
8. Maurer, K., Volk, S. & Gerbaldo, H. Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet* **349**, 1546–49 (1997).
9. Glenner, G. G. & Wong, C. W. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 885–890 (1984).
10. Brion, J.-P. Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch. Biol.* **95**, 229–235 (1985).
11. Kosik, K. S., Joachim, C. L. & Selkoe, D. J. Microtubule-associated protein tau (τ) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 4044–4048 (1986).
12. Kang, J. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733–736 (1987).
13. Strittmatter, W. J., Englund, J., Salvesen, G. S. & Roses, A. D. Apolipoprotein E: High-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1977–1981 (1993).
14. Games, D. *et al.* Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* **373**, 523–527 (1995).
15. Schenk, D. *et al.* Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. **400**, 173–177 (1999).
16. Klunk, W. E. *et al.* Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B: Imaging Amyloid in AD with PIB. *Ann. Neurol.* **55**, 306–319 (2004).
17. Lambert, J.-C. *et al.* Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **45**, 1452–1458 (2013).
18. Plan « Alzheimer et maladies apparentées » 2008-2012. (2008).
19. Plan Maladies Neuro-Dégénératives 2014-2018. (2014).
20. Brayne, C. *et al.* Neuropathological Correlates of Dementia in Over-80-Year-Old Brain Donors from the Population-Based Cambridge City over-75s Cohort (CC75C) Study. *J. Alzheimers Dis.* **18**, 645–658 (2009).
21. Stopford, C. L., Snowden, J. S., Thompson, J. C. & Neary, D. Variability in cognitive presentation of Alzheimer's disease. *Cortex* **44**, 185–195 (2008).
22. Iqbal, K. *et al.* Subgroups of Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid molecular markers. *Ann. Neurol.* **58**, 748–757 (2005).

IV-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

23. Tanzi, R. E. The Genetics of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006296–a006296 (2012).
24. Wisniewski, K. E., Wisniewski, H. M. & Wen, G. Y. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann. Neurol.* **17**, 278–282 (1985).
25. Levy-Lahad, E. A Familial Alzheimer's Disease Locus on Chromosome I. *Science* **269**, 970–973 (1995).
26. St George-Hyslop, P. Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nat. Genet.* **2**, 330–334 (1992).
27. Dubois, B. *et al.* Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* **13**, 614–629 (2014).
28. Vergheze, P. B., Castellano, J. M. & Holtzman, D. M. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* **10**, 241–252 (2011).
29. Dorszewska, J., Prendecki, M., Oczkowska, A., Dezor, M. & Kozubski, W. Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **13**, 952–963 (2016).
30. Piaceri, I. Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front. Biosci.* **E5**, 167–177 (2013).
31. Scarmeas, N. Physical Activity, Diet, and Risk of Alzheimer Disease. *JAMA* **302**, 627–637 (2009).
32. Wainaina, M. N., Chen, Z. & Zhong, C. Environmental factors in the development and progression of late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* **30**, 253–270 (2014).
33. Stampfer, M. J. Cardiovascular disease and Alzheimer's disease: common links. *J. Intern. Med.* **260**, 211–223 (2006).
34. Kroner, Z. The Relationship between Alzheimer's Disease and Diabetes: Type 3 Diabetes? **14**, 373–379 (2009).
35. Kuhlmann, J. *et al.* CSF A β 1-42 – an excellent but complicated Alzheimer's biomarker – a route to standardisation. *Clin. Chim. Acta* **467**, 27–33 (2017).
36. Lashley, T. *et al.* Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects. *Dis. Model. Mech.* **11**, dmm031781 (2018).
37. Bradford, A., Kunik, M. E., Schulz, P., Williams, S. P. & Singh, H. Missed and Delayed Diagnosis of Dementia in Primary Care: Prevalence and Contributing Factors. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **23**, 306–314 (2009).
38. Dubois, B., Padovani, A., Scheltens, P., Rossi, A. & Dell'Agnello, G. Timely Diagnosis for Alzheimer's Disease: A Literature Review on Benefits and Challenges. *J. Alzheimers Dis.* **49**, 617–631 (2015).
39. Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. & Hyman, B. T. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, a006189–a006189 (2011).
40. Casadesus, G. *et al.* Increased isoprostane and prostaglandin are prominent in neurons in Alzheimer disease. *Mol. Neurodegener.* **2**, 2 (2007).
41. Crews, L. & Masliah, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **19**, R12–R20 (2010).
42. Lombardo, S. & Maskos, U. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology* **96**, 255–262 (2015).
43. Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M. & Wilcock, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **66**, 137–147 (1999).
44. H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F. & M. Ribeiro, F. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* **14**, 101–115 (2016).

45. Terry, A. V. & Buccafusco, J. J. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 821–827 (2003).
46. Brion, J.-P. Neurofibrillary Tangles and Alzheimer's Disease. *Eur. Neurol.* **40**, 130–140 (1998).
47. Kumar, K., Kumar, A., Keegan, R. M. & Deshmukh, R. Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. *Biomed. Pharmacother.* **98**, 297–307 (2018).
48. Paula, V. de J. R. de, Guimarães, F. M., Diniz, B. S. & Forlenza, O. V. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: Amyloid-beta, TAU protein or both? *Dement. Neuropsychol.* **3**, 188–194 (2009).
49. Kametani, F. & Hasegawa, M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* **12**, (2018).
50. Ricciarelli, R. & Fedele, E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr. Neuropharmacol.* **15**, 926–935 (2017).
51. Selkoe, D. J. & Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **8**, 595–608 (2016).
52. Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Sabbagh, M. & Zhong, K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **5**, 272–293 (2019).
53. Wang, X. *et al.* Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression. *Cell Res.* **29**, 787–803 (2019).
54. Benson, M. D. *et al.* Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* **25**, 215–219 (2018).
55. Sipe, J. D. & Cohen, A. S. Review: History of the Amyloid Fibril. *J. Struct. Biol.* **130**, 88–98 (2000).
56. Serpell, L. C., Benson, M., Liepnieks, J. J. & Fraser, P. E. Structural analyses of fibrinogen amyloid fibrils. *Amyloid* **14**, 199–203 (2007).
57. Rambaran, R. N. & Serpell, L. C. Amyloid fibrils: Abnormal protein assembly. *Prion* **2**, 112–117 (2008).
58. Eisenberg, D. & Jucker, M. The Amyloid State of Proteins in Human Diseases. *Cell* **148**, 1188–1203 (2012).
59. Greenwald, J. & Riek, R. Biology of Amyloid: Structure, Function, and Regulation. *Structure* **18**, 1244–1260 (2010).
60. Ludewig, S. & Korte, M. Novel Insights into the Physiological Function of the APP (Gene) Family and Its Proteolytic Fragments in Synaptic Plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* **9**, (2017).
61. Muller, U. C. & Zheng, H. Physiological Functions of APP Family Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006288–a006288 (2012).
62. Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C. & Gleichmann, M. An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *NeuroMolecular Med.* **12**, 1–12 (2010).
63. Baranger, K., Khrestchatisky, M. & Rivera, S. MT5-MMP, just a new APP processing proteinase in Alzheimer's disease? *J. Neuroinflammation* **13**, 167 (2016).
64. Baranger, K. *et al.* MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 217–236 (2016).
65. Oakley, H. *et al.* Intraneuronal beta-Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J. Neurosci.* **26**, 10129–10140 (2006).

66. Baranger, K. *et al.* MT5-MMP Promotes Alzheimer's Pathogenesis in the Frontal Cortex of 5xFAD Mice and APP Trafficking in vitro. *Front. Mol. Neurosci.* **9**, (2017).
67. Willem, M. *et al.* η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* **526**, 443–447 (2015).
68. Iwatsubo, T. *et al.* Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* **13**, 45–53 (1994).
69. Welander, H. *et al.* A β 43 is more frequent than A β 40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains. *J. Neurochem.* **110**, 697–706 (2009).
70. Cirrito, J. R. *et al.* In Vivo Assessment of Brain Interstitial Fluid with Microdialysis Reveals Plaque-Associated Changes in Amyloid- β Metabolism and Half-Life. *J. Neurosci.* **23**, 8844–8853 (2003).
71. Plant, L. D., Boyle, J. P., Smith, I. F., Peers, C. & Pearson, H. A. The Production of Amyloid β Peptide Is a Critical Requirement for the Viability of Central Neurons. *J. Neurosci.* **23**, 5531–5535 (2003).
72. Atwood, C. S. *et al.* Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- β . *Brain Res. Rev.* 1–16 (2003).
73. Zou, K., Gong, J.-S., Yanagisawa, K. & Michikawa, M. A Novel Function of Monomeric Amyloid β -Protein Serving as an Antioxidant Molecule against Metal-Induced Oxidative Damage. *J. Neurosci.* **22**, 4833–4841 (2002).
74. Baranello, R. *et al.* Amyloid-Beta Protein Clearance and Degradation (ABCD) Pathways and their Role in Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **12**, 32–46 (2015).
75. C. Crdenas-Aguayo, M. del *et al.* Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. in *Neurochemistry* (ed. Heinbockel, T.) (2014). doi:10.5772/57398.
76. Kim, W. & Hecht, M. H. Generic hydrophobic residues are sufficient to promote aggregation of the Alzheimer's A β 42 peptide. *PNAS* **103**, 15824–15829 (2006).
77. Sarroukh, R., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M. & Raussens, V. ATR-FTIR: A “rejuvenated” tool to investigate amyloid proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1828**, 2328–2338 (2013).
78. Arosio, P., Knowles, T. P. J. & Linse, S. On the lag phase in amyloid fibril formation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 7606–7618 (2015).
79. Chatani, E. & Yamamoto, N. Recent progress on understanding the mechanisms of amyloid nucleation. *Biophys. Rev.* **10**, 527–534 (2018).
80. De Genst, E., Messer, A. & Dobson, C. M. Antibodies and protein misfolding: From structural research tools to therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1844**, 1907–1919 (2014).
81. Cohen, S. I. A. *et al.* Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 9758–9763 (2013).
82. Meisl, G. *et al.* Differences in nucleation behavior underlie the contrasting aggregation kinetics of the A β 40 and A β 42 peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 9384–9389 (2014).
83. Törnquist, M. *et al.* Secondary nucleation in amyloid formation. *Chem. Commun.* **54**, 8667–8684 (2018).
84. Lin, M.-S. *et al.* Investigation of the Mechanism of β -Amyloid Fibril Formation by Kinetic and Thermodynamic Analyses. *Langmuir* **24**, 5802–5808 (2008).
85. Jiang, D., Rauda, I., Han, S., Chen, S. & Zhou, F. Aggregation Pathways of the Amyloid β (1–42) Peptide Depend on Its Colloidal Stability and Ordered β -Sheet Stacking. *Langmuir* **28**, 12711–12721 (2012).
86. Goldsbury, C. *et al.* Amyloid Structure and Assembly: Insights from Scanning Transmission Electron Microscopy. *J Struct Biol* **173**, 1–13 (2012).

87. Malinchik, S. B., Inouye, H., Szumowski, K. E. & Kirschner, D. A. Structural Analysis of Alzheimer's $\beta(1-40)$ Amyloid: Protofilament Assembly of Tubular Fibrils. *Biophys. J.* **74**, 537–545 (1998).
88. Luhrs, T. *et al.* 3D structure of Alzheimer's amyloid- (1-42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 17342–17347 (2005).
89. Ahmed, M. *et al.* Structural conversion of neurotoxic amyloid- $\beta(1-42)$ oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 561–567 (2010).
90. Serpell, L. C. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1502**, 16–30 (2000).
91. Zagorski, M. G. & Barrow, C. J. NMR Studies of Amyloid β -Peptides: Proton Assignments, Secondary Structure, and Mechanism of an α -Helix β -Sheet Conversion for a Homologous, 28-Residue, N-Terminal Fragment. *Biochemistry* **31**, 5621–5631 (1992).
92. Querol-Vilaseca, M. *et al.* Nanoscale structure of amyloid- β plaques in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **9**, 5181 (2019).
93. Haass, C. & Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101–112 (2007).
94. Benilova, I., Karran, E. & De Strooper, B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* **15**, 349–357 (2012).
95. Klyubin, I. *et al.* Amyloid Protein Dimer-Containing Human CSF Disrupts Synaptic Plasticity: Prevention by Systemic Passive Immunization. *J. Neurosci.* **28**, 4231–4237 (2008).
96. Shankar, G. M. *et al.* Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* **14**, 837–842 (2008).
97. Jin, M. *et al.* Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5819–5824 (2011).
98. Huang, H.-C. & Jiang, Z.-F. Accumulated Amyloid- β Peptide and Hyperphosphorylated Tau Protein: Relationship and Links in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **16**, 15–27 (2009).
99. Nisbet, R. M., Polanco, J.-C., Ittner, L. M. & Götz, J. Tau aggregation and its interplay with amyloid- β . *Acta Neuropathol. (Berl.)* **129**, 207–220 (2015).
100. Tatarnikova, O. G., Orlov, M. A. & Bobkova, N. V. Beta-Amyloid and Tau-Protein: Structure, Interaction, and Prion-Like Properties. *Biochem. Mosc.* **80**, 1800–1819 (2015).
101. Cizas, P. *et al.* Size-dependent neurotoxicity of β -amyloid oligomers. *Arch. Biochem. Biophys.* **496**, 84–92 (2010).
102. Ono, K., Condron, M. M. & Teplow, D. B. Structure-neurotoxicity relationships of amyloid -protein oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 14745–14750 (2009).
103. Cerf, E. *et al.* Antiparallel β -sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid β -peptide. *Biochem. J.* **421**, 415–423 (2009).
104. Vignaud, H. *et al.* A Structure-Toxicity Study of A β 42 Reveals a New Anti-Parallel Aggregation Pathway. *PLoS ONE* **8**, e80262 (2013).
105. Kuperstein, I. *et al.* Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio. *EMBO J.* **29**, 3408–3420 (2010).
106. Matsumura, S. *et al.* Two Distinct Amyloid β -Protein (A β) Assembly Pathways Leading to Oligomers and Fibrils Identified by Combined Fluorescence Correlation Spectroscopy, Morphology, and Toxicity Analyses. *J. Biol. Chem.* **286**, 11555–11562 (2011).
107. Lee, M.-C. *et al.* Zinc ion rapidly induces toxic, off-pathway amyloid- β oligomers distinct from amyloid- β derived diffusible ligands in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
108. Liu, C. *et al.* Out-of-register -sheets suggest a pathway to toxic amyloid aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 20913–20918 (2012).

109. W. Pilkington IV, A. & Legleiter, J. Challenges in understanding the structure/activity relationship of A β oligomers. *AIMS Biophys.* **6**, 1–22 (2019).
110. Chaibva, M. *et al.* Sphingomyelin and GM1 Influence Huntingtin Binding to, Disruption of, and Aggregation on Lipid Membranes. *ACS Omega* **3**, 273–285 (2018).
111. Hoshino, T., Mahmood, Md. I., Mori, K. & Matsuzaki, K. Binding and Aggregation Mechanism of Amyloid β -Peptides onto the GM1 Ganglioside-Containing Lipid Membrane. *J. Phys. Chem. B* **117**, 8085–8094 (2013).
112. Nicastro, M. C. *et al.* Amyloid β -peptide insertion in liposomes containing GM1-cholesterol domains. *Biophys. Chem.* **208**, 9–16 (2016).
113. Valdes-Gonzalez, T., Inagawa, J. & Ido, T. Neuropeptides interact with glycolipid receptors A surface plasmon resonance study. *Peptides* **22**, 1099–1106 (2001).
114. Tsai, Y.-T., Itokazu, Y. & Yu, R. K. GM1 Ganglioside is Involved in Epigenetic Activation Loci of Neuronal Cells. *Neurochem. Res.* **41**, 107–115 (2016).
115. LipidWeb. (Gangliosides, The LipidWeb, consulté le 12-10-19, <https://www.lipidhome.co.uk>).
116. Molander-Melin, M. *et al.* Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. *J. Neurochem.* **92**, 171–182 (2005).
117. Svennerholm, Il. & Gottfries, C.-G. Membrane Lipids, Selectively Diminished in Alzheimer Brains, Suggest Synapse Loss as a Primary Event in Early-Onset Form (Type I) and Demyelination in Late-Onset Form (Type 11). *J. Neurochem.* **62**, 1039–1047 (1994).
118. Yanagisawa, K., Odaka, A., Suzuki, N. & Ihara, Y. GM1 ganglioside-bound amyloid β -protein (A β): A possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **1**, 1062–1066 (1995).
119. Ariga, T., McDonald, M. P. & Yu, R. K. *Thematic Review Series: Sphingolipids*. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease—a review,. *J. Lipid Res.* **49**, 1157–1175 (2008).
120. Kakio, A., Nishimoto, S., Yanagisawa, K., Kozutsumi, Y. & Matsuzaki, K. Interactions of Amyloid β -Protein with Various Gangliosides in Raft-Like Membranes: Importance of GM1 Ganglioside-Bound Form as an Endogenous Seed for Alzheimer Amyloid \dagger . *Biochemistry* **41**, 7385–7390 (2002).
121. McLaurin, J. & Chakrabarty, A. Membrane Disruption by Alzheimer β -Amyloid Peptides Mediated through Specific Binding to Either Phospholipids or Gangliosides. *J. Biol. Chem.* **271**, 26482–26489 (1996).
122. Yanagisawa, K. Pathological significance of ganglioside clusters in Alzheimer's disease: Ganglioside cluster in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **116**, 806–812 (2011).
123. Gibson Wood, W., Eckert, G. P., Igbavboa, U. & M?ller, W. E. Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1610**, 281–290 (2003).
124. Habchi, J. *et al.* Cholesterol catalyses A β 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes. *Nat. Chem.* **10**, 673–683 (2018).
125. Vestergaard, M., Hamada, T., Morita, M. & Takagi, M. Cholesterol, lipids, amyloid Beta, and Alzheimer's. *Curr. Alzheimer Res.* **7**, 262–270 (2010).
126. Matsuzaki, K. How Do Membranes Initiate Alzheimer's Disease? Formation of Toxic Amyloid Fibrils by the Amyloid β -Protein on Ganglioside Clusters. *Acc. Chem. Res.* **47**, 2397–2404 (2014).
127. Vetrivel, K. S. & Thinakaran, G. Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 860–867 (2010).

128. Berthelot, K., Cullin, C. & Lecomte, S. What does make an amyloid toxic: Morphology, structure or interaction with membrane? *Biochimie* **95**, 12–19 (2013).
129. Gorbenko, G. P. & Kinnunen, P. K. J. The role of lipid–protein interactions in amyloid-type protein fibril formation. *Chem. Phys. Lipids* **141**, 72–82 (2006).
130. Sabaté, R., Gallardo, M. & Estelrich, J. Spontaneous incorporation of β -amyloid peptide into neutral liposomes. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **270**, 13–17 (2005).
131. Ikeda, K. & Matsuzaki, K. Driving force of binding of amyloid β -protein to lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**, 525–529 (2008).
132. Editorial. State of aggregation. *Nat. Neurosci.* **14**, 399–399 (2011).
133. Laouini, A. *et al.* Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **1**, 147–168 (2012).
134. Jaspard, E. Les membranes : structure des lipides membranaires et des protéines membranaires [site web], consulté le 12-10-19. <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/7MembraneLipides/1MembraneLipides.htm>.
135. Eeman, M. & Deleu, M. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol Agron Soc Env.* **14**, 719–736 (2010).
136. Magalhães, L. M. *et al.* High-throughput microplate assay for the determination of drug partition coefficients. *Nat. Protoc.* **5**, 1823–1830 (2010).
137. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238–252 (1965).
138. Sharma, N. & Verma, S. Current and future prospective of liposomes as drug delivery vehicles for the effective treatment of cancer. *Int. J. Green Pharm.* **11**, S377–S384 (2017).
139. Cho, N.-J., Hwang, L., Solandt, J. & Frank, C. Comparison of Extruded and Sonicated Vesicles for Planar Bilayer Self-Assembly. *Materials* **6**, 3294–3308 (2013).
140. Vemuri, S., Yu, C.-D., Wangsatorntanakun, V. & Roosdorp, N. Large-Scale Production of Liposomes by A Microfluidizer. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **16**, 2243–2256 (1990).
141. Xia, S. & Xu, S. Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Res. Int.* **38**, 289–296 (2005).
142. Akbarzadeh, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* **8**, 102 (2013).
143. Madani, F., Perálvarez-Marín, A. & Gräslund, A. Liposome Model Systems to Study the Endosomal Escape of Cell-Penetrating Peptides: Transport across Phospholipid Membranes Induced by a Proton Gradient. *J. Drug Deliv.* **2011**, 1–7 (2011).
144. Purwaningsih, E. H. & Schubert, R. The Preparation of Liposomes derived from Mixed Micelles of Lecithin added by Sodium Cholate, followed by Dialysing using Hemoflow High Flux F60S. *Makara J. Health Res.* **8**, 49–52 (2010).
145. Wagner, A. & Vorauer-Uhl, K. Liposome Technology for Industrial Purposes. *J. Drug Deliv.* **2011**, 1–9 (2011).
146. Szoka, F. & Papahadjopoulos, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 4194–4198 (1978).
147. Batzri, S. & Korn, E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **298**, 1015–1019 (1973).
148. Deamer, D. & Bangham, A. D. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **443**, 629–634 (1976).
149. Lasic, D. D. The mechanism of vesicle formation. *Biochem. J.* **256**, 1–11 (1988).
150. Cooper, R. A. Influence of Increased Membrane Cholesterol on Membrane Fluidity and Cell Function in Human Red Blood Cells. *J. Supramol. Struct.* **8**, 413–430 (1979).
151. Hernández-Caselles, T., Villalaín, J. & Gómez-Fernández, J. C. Stability of Liposomes on Long Term Storage. *J. Pharm. Pharmacol.* **42**, 397–400 (1990).

152. Winterhalter, M. & Lasic, D. D. Liposome stability and formation: Experimental parameters and theories on the size distribution. *Chem. Phys. Lipids* **64**, 35–43 (1993).
153. Mouritsen, O. G. Lipids, curvature, and nano-medicine. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113**, 1174–1187 (2011).
154. Mansy, S. Model Protocells from Single-Chain Lipids. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 835–843 (2009).
155. Grit, M. & Crommelin, D. J. A. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem. Phys. Lipids* **64**, 3–18 (1993).
156. Ickenstein, L. M., Sandström, M. C., Mayer, L. D. & Edwards, K. Effects of phospholipid hydrolysis on the aggregate structure in DPPC/DSPE-PEG2000 liposome preparations after gel to liquid crystalline phase transition. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1758**, 171–180 (2006).
157. Williams, D. E. & Grant, K. B. Metal-Assisted Hydrolysis Reactions Involving Lipids: A Review. *Front. Chem.* **7**, (2019).
158. Reis, A. & Spickett, C. M. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818**, 2374–2387 (2012).
159. Mu, H. *et al.* Multivesicular liposomes for sustained release of bevacizumab in treating laser-induced choroidal neovascularization. *Drug Deliv.* **25**, 1372–1383 (2018).
160. Slooten, M. L. V. *et al.* Liposomes as sustained release system for human interferon-gamma: biopharmaceutical aspects. *Biochim. Biophys. Acta* **1530**, 134–145 (2001).
161. Immordino, M. L., Dosio, F. & Cattel, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int. J. Nanomedicine* **1**, 297–315 (2006).
162. Mohammed, A. R., Weston, N., Coombes, A. G. A., Fitzgerald, M. & Perrie, Y. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *Int. J. Pharm.* **285**, 23–34 (2004).
163. Ahmed, K. S. *et al.* Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. *J. Drug Target.* **27**, 742–761 (2019).
164. Ahmed, S. *et al.* Conception of nanosized hybrid liposome/poloxamer particles to thicken the interior core of liposomes and delay hydrophilic drug delivery. *Int. J. Pharm.* **567**, 118488 (2019).
165. Mukherjee, A. *et al.* Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: state of the art, emerging technologies, and perspectives. *Int. J. Nanomedicine* **14**, 1937–1952 (2019).
166. Alomrani, A. *et al.* The use of chitosan-coated flexible liposomes as a remarkable carrier to enhance the antitumor efficacy of 5-fluorouracil against colorectal cancer. *Saudi Pharm. J.* **27**, 603–611 (2019).
167. Grotz, E. *et al.* Nanotechnology in Tuberculosis: State of the Art and the Challenges Ahead. *Pharm. Res.* **35**, (2018).
168. Chopra, S., Venkatesan, N. & Betageri, G. V. Liposomes as nanocarriers for anti-HIV therapy. *Drug Deliv. Transl. Res.* **3**, 471–478 (2013).
169. Ibrahim, S., Tagami, T. & Ozeki, T. Effective-Loading of Platinum–Chloroquine into PEGylated Neutral and Cationic Liposomes as a Drug Delivery System for Resistant Malaria Parasites. *Biol. Pharm. Bull.* **40**, 815–823 (2017).
170. Mali, S. Delivery systems for gene therapy. *Indian J. Hum. Genet.* **19**, 3–8 (2013).
171. Ahmadi Ashtiani, H. R., Bishe, P., Lashgari, N.-A., Nilforoushzadeh, M. A. & Zare, S. Liposomes in Cosmetics. *J. Skin Stem Cell* **3**, e65815 (2016).
172. Barani, H. & Montazer, M. A Review on Applications of Liposomes in Textile Processing. *J. Liposome Res.* **18**, 249–262 (2008).

173. Mirafzali, Z., Thompson, C. S. & Tallua, K. Application of Liposomes in the Food Industry. *Microencapsul. Food Ind.* 139–150 (2014) doi:10.1016/B978-0-12-404568-2.00013-3.
174. Lucio, M., Lima, J. L. F. C. & Reis, S. Drug-Membrane Interactions: Significance for Medicinal Chemistry. *Curr. Med. Chem.* **17**, 1795–1809 (2010).
175. Vauquelin, G. Cell membranes... and how long drugs may exert beneficial pharmacological activity *in vivo*: Exploring the role of cell membranes in PK-PD modelling. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **82**, 673–682 (2016).
176. Kerns, E. H. & Carter, L. D. and G. T. In Vitro Solubility Assays in Drug Discovery. *Curr. Drug Metab.* **9**, 879–85 (2008).
177. Vrbanac, J. & Slauter, R. ADME in Drug Discovery. A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development. *Drug Discov. Metab. Pharmacokinet.* 39–67 (2017).
178. Sikkema, J. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**, 201–222 (1995).
179. Avdeef, A. *Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state.* (Wiley-Interscience, 2003).
180. Ribeiro, M. M. B., Melo, M. N., Serrano, I. D., Santos, N. C. & Castanho, M. A. R. B. Drug–lipid interaction evaluation: why a 19th century solution? *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 449–454 (2010).
181. Loureiro, D. R. P. *et al.* Accessing lipophilicity of drugs with biomimetic models: A comparative study using liposomes and micelles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **115**, 369–380 (2018).
182. Santos, N. C., Prieto, M. & Castanho, M. A. R. B. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1612**, 123–135 (2003).
183. Smeralda, W. *et al.* Microplate assay for lipophilicity determination using intrinsic fluorescence of drugs: Application to a promising anticancer lead, pyridoclast. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2019) doi:10.1016/j.ejps.2019.02.010.
184. Zhang, J., Hadlock, T., Gent, A. & Strichartz, G. R. Tetracaine-Membrane Interactions: Effects of Lipid Composition and Phase on Drug Partitioning, Location, and Ionization. *Biophys. J.* **92**, 3988–4001 (2007).
185. Hein, R., Uzundal, C. B. & Hennig, A. Simple and rapid quantification of phospholipids for supramolecular membrane transport assays. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 2182–2185 (2016).
186. Gloaguen, C. *et al.* First Evidence That Oligopyridines, α -Helix Foldamers, Inhibit Mcl-1 and Sensitize Ovarian Carcinoma Cells to Bcl-x_L-Targeting Strategies. *J. Med. Chem.* **58**, 1644–1668 (2015).
187. Pidgeon, C. *et al.* IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability. *J. Med. Chem.* **38**, 590–594 (1995).
188. Ohno, M., Ikehara, T., Nara, T., Kamo, N. & Miyauchi, S. The elution profile of immobilized liposome chromatography: determination of association and dissociation rate constants. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1665**, 167–176 (2004).
189. Ong, S., Liu, H. & Pidgeon, C. Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. *J. Chromatogr. A* **728**, 113–128 (1996).
190. Yang, C. Y., Cai, S. J., Liu, H. & Pidgeon, C. Immobilized Artificial Membranes — screens for drug membrane interactions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23**, 229–256 (1997).
191. Tsopelas, F., Vallianatou, T. & Tsantili-Kakoulidou, A. Advances in immobilized artificial membrane (IAM) chromatography for novel drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **11**, 473–488 (2016).

192. Russo, G. *et al.* Cytotoxicity of seven bisphenol analogues compared to bisphenol A and relationships with membrane affinity data. *Chemosphere* **201**, 432–440 (2018).
193. Stergiopoulos, C., Makarouni, D., Tsantili-Kakoulidou, A., Ochsenkühn-Petropoulou, M. & Tsopelas, F. Immobilized artificial membrane chromatography as a tool for the prediction of ecotoxicity of pesticides. *Chemosphere* **224**, 128–139 (2019).
194. Tsopelas, F., Giaginis, C. & Tsantili-Kakoulidou, A. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **12**, 885–896 (2017).
195. Valkó, K. L. Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **130**, 35–54 (2016).
196. Ruokonen, S.-K. *et al.* Distribution of local anesthetics between aqueous and liposome phases. *J. Chromatogr. A* **1479**, 194–203 (2017).
197. Kuć, M., Ciešlik-Boczula, K. & Rospenk, M. Anesthetic-dependent changes in the chain-melting phase transition of DPPG liposomes studied using near-infrared spectroscopy supported by PCA. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **186**, 37–43 (2017).
198. Efimova, S. S., Chulkov, E. G. & Ostroumova, O. S. Lipid-mediated mode of action of local anesthetics on lipid pores induced by polyenes, peptides and lipopeptides. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **166**, 1–8 (2018).
199. Pinheiro, M., Magalhães, J. & Reis, S. Antibiotic interactions using liposomes as model lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* **222**, 36–46 (2019).
200. Agis-Torres, A., Sollhuber, M., Fernandez, M. & Sanchez-Montero, J. M. Multi-Target-Directed Ligands and other Therapeutic Strategies in the Search of a Real Solution for Alzheimer's Disease. *Curr. Neuropharmacol.* **12**, 2–36 (2014).
201. Luo, Z. *et al.* Synthesis and Evaluation of Multi-Target-Directed Ligands against Alzheimer's Disease Based on the Fusion of Donepezil and Ebselen. *J. Med. Chem.* **56**, 9089–9099 (2013).
202. Rochais, C. *et al.* Novel Multitarget-Directed Ligands (MTDLs) with Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory and Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Agonist Activities As Potential Agents against Alzheimer's Disease: The Design of Donecopride. *J. Med. Chem.* **58**, 3172–3187 (2015).
203. Jourdan, J.-P. *et al.* Novel benzylidenephénylpyrrolizinones with pleiotropic activities potentially useful in Alzheimer's disease treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **114**, 365–379 (2016).
204. Morris, G. P., Clark, I. A. & Vissel, B. Inconsistencies and Controversies Surrounding the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **2**, 21 (2014).
205. Doig, A. J. *et al.* Why Is Research on Amyloid- β Failing to Give New Drugs for Alzheimer's Disease? *ACS Chem. Neurosci.* **8**, 1435–1437 (2017).
206. Rangachari, V., Dean, D. N., Rana, P., Vaidya, A. & Ghosh, P. Cause and consequence of A β – Lipid interactions in Alzheimer disease pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1860**, 1652–1662 (2018).
207. Matsuzaki, K. Physicochemical interactions of amyloid β -peptide with lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1768**, 1935–1942 (2007).
208. Drolle, E., Hane, F., Lee, B. & Leonenko, Z. Atomic force microscopy to study molecular mechanisms of amyloid fibril formation and toxicity in Alzheimer's disease. *Drug Metab. Rev.* **46**, 207–223 (2014).
209. Briffa, M. *et al.* Extracts from two ubiquitous Mediterranean plants ameliorate cellular and animal models of neurodegenerative proteinopathies. *Neurosci. Lett.* **638**, 12–20 (2017).
210. Malishev, R. *et al.* Toxicity Inhibitors Protect Lipid Membranes from Disruption by A β ₄₂. *ACS Chem. Neurosci.* **6**, 1860–1869 (2015).

211. Lakowicz, J. R. & Masters, B. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. *J. Biomed. Opt.* **13**, 029901 (2008).
212. Biancalana, M. & Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1804**, 1405–1412 (2010).
213. Weinstein, J. N., Blumenthal, R. & Klausner, R. D. Carboxyfluorescein leakage assay for lipoprotein-liposome interaction. *Methods Enzymol.* **128**, 657–668 (1986).
214. Brittes, J., Lúcio, M., Nunes, C., Lima, J. L. F. C. & Reis, S. Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. *Chem. Phys. Lipids* **163**, 747–754 (2010).
215. Neves, A. R., Nunes, C. & Reis, S. New Insights on the Biophysical Interaction of Resveratrol with Biomembrane Models: Relevance for Its Biological Effects. *J. Phys. Chem. B* **119**, 11664–11672 (2015).
216. Neves, P. *et al.* Characterization of membrane protein reconstitution in LUVs of different lipid composition by fluorescence anisotropy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49**, 276–281 (2009).
217. Nunes, C. *et al.* NSAIDs Interactions with Membranes: A Biophysical Approach. *Langmuir* **27**, 10847–10858 (2011).
218. Ruyschaert, J.-M. & Raussens, V. ATR-FTIR Analysis of Amyloid Proteins. *Pept. Self-Assem. Methods Protoc.* **1777**, 69–81 (2018).
219. Pitorre, M. Développement de deux plateformes pharmaceutiques gélifiées: un hydrogel de nanocapsules lipidiques et un organogel avec le même agent de réticulation. (Université d'Angers, 2017).
220. Danaei, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **10**, 57 (2018).
221. Malvern Instruments Ltd. Malvern Zetasizer ZS DLS user manual. (2013).
222. Rouser, G., Fleischer, S. & Yamamoto, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**, 494–496 (1970).
223. Ryan, T. M. *et al.* Ammonium hydroxide treatment of A β produces an aggregate free solution suitable for biophysical and cell culture characterization. *PeerJ* **7**, e73 (2013).
224. Stine, W. B., Jungbauer, L., Yu, C. & LaDu, M. J. Preparing Synthetic A β in Different Aggregation States. *Methods Mol Biol* **670**, 13–32 (2010).
225. Zhang-Haagen, B. *et al.* Monomeric Amyloid Beta Peptide in Hexafluoroisopropanol Detected by Small Angle Neutron Scattering. *PLOS ONE* **11**, e0150267 (2016).
226. Fluidic Analytics Redefines Protein Analysis with the Global Launch of the Fluidity One System, consulté le 01-09-2019. <https://www.fluidic.com/news-and-events/news/fluidity-one-global-launch/>.
227. Luo, J., Ying, K. & Bai, J. Savitzky–Golay smoothing and differentiation filter for even number data. *Signal Process.* **85**, 1429–1434 (2005).
228. Bowen, W. R. & Doneva, T. A. Artefacts in AFM studies of membranes: correcting pore images using fast fourier transform filtering. *J. Membr. Sci.* **171**, 141–147 (2000).
229. Helms, H. Fast Fourier transform method of computing difference equations and simulating filters. *IEEE Trans. Audio Electroacoustics* **15**, 85–90 (1967).
230. Fourier Analysis and Filtering - MATLAB & Simulink, consulté le 01-09-2019. <https://www.mathworks.com/help/matlab/fourier-analysis-and-filtering.html>.
231. Henry, S. *et al.* Interaction of A β _{1–42} Amyloids with Lipids Promotes “Off-Pathway” Oligomerization and Membrane Damage. *Biomacromolecules* **16**, 944–950 (2015).
232. Necula, M., Kaye, R., Milton, S. & Glabe, C. G. Small Molecule Inhibitors of Aggregation Indicate That Amyloid β Oligomerization and Fibrillization Pathways Are Independent and Distinct. *J. Biol. Chem.* **282**, 10311–10324 (2007).

IV-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

233. Greenfield, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* **1**, 2876–2890 (2007).
234. Jackson, M. & Mantsch, H. H. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 95–120 (1995).
235. Miller, L. M., Bourassa, M. W. & Smith, R. J. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1828**, 2339–2346 (2013).
236. Habchi, J. *et al.* Systematic development of small molecules to inhibit specific microscopic steps of A β ₄₂ aggregation in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E200–E208 (2017).
237. Ewald, M. *et al.* High speed atomic force microscopy to investigate the interactions between toxic A β ₁₋₄₂ peptides and model membranes in real time: impact of the membrane composition. *Nanoscale* **11**, 7229–7238 (2019).
238. Henry, S. *et al.* Interaction of A β ₁₋₄₂ peptide or their variant with model membrane of different composition probed by infrared nanospectroscopy. *Nanoscale* **10**, 936–940 (2018).
239. Normand, A. Identification and characterization of human Rad51 inhibitors by screening of an existing drug library. **8** (2014).
240. Roseth, S., Fykse, E. M. & Fonnum, F. Uptake of l-Glutamate into Rat Brain Synaptic Vesicles: Effect of Inhibitors that Bind Specifically to the Glutamate Transporter. *J. Neurochem.* **65**, 96–103 (2002).
241. Drummond, E. & Wisniewski, T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **133**, 155–175 (2017).
242. LaFerla, F. M. & Green, K. N. Animal Models of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006320–a006320 (2012).
243. Pollack, S. J., Hawtin, S. R., Taylor, V. J. & Shearman, M. S. Sulfonated dyes attenuate the toxic effects of β -amyloid in a structure-specific fashion. **4** (1995).

Membranes biomimétiques pour la caractérisation de nouveaux agents thérapeutiques, application à la maladie d'Alzheimer

L'étude des interactions moléculaires au niveau des membranes biologiques est un enjeu capital pour le développement et le screening de nouvelles molécules médicamenteuses. La MA est la forme de démence sénile la plus répandue dans le monde et représente le principal problème socioéconomique en matière de soins de santé. L'apparition et la progression de cette maladie neurodégénérative sont associées à l'agrégation du peptide A β . Une stratégie thérapeutique contre la MA consiste à développer des molécules capables d'interférer à des étapes spécifiques de l'agrégation du peptide. Pour les identifier, des méthodes expérimentales sont nécessaires pour suivre et caractériser le peptide A β au cours de son processus de fibrillation. Ces méthodes doivent être suffisamment simples pour rester compatibles avec une démarche de drug discovery. Dans le présent travail de thèse, nous avons proposé de combiner des méthodes expérimentales pour permettre une caractérisation multiparamétrique de modulateurs potentiels de la fibrillation du peptide A β_{1-42} , en y intégrant des liposomes de composition définie, comme membranes neuronales biomimétiques. Il est en effet établi que les lipides neuronaux sont un facteur important dans la formation des fibres amyloïdes et leur toxicité. Les liposomes ont été formulés par la méthode de réhydratation de film lipidique, et leurs propriétés physico-chimiques caractérisées par RMN, DLS, potentiel ζ . La détermination expérimentale du coefficient de partage de composés d'intérêt a pu être réalisée par spectrophotométrie, y compris de façon originale, par fluorescence, en utilisant ces liposomes, dans des tests miniaturisés. Des études cinétiques de l'agrégation du peptide A β_{1-42} ont été effectuées en présence de liposomes. La fluorescence de la ThT a été mesurée pour suivre la voie de la fibrillation du peptide A β , utilisé dans sa forme sauvage ou celle d'un mutant oligomérique, l'oG37C. Une analyse de fuite d'un fluorophore à partir des liposomes, appuyée par des mesures en DLS, a été réalisée afin d'évaluer l'impact des interactions entre le peptide et les membranes pour prévoir tout effet de déstabilisation. Les fibres toxiques formées par A β étant principalement organisées en feuillets β , les données ont été corrélées à l'analyse de la structure secondaire du peptide par spectroscopie ATR-FTIR. Après avoir mis en œuvre cette approche sur différentes molécules modèles et un hit d'intérêt potentiel dans le traitement de la MA, l'ensemble de ce travail a abouti à un test multiparamétrique permettant la caractérisation de l'interactome molécules/A β /membranes et la discrimination de modulateurs de l'agrégation du peptide A β_{1-42} . Cette approche pourra être avantageusement transposée à d'autres maladies amyloïdes.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, peptide amyloïde bêta, liposomes, drug discovery

Biomimetic membranes for the characterization of new therapeutic agents, application to Alzheimer's disease

The study of molecular interactions at the level of biological membranes is a key issue for the screening and the development of new drugs. Alzheimer's disease (AD) is the most common form of senile dementia in the world and is the leading socio-economic problem in health care. The appearance and progression of this neurodegenerative disease are associated with the aggregation of the amyloid- β peptide (A β). A therapeutic strategy against AD consists in the development of molecules able to interfere with specific steps of A β aggregation. To identify such compounds, experimental methods are required to monitor and characterize the A β peptide during its fibrillation process. These methods must be simple enough to remain compatible with drug discovery. In this PhD project, we have proposed to combine experimental methods to allow a multiparametric characterization of potential A β_{1-42} fibrillation modulators, by integrating liposomes of defined composition as biomimetic neuronal membranes. It is indeed established that neuronal lipids are an important factor in the formation of amyloid fibers and their toxicity. The liposomes were formulated by the lipid film rehydration method, and their physicochemical properties characterized by NMR, DLS, ζ potential. The experimental determination of the compounds partition coefficient could be carried out by spectrophotometry, including in an original way, by fluorescence, these liposomes, in miniaturized tests. Kinetic studies of A β_{1-42} peptide aggregation were performed in the presence of liposomes. The ThT fluorescence was monitored to follow the A β peptide fibrillation pathway, used in its wild form or with an oligomeric mutant, oG37C. A fluorophore leakage analysis from liposomes, supported by DLS measurements, was performed to evaluate the impact of peptide/membranes interactions to predict any destabilization effects. The toxic fibers formed by A β being mainly organized in β -sheets, the data were correlated with the analysis of the peptide secondary structure by ATR-FTIR spectroscopy. After the implementation of this approach on different model molecules and a hit of potential interest in the AD treatment, all of this work has resulted in a multiparametric test allowing the molecules/A β /membranes interactome characterization and the discrimination of A β_{1-42} peptide aggregation modulators. This approach may be advantageously transposed to other amyloid diseases.

Key words: Alzheimer's disease, amyloid beta peptide, liposomes, drug discovery

