N° d'ordre : 4361

THESE

Présentée à

L'Université de Bordeaux I

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par **Ha Phuong TA**

Pour obtenir le grade de

Docteur

Spécialité : chimie-physique

Etude de la relation structure - toxicité des protéines amyloïdes en interaction avec des membranes modèles

Soutenue le 24 Novembre 2011

Après avis de :

M	REZAEI Human, Directeur de recherche, INRA	**Rapporteur**
M	GOORMAGHTIGH Erik, Professeur, Université de Bruxelles	**Rapporteur**

Devant la commission d'examen formée de :

Mme	GIRARD-EGROT Agnès, Professeur, Université Lyon 1	**Examinateur**
M	CULLIN Christophe, Professeur, Université de Bordeaux 2	**Examinateur**
M	GUIRARDEL Matthieu, Ingénieur de recherches, Rhodia	**Invité**
M	SERVANT Laurent, Professeur, Université de Bordeaux 1	**Co-Directeur de thèse**
Mme	LECOMTE Sophie, Chargée de recherche, CNRS	**Directeur de thèse**

Remerciements

Le principal travail de cette thèse a été réalisé au Laboratoire de Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets (CBMN) et je tiens à remercier Monsieur Erick Dufourc de m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant ces trois années.

Je voudrais remercier Madame Sophie Lecomte qui m'a encadrée pendant mes trois années de thèse. Je la remercie pour sa présence quotidienne, sa pédagogie et les nombreuses relectures et modifications du manuscrit. Sans elle, ce travail ne pourrait pas être achevé.

Je tiens à remercier Monsieur Laurent Servant qui est co-directeur de ma thèse, pour m'avoir initié à la microfluidique, pour ses qualités humaines, ses précieux conseils, ses supports et ses disponibilités incroyables.

Mes sincères remerciements pour Monsieur Bernard Desbat qui s'est occupé de moi depuis mes premiers jours au labo. Je lui suis très reconnaissante da sa patience, de ses échanges culturels et surtout du soutien qu'il m'a accordé au cours de ces trois ans.

Je tiens à remercier Madame Agnès Girard-Egrot, président du jury, pour sa participation au jury et pour l'attention remarquable qu'elle a portée à ce manuscrit.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements à Messieurs Human Rezaei et Erik Goormaghtigh pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et ainsi juger en détail mes travaux.

Je voudrais remercier Monsieur Christophe Cullin pour son accueil chaleureux au sein de son laboratoire, pour ses remarques pertinentes sur les expériences ainsi que pour sa participation au jury.

Je remercie vivement Monsieur Matthieu Guirardel pour m'avoir accueillie au LOF, pour m'avoir initiée à la microfabrication, pour sa gentillesse, ses disponibilités et pour les discussions intéressantes.

Je tiens à remercier Karine Berthelot pour ses disponibilités, son énergie de travail et ses demandes rigoureuses. Je la remercie vivement pour sa grande contribution au bon déroulement de cette thèse.

Je remercie Isabel Alves pour m'avoir appris la PWR, pour les discussions fructueuses sur les expériences en PWR et sa disponibilité quotidienne.

Je remercie Sabine Castano pour son aide et son écoute, Gwénaëlle Le Bourdon pour ses conseils et ses disponibilités, Julie Géan pour ses encouragements.

Je remercie Razia Noreen, Enora Prado, Karima Belbachir, Seydou Yao, Thierry Robin et Marie-Lise Jobin pour avoir partagé ces années avec moi et pour leur soutien précieux et tout particulièrement Thierry qui a apporté beaucoup d'énergie dans le projet microfluidique malgré la courte durée de son stage. Je leur souhaite bon courage pour la suite de leurs intéressants sujets.

Je remercie ainsi les autres membres de l'IECB et de CBMN que je n'ai pas cités personnellement, mais qui ont m'accordé une aide précieuse chaque fois que j'en avais besoin.

Enfin, je voudrais remercier mes parents, mon frère et mes amis vietnamiens qui m'ont toujours soutenue et supportée.

Table des matières

Introduction générale **7**

Chapitre I : Etat de l'art **11**

I. Maladies amyloïdoses **13**

I.1. Définition clinique 13

I.2. Impacts sociaux économiques 13

II. Protéines amyloïdes **14**

II.1. Protéines amyloïdes liées aux pathologies 14

II.2. Amyloïdes fonctionnelles 16

II.3. Propriétés des fibres amyloïdes 17

III. Hypothèses de toxicité **20**

III.1. Quelle morphologie est toxique ? 22

III.2. Cible de toxicité dans les maladies amyloïdes 24

III.2.1. Interactions des protéines amyloïdes avec les membranes 25

III.2.1.1. Effets sur la membrane 25

III.2.1.2. Effets sur la fibrillation des protéines amyloïdes 26

III.2.2. Influence de la composition membranaire sur l'interaction avec les protéines amyloïdes 28

III.2.2.1. Effets de la charge des membranes 28

III.2.2.2. Interactions avec des récepteurs membranaires 30

III.2.2.3. Effets de « lipides rafts »: 30

III.2.3. Mécanismes de toxicité proposés 31

III.2.3.1. Effet « carpet » 32

III.2.3.2. Effet de type détergent 32

III.2.3.3. Formation du pore et/ou canaux 33

III.2.4. Modèles d'interaction protéine amyloïde-membrane 34

IV. Protéine HET-s, un modèle pour étudier la toxicité des amyloïdes **35**

IV.1. Protéine HET-s de *Podospora anserina* (*P. anserina*) 36

IV.1.1. HET-s et incompatibilité végétative 36

IV.1.1. Propriétés biochimiques et fibrillation de la protéine HET-s et son domaine prion HET-s (218-289) 38

IV.1.1.1. Fibrillation de la protéine HET-s 38
IV.1.1.2. Domaine prion de la protéine HET-s 39
IV.1.2. Structure tridimensionnelle de l'amyloïde du PFD de HET-s 43
IV.2. Etude de toxicité des amyloïdes – approche mutagenèse aléatoire 46
V. Conclusions et objectifs de la thèse 51
Bibliographie..... 53

Chapitre II : Interactions des protéines amyloïdes non-toxiques et toxiques avec des monocouches de lipides à l'interface air-eau..... 67

I. Introduction..... 69
II. Interactions des protéines amyloïdes WT et M8 avec les monocouches phospholipidiques pures à l'interface air-eau : adsorption, insertion et altération…..70
II.1. Résumé de l'article de Ta et al. dans Langmuir (2011)..... 70
II.2. Publication 70
II.3. Effet de la concentration..... 82
II.4. Influence du pH sur l'agrégation des protéines WT et M8 et leur interaction avec les monocouches de phospholipides 88
II.4.1. Comportement de WT et M8 à l'interface d'une solution HCl à pH 2 89
II.4.2. Interactions de WT et M8 avec la monocouche de DOPG ou DOPI à l'interface d'une solution HCl à pH2..... 90
III. Interactions des protéines de toxicité différente avec les monocouches de DOPG et d'asolectine..... 95
III.1. Auto-assemblage des protéines à l'interface air-eau..... 97
III.1.1. Affinité des protéines pour l'interface 97
III.1.2. Structure secondaire des protéines à l'interface air-eau..... 99
III.2. Interactions des protéines avec les monocouches de DOPG et d'asolectine à l'interface air-eau 100
III.2.1. Insertion..... 100
III.2.2. Morphologie des couches formées..... 101
III.2.3. Structures secondaires des protéines 103
III.2.4. Nature des agrégats formés dans les interactions des protéines WT et M8 avec la monocouche d'asolectine 106
III.3. Conclusions 107
IV. Conclusions générales et discussions..... 108
Bibliographie..... 110

Article “ In vivo and in vitro analyses of toxic mutants of HET-s: FTIR antiparallel signature correlates with amyloid toxicity” 112

Chapitre III : Interactions des protéines amyloïdes WT et M8 avec différents modèles de bicouches lipidiques 129

I. Introduction..... 131

II. Interactions des protéines WT et M8 avec les liposomes..... 131

III. Interaction des protéines WT et M8 avec les bicouches supportées de lipides - Etude par PWR 135

III.1. Formation des bicouches supportées à la surface du cristal PWR 136

III.2. Adsorption des protéines WT et M8 sur les bicouches lipidiques 137

III.2.1. Interactions des protéines avec la bicouche de DOPC 138

III.2.2. Interactions des protéines avec la bicouche d’asolectine 141

III.2.3. Interactions des protéines avec la bicouche de eggPC/DOPG 147

IV. Structure secondaire des protéines amyloïdes WT et M8 en interaction avec les bicouches lipidiques - Etude par ATR-FTIR..... 148

IV.1. Structure secondaire des protéines WT et M8 en interaction avec les liposomes d’asolectine..... 148

IV.2. Structure secondaire des protéines WT et M8 en interaction avec les bicouches lipidiques supportées 151

IV.3. Effets des protéines sur des bicouches lipidiques supportées 156

IV.4. Interactions des fibres matures des protéines WT et M8 avec des bicouches supportées..... 157

V. Conclusions du chapitre..... 158

Bibliographie..... 160

Chapitre IV : Développement d’une cellule microfluidique pour l’étude du processus d’assemblage des protéines amyloïdes et de leur interaction avec les membranes par spectroscopie infrarouge 163

I. Introduction..... 165

II. Hydrodynamique des fluides dans les systèmes microfluidiques 169

II.1. Profile des écoulements 170

II.1.1. Régime d’écoulement 170

II.1.2. Vitesse d’écoulement..... 171

II.1.3. Perte de charge..... 171

II.2. Diffusion hydrodynamique dans les systèmes microfluidiques 172

III. Cahier des charges pour la réalisation de la cellule microfluidique 174
III.1. Choix du matériau 174
III.2. Choix de la géométrie 175
III.3. Choix des dimensions du canal 176
IV. Techniques de microfabrication utilisées 176
IV.1. Lithographie 176
IV.2. Gravure 177
V. Résultats obtenus 178
V.1. Vérification de la diffusion des protéines dans le canal microfluidique 178
V.2. Tests de la formation du canal 180
V.2.1. Formation du canal par gravure humide 180
V.2.2. Formation du canal par lithographie 180
V.3. Tests du collage 182
Bibliographie 186

Conclusions et perspectives 189

Annexes 191

I. Matériels 193
I.1. Lipides et autres produits chimiques 193
I.1.1. Préparations des liposomes lipidiques 194
I.1.2. Préparations des bicouches lipidiques supportées 194
I.2. Purifications des protéines ((HET-s 218-289) et M8) 195
I.2.1. Les solutions utilisées 195
I.2.2. Expression et purification des protéines 197
I.2.3. Préparation des bactéries compétentes – méthode au CaCl2 198
I.2.4. Transformation bactérienne 199
I.2.4.1. Miniprep d'ADN plasmidique 199
I.2.4.2. Expression et purification de HET-s(218-289) et M8 200
I.2.4.3. Protocole de dessalage 202
II. Techniques utilisées 203
II.1. L'ellipsométrie 203
II.1.1. Bref rappel théorique de l'ellipsométrie 203
II.1.2. Montage expérimental 204
II.2. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-FT) 205

II.2.1. Bref rappel théorique 205

II.2.2. Etude *in-situ* des couches minces orientées à l'interface air-eau par PM-IRRAS (Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy) 207

II.2.2.1. Principe et avantages du PM-IRRAS 207

II.2.2.2. Montage expérimental 209

II.2.3. Etude de la structure et orientation des couches par la spectroscopie ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared spectroscopy) 209

II.3. La spectroscopie PWR (Plasmon Waveguide Resonance spectroscopy) 211

II.3.1. Principe général 211

II.3.2. Application aux études d'interactions protéine-lipide 212

II.4. Expérience de détection de la perméabilisation membranaire (relargage de calcéine) 213

III. Méthode pour déterminer l'anisotropie de structure secondaire des couches organisées sur le cristal ATR 214

Bibliographie 216

Curriculum vitae 217

Résumé de thèse

Introduction générale

Les maladies amyloïdes sont des pathologies liées à un repliement anormal des protéines ou des peptides issus du métabolisme normal (Dobson et al. 2003). Ces protéines/peptides capables de changer de conformation et de s'auto-assembler dans des morphologies de fibres amyloïdes sont appelés protéines/peptides amyloïdes. La toxicité des maladies amyloïdes est décrite comme fortement liée à leur processus d'auto-assemblage et à leurs interactions avec des membranes cellulaires dans lesquelles plusieurs espèces formées peuvent contribuer à la toxicité (Aisenbrey et al. 2008). La toxicité des oligomères amyloïdes a été démontrée par plusieurs auteurs utilisant des modèles cellulaires ou membranaires (Walsh et al. 2002; Schaffar et al. 2004; Peters et al. 2009; Williams et al. 2010; Kim et al. 2009). Malgré le nombre important d'études sur ce sujet, les mécanismes moléculaires d'une part des processus d'agrégation et d'autre part induisant la toxicité des protéines amyloïdes restent encore à élucider.

L'objectif de nos travaux de recherche est d'étudier les processus d'auto-assemblage des protéines amyloïdes et leurs interactions avec les membranes afin de mieux comprendre les phénomènes de toxicité de ces protéines. Nous avons choisi de travailler sur la protéine HET-s (218-289) car sa structure a été résolue par RMN du solide (Ritter et al. 2005; Wasmer et al. 2008; Wasmer et al. 2009b; Wasmer et al. 2010; Van Melckebeke et al. 2010; Van Melckebeke et al. 2011; Lange et al. 2009). Cette protéine est le domaine prion de la protéine HET-s du champignon *P. anserina* qui possède une fonction physiologique dans l'incompatibilité végétative de ce champignon (Turcq and Begueret 1998). La protéine HET-s appartient à la famille des protéines prions qui sont des protéines amyloïdes infectieuses, c'est-à-dire capables de se propager. La protéine HET-s (218-289) a été montrée nécessaire et suffisante pour la formation des fibres amyloïdes et la propagation de la protéine HET-s entière (Balguerie et al. 2003).

Exprimée dans *S. cerevisiae*, la protéine HET-s (218-289) (appelée le WT) n'est pas toxique (Taneja et al. 2007). L'idée originale de l'équipe du professeur Cullin à l'IBGC (UMR 5095, CNRS Université Bordeaux 2 ''Victor Segalen'', Bordeaux, France) fût d'essayer de générer des mutants toxiques à partir de cette protéine fonctionnelle et non toxique. Par mutagenèse aléatoire, plusieurs mutants toxiques sur *S. cerevisiae* ont été générés. Le mutant le plus toxique possède 10 mutations de HET-s (218-289), il est noté M8 (Couthouis et al. 2009). Des premières études ont montré des différences très importantes entre WT et M8 au niveau de la morphologie des fibres, de leur structure secondaire et de leur cinétique d'auto-assemblage (Berthelot et al. 2009; Berthelot et al. 2010). La protéine WT forme des fibres longues, de l'ordre de quelque µm de longueur et constituées des protofibres d'environ ~5 nm d'épaisseur au contraire des fibres très courtes de M8 qui sont des

assemblages latéraux des protofibres de l'ordre de 80 nm de longueur et ~10 nm d'épaisseur. De plus, la structure secondaire des fibres de WT est riche en feuillets β parallèles alors que celles du M8 est essentiellement en feuillets β antiparallèles (Berthelot et al. 2009). La fibrillation du M8 est beaucoup plus rapide que celle du WT, avec $t_{1/2}$ d'environ 40 minutes sans la présence d'une phase de latence en comparaison avec celle du WT d'environ 80 minutes avec une phase de latence d'environ 30 minutes (Berthelot et al. 2009). La toxicité du M8 pourrait être liée à sa cinétique et à son *pathway* de formation des fibres (Berthelot et al. 2010).

L'objectif de ma thèse est d'étudier les interactions des deux protéines WT et M8 avec les membranes. Nous avons utilisé différentes techniques physico-chimiques pour suivre l'interaction de ces protéines avec des modèles membranaires afin de corréler les effets possibles au niveau des membranes avec les changements structuraux des protéines. Les modèles membranaires utilisés sont des monocouches ou bicouches de composition lipidique et de charge (négatives, neutres) différentes. La capacité des protéines à s'insérer, à s'adsorber et à induire des modifications morphologiques et structurales aux membranes sera étudiée. Les changements structuraux des protéines et lipides induits par ces interactions seront également déterminés.

L'insertion et l'adsorption des protéines dans/sur les monocouches à l'interface air-eau sont déterminées par un couplage de la tensiométrie (mesure de la pression de surface) et l'ellipsométrie. L'ellipsométrie permet également de déterminer des changements de morphologies au niveau des monocouches lipidiques en interaction avec des protéines. Les changements de structure des protéines et des lipides ont été sondés par spectroscopie infrarouge (PMIRRAS, Polarization Modulation – Infrared Reflection Absorption Spectroscopy ou ATR-FTIR, Attenuated Total Reflection – Fourier Transform Infrared spectroscopy). La perméabilisation des membranes de bicouches lipidiques est déterminée par la spectroscopie de fluorescence. La spectroscopie PWR (Plasmon-Waveguide Resonace) fournit des informations sur les changements d'organisation des bicouches lipidiques supportées sur un cristal PWR. La combinaison de toutes ces techniques a permis d'établir une relation structure-toxicité des protéines amyloïdes en interaction avec des membranes modèles.

Dans les interactions protéine amyloïde – membrane, il y a toujours plusieurs espèces (monomère, oligomères, protofibres, fibres) qui peuvent coexister et rendre difficile la détermination et la caractérisation d'espèce(s) toxique(s). De plus, isoler des fragments homogènes d'un point de vue de morphologie et/ou en structure est difficile à l'échelle macroscopique. La microfluidique pourrait permettre d'atteindre cet objectif. Les dispositifs

microfluidiques offrent la possibilité d'étudier avec une résolution d'acquisition temporelle de l'ordre de la ms les cinétiques de réactions chimiques très rapides (Song and Ismagilov 2003; Kaun et al. 2006), les changements de conformations et d'orientations (Pan et al. 2002; Yamashita et al. 2008) et l'élongation de macromolécules biologiques (Knowles et al. 2011). Ces propriétés sont pertinentes pour l'étude de l'auto-assemblage des protéines amyloïdes et leurs interactions avec des membranes modèles par exemple les liposomes dans des canaux microfluidiques. Nous avons au cours de ma thèse commencé une étude de faisabilité du couplage des systèmes microfluidiques et la détection par FTIR des protéines, avec pour objectif d'étudier précisément les différents états d'auto-assemblages et leurs interactions avec les membranes modèles.

Ce manuscrit présente mon travail de thèse, il se compose de quatre parties.

Le **premier chapitre** expose un état de l'art général sur les protéines amyloïdes et plus particulièrement sur les études biophysiques de leurs interactions avec les membranes en relation avec leur toxicité.

Le **second chapitre** décrit l'étude de l'interaction des protéines amyloïdes avec des monocouches lipidiques à l'interface air-eau. Les techniques utilisées dans ce chapitre sont la tensiométrie, l'ellipsométrie et la spectroscopie PM-IRRAS.

Le **troisième chapitre** est consacré aux résultats obtenus pour les études des interactions des protéines (WT et M8) avec des bicouches lipidiques, modèles plus proches des membranes biologiques. Afin d'étudier ces interactions, la spectroscopie de fluorescence, la spectroscopie PWR (Plasmon-Waveguide Resonance) et la spectroscopie ATR-FTIR sont utilisées.

Le **quatrième chapitre** présente nos premiers travaux sur le développement d'une cellule microfluidique adaptable à la détection *en ligne* des protéines par spectrométrie infrarouge.

En **annexe**, nous présenterons les travaux expérimentaux pour la préparation des protéines et les autres échantillons utilisés ainsi que les méthodes expérimentales utilisées dans nos études.

Nous terminons avec des **conclusions générales** des résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse et indiquerons les **perspectives** et développements futurs de ce travail.

Chapitre I.

Etat de l’art

I. Maladies amyloïdoses

I.1. **Définition clinique**

Les maladies amyloïdoses sont les maladies associées au mauvais repliement des protéines fonctionnelles solubles et à l'agrégation de celles-ci en des plaques extracellulaires (**Figure I – 1**) de fibres bien organisées qui tuent les cellules ou les empêchent de fonctionner correctement (pour revue : (Tan and Pepys 1994; Chiti and Dobson 2006; Hebda and Miranker 2009; Pepys 2006). Ces maladies peuvent être sporadiques ou héréditaires (les maladies neurodégénératives, les maladies amyloïdes systémiques) (Sattianayagam et al. 2009) ou infectieuses (les maladies à prions) (Prusiner 1982, 1994).

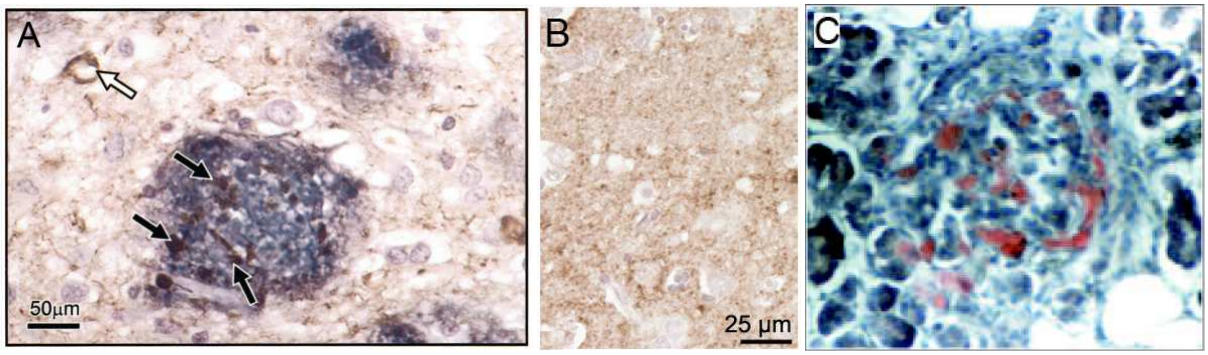


Figure I - 1: (A) Coupe du cortex frontal d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Double immunohistochimie utilisant les anticorps monoclonaux 1E8 Aβ (bleu) et anti-tau (brun) (McLean et al. 1999). (B) Dépôts de la protéine PrP^{Sc} dans le cerveau des patients atteints de la maladie CJD (Creutzfeldt-Jakob disease) (Wadsworth and Collinge 2011). (C) Ilots de Langerhans d'un patient du diabètes de type 2 colorés au rouge Congo (Haataja et al. 2008).

Une caractéristique unique du groupe des maladies amyloïdes à prions est leur transmissibilité entre les individus (et dans certains cas, avec une probabilité beaucoup plus faible, entre les espèces). La transmission est probablement le résultat d'ingestion, d'une source externe, de protéines prions déjà agrégées (Dobson 2002). Les maladies à prions ou encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles incluent entres autres : la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD), la maladie de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), la maladie kuru et l'insomnie fatale familial (FFI) chez les humains et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) chez les bovins ou encore la tremblante chez les ovins (Prusiner 1982, 1994).

I.2. **Impacts sociaux économiques**

A l'heure actuelle, 27 maladies avec des dépôts extracellulaires de fibres protéiques sont connues chez l'homme (Sipe et al. 2010).

Les amyloïdoses incluent certaines des maladies les plus redoutées et coûteuses dans le monde occidental (la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, le diabètes de type

II…) (Dobson 2002). Les dépenses liées à ces maladies ont une répercussion économique très importante sur le système de santé, sur la société et sur les patients eux-mêmes. L'estimation des coûts globaux varie d'un pays à l'autre, mais la principale composante des coûts directs est liée à l'hospitalisation des patients et aux coûts de soins infirmiers à domicile. Les coûts indirects résultent de la perte de productivité et la dépendance qu'entrainent ces maladies (Findley 2007). Les amyloses systémiques sont souvent fatales et représentent environ un décès sur mille dans les pays développés (Pepys 2006).

II. Protéines amyloïdes

Toutes ces maladies, qu'elles soient sporadiques, familiales ou transmissibles, sont associées à des dépôts dans les tissus des protéines qui sont normalement solubles – appelées des protéines amyloïdes. Elles sont extrêmement diverses en séquence primaire et en structure secondaire de la protéine native (Chiti and Dobson 2006; Eichner and Radford 2011).

La capacité des protéines à changer de conformation est l'essence des amyloïdoses (Dobson 2002). Une caractéristique remarquable de la toxicité amyloïde est qu'elle semble être une propriété générique de polypeptides (Bucciantini et al. 2002; Stefani and Dobson 2003; Pastor et al. 2008). Il semble aussi être une propriété commune des polypeptides d'être induits à former des structures amyloïdes dans certaines conditions spécifiques (Tartaglia et al. 2008).

Il existe également des protéines amyloïdes dont la forme amyloïde possède des rôles physiologiques.

II.1. **Protéines amyloïdes liées aux pathologies**

Le **Tableau I – 1** présente quelques protéines amyloïdes et les maladies dans lesquelles elles sont impliquées.

Tableau I - 1: Exemples et classification des maladies humaines associées à la formation de dépôts amyloïdes extracellulaires ou des inclusions intracellulaires caractéristiques de type amyloïde (Chiti and Dobson 2006; Gillmore and Hawkins 2006; Sattianayagam et al. 2009; Pepys 2006).

Maladie	Protéine / peptide impliqué	Nombre de résidus	Structure native	Lésion ou effets pathologiques
Maladies neurodégénératives				
Maladie d'Alzheimer [a]	Peptide amyloïde beta, Aβ	40 ou 42	Non structuré	La perte irréversible des neurones, en particulier dans le cortex et l'hippocampe. (Nussbaum and Ellis 2003)
Encephalopathie spongiforme [a, b]	Prion	253	Résidus 1-120: non structuré ; Résidus 120-230 hélice α	Changement de spongiforme, perte neuronale, gliosis (astro- et microglie), l'accumulation de PrP^{Sc} (Budka 2003)
Maladie de Parkinson [a]	α-synucléine	140	Non structuré	La perte des neurones dopaminergiques dans la substance noire (SN) et la présence des inclusions intracellulaires contenant d'α-synucléine (el-Agnaf and Irvine 2002; Fahn 2003)
Maladie de Huntington [c]	Huntingtine – poly Q	3144	Principalement non structuré	Neurones (inclusions intra-nucléus)
Amyloïdoses non neuropathiques localisées				
Diabète du type II [c]	Amyline	37	Non structuré	Perte de cellules β dans diabètes de type 2 et tumeurs de cellules β dans l'insulinoma (Kahn et al. 1999)
Amyloses non neuropathiques systémiques				
Amyloïdosis ApoAI [c]	L'extrémité N-terminal du apolipoprotéin AI	80–93	Non structuré	Autosomal dominant Majoritairement non-neuropathique avec lésion viscérale en essentiel
Amyloïdosis ApoAII [c]	L'extrémité N-terminale du apolipoprotéin AII	98	Inconnu	Autosomal dominant Non-neuropathique avec essentiellement des lésions rénales
Amylose AL (primaire) [a] (amylose primaire)	Immunoglobuline (chaîne légère ou fragments)	~90	Feuillet β	Lésions dans des voies respiratoires, des voies génito-urinaires, ou la peau
Amylose AA (inflammatoire) [d] (amylose secondaire ou réactive)	Protéine amyloïde A sérume (fragments)	76-104	Hélice α	Souvent associé aux maladies inflammatoires chroniques
l'amylose de la lysozyme [c]	Mutants de lysozyme	130	Hélice α + feuillet β	Autosomal dominant Non-neuropathique avec principalement des lésions rénales et gastroinstestinales
l'amylose du fibrinogène [c]	Fibrinogène (chaîne α)	27-81	Inconnu	Autosomal dominant Non-neuropathique souvent avec une neuropathie importante
Amylose systémique sénile [a]	Transthyrétine normale	127	Feuillet β	Lésions cardiaques prédominantes et lésions dans les reins et les voies respiratoires

a : majoritairement sporadique
b : 5% des cas sont transmis
c : majoritairement héréditaire
d : les données concernent le nombre de résidus des chaînes polypeptides présentes dans les agrégats amyloïdes, et non des protéines précurseurs.

II.2. **Amyloïdes fonctionnelles**

La formation de fibres amyloïdes n'induit pas obligatoirement une toxicité. Il existe des protéines dont la forme amyloïde n'est associée à aucune maladie comme : le domaine SH3 de l'enzyme phosphatidyl inositol 3'- kinase du bovine ou l'extrémité N-terminale de la protéine HypF chez *E. coli* (Bucciantini et al. 2002). Il y a ainsi des protéines dont la forme amyloïde a une fonction bénéfique dans les systèmes vivants d'où le concept de « amyloïde fonctionnelle » (Chiti and Dobson 2006).

Les propriétés uniques des structures amyloïdes ont été exploitées par certaines espèces, notamment des bactéries (Chapman et al. 2002; Barnhart and Chapman 2006), des champignons (Wickner et al. 2007; Halfmann et al. 2010) et même des mammifères, à des fins particulières (Fowler et al. 2006; Fowler et al. 2007) (**Tableau I - 2**).

Tableau I - 2: Quelques protéines amyloïdes fonctionnelles et leurs fonctions spécifiques (Chiti and Dobson 2006; Wickner et al. 2007).

Protéine	**Organisme**	**Fonction des fibres amyloïdes formées**
Curli	*Escherichia coli* (bactérie)	Coloniser les surfaces inertes et adhérer aux hôtes
Chaplines	*Streptomyces coelicolor* (bactérie)	Diminuer la tension de surface de l'eau et permettre le développement des hyphes aériens
Hydrophobin EAS	*Neurospora crassa* (champignon)	Diminuer la tension de surface de l'eau et permettre le développement des hyphes aériens
Ure2p (prion)	*Saccharomyces cerevisiae* (levure)	Forme prion [URE3] promouvoir l'utilisation des sources pauvres en azote
Sup35p (prion)	*Saccharomyces cerevisiae* (levure)	Forme prion [PSI$^+$] facilite le « readthrough » du codon STOP dans la traduction
Rnq1p (prion)	*Saccharomyces cerevisiae* (levure)	Forme prion [PIN$^+$] induit le phénotype [PSI$^+$] *de novo*
HET-s (prion)	*Podospora anserina* (champignon)	Déclencher l'hétérokaryon végétative
Isoforme neuronale spécifique de CPEB (prion) (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding)	*Aplisia californica* (escargot marine)	CPEB se lie aux ARNm, activant localement leur traduction et stabilisant les synapses pour les activités de mémoire à long terme
Protéines de chorion de coquille d'œuf	*Bombyx mori* (ver à soie)	Protéger l'ovocyte et le développement de l'embryon
Spidroine	*Nephila edulis* (araignée)	Former des fibres de la toile
Pmel17	*Homo sapiens*	Catalyser la polymérisation de la mélanine au cours de sa synthèse

L'existence des amyloïdes fonctionnelles chez les bactéries jusqu'à l'être humain est une indication directe que les fibres amyloïdes, formées dans des conditions bien contrôlées pourraient avoir des rôles biologiques spécifiques.

II.3. **Propriétés des fibres amyloïdes**

Au contraire de l'hétérogénéité des protéines amyloïdes, les fibres amyloïdes connues partagent des propriétés biochimiques et structurales communes remarquables (Tan and Pepys 1994; Chiti and Dobson 2006).

Les principaux critères pour définir des fibres amyloïdes

Par définition, les fibres amyloïdes sont des fibres protéiques insolubles, déposées principalement dans les espaces extracellulaires résultant d'un changement de conformation de protéines *(nomenclature de ISA- XII International Symposium on Amyloidosis* – (Sipe et al. 2010).

Les critères suivants peuvent être utilisés afin de définir si une protéine est amyloïde ou non (Nilsson 2004) :

- Morphologie fibrillaire
- Les fibres entièrement en hélice α sont exclues
- Un score total de 4 doit être atteint en satisfaisant une combinaison des critères suivants (**Tableau I - 3**):

Tableau I - 3: Critères pour pouvoir classer des fibres amyloïdes

Caractéristique	**Score pour un test positif**
Structure secondaire en feuillets β	2
Association au rouge Congo (via essais microscopique ou spectroscopique)	2
Association au Thioflavine T ou Thioflavine S	2
Formation de gel (augmentation de la viscosité)	1
Intermédiaire protofibres ou l'accélération de fibrillation induite par fragments de fibres	1
Résistance à la protéase ou au dénaturant	1

Les fibres amyloïdes sont les structures stables d'un point de vue cinétique (Dobson 2003; Selkoe 2003) qui persistent durablement et s'accumulent en des plaques amyloïdes visibles (Dobson 2003). La formation des fibres amyloïdes est un processus dépendant de la nucléation (Westermark 2005; Eichner and Radford 2011). Les fibres amyloïdes sont rigides, insolubles dans les solutions physiologiques, relativement résistantes aux protéases, associées à une augmentation/un déplacement de la fluorescence de la Thioflavine T (ThT) et fixe le rouge Congo de façon à produire la biréfringence verte sous la lumière polarisée (Makin and Serpell 2005; Gillmore and Hawkins 2006). Cette biréfringence (souvent jaune-verte ou bleu-verte) est due à un arrangement orienté des molécules de rouge Congo sur les fibres amyloïdes (Howie and Brewer 2009). Il faut noter également que le test avec le rouge Congo peut donner des faux positifs et négatifs (Nilsson 2004; Pepys 2006).

Les fibres amyloïdes peuvent être visualisées par la microscopie électronique à transmission (TEM) ou par la microscopie à force atomique (AFM). Les amyloïdes sont les fibres non ramifiées, de largeur de 7 à 12 nm et de longueur variables (Makin and Serpell 2005) (**Figure I – 2, A i-iii**). Chaque fibre est constituée de 2 à 6 protofilaments qui s'enroulent dans une structure de câble ou s'associe latéralement pour former un ruban (Makin and Serpell 2005; Goldsbury et al. 2011) (**Figure I – 2, A i-iii, B i-iii**).

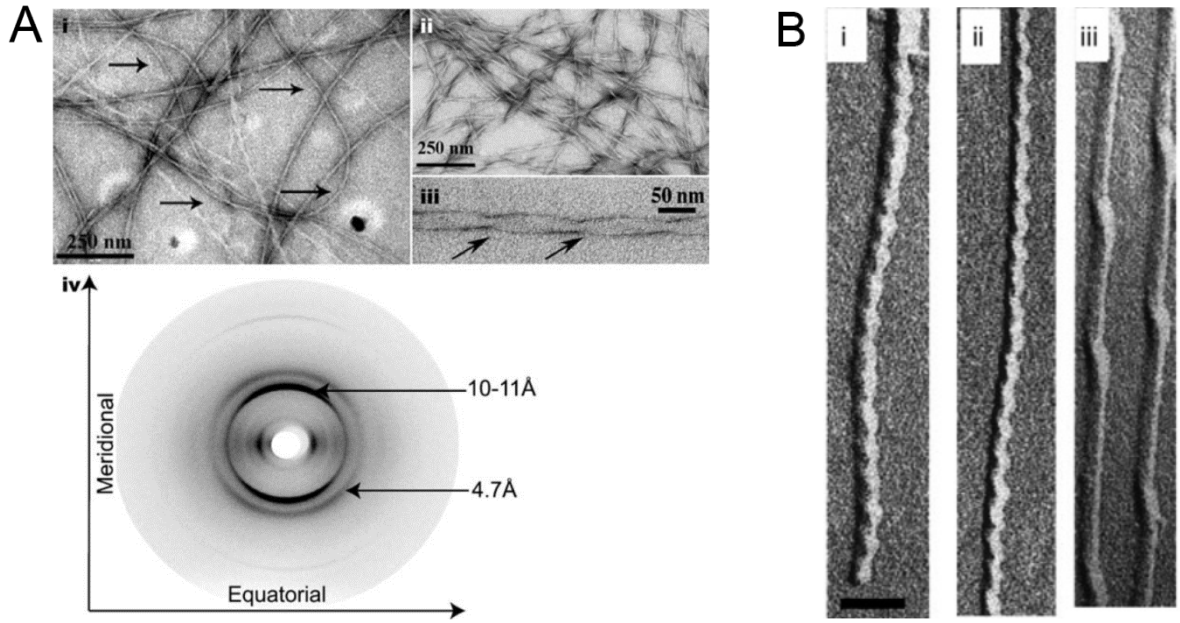


Figure I - 2: (A) Images de microscopie électronique typique de fibres amyloïdes montrant (i) leur linéarité, leur nature non ramifiée et flexible, (ii et iii) des tortillons de fibrilles répétés à intervalles régulières. (iv) Diffraction aux rayons X classique de fibres amyloïdes. L'arc de 4,7 Å méridionale est du à l'espacement entre les brins β, avec les chaînes peptidiques perpendiculaires à la direction de l'axe des fibres. La distance équatoriale entre les feuillets β est de ~ 10-11 Å et varie avec la composition de la chaîne latérale (Extrait de (Harrison et al. 2007)). (B) Images de microscopies électroniques des fibres de Aβ (i, iii) et d'amyline (ii) sont des structures de type ruban ou câble et tournent vers la gauche, avec un pas de 25 nm (i, ii) (Extrait de (Goldsbury et al. 2011).

Les fibres amyloïdes sont ainsi déterminées par une structure cross β c'est-à-dire avec les brins β s'enroulant perpendiculairement à l'axe de fibres (Sunde et al. 1997; Eichner and Radford 2011). La distance entre les brins β est de 4.7 Å, la distance réflexion ~9.8 Å (**Figure I – 2, A-iv**) est due à la distance équatoriale entre les feuillets β perpendiculaires à l'axe de fibres (Eanes and Glenner 1968; Geddes et al. 1968; Baxa 2008). La transition structurale des structures natives vers cette structure de type cross β caractéristique des fibres amyloïdes a été reportée pour plusieurs protéines amyloïdes (Wang et al. 2011) (Aβ 1-42) ; (Kim et al. 2009) (α-synucléine) ; (Frare et al. 2009) (lysozyme)…

La structure riche en feuillets β des agrégats amyloïdes (*ex vivo* ou *in vitro*) a également été confirmée par plusieurs études récentes utilisant le dichroïsme circulaire, la spectrométrie infrarouge et la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Harrison et al. 2007).

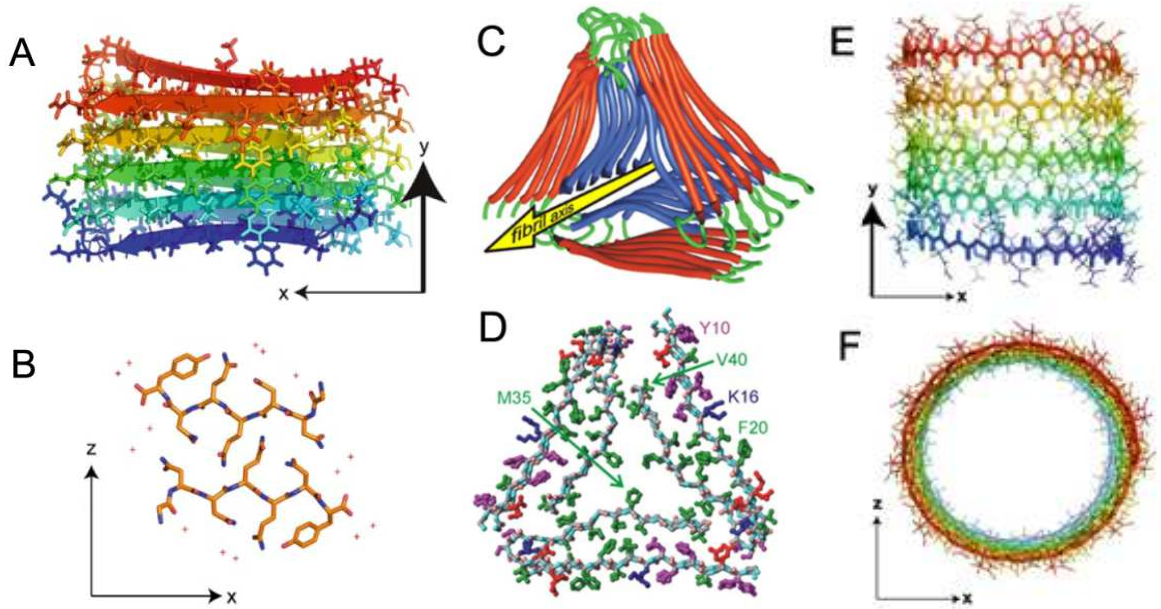


Figure I - 3: Structure cross β des fibres amyloïdes : (A) La structure RMN du solide de Aβ 18-42 (Luhrs et al. 2005) ; (B) « Steric zipper » de crystal GNNQQNY (de Sup35) : vue de dessus de deux molécules appartenant à deux feuillets complémentaires dans la structure cross β spine (Images extraites de (Harrison et al. 2007)). (C-D) Structure triangle de β-hélice proposé pour les fibres de Aβ (Paravastu et al. 2008). (E-F) Structure β-hélice proposée pour les fibres amyloïdes de Perutz et al. (2002) montrant des brins β alignés (E) et le « nanotube » vue de dessus (F). L'axe de fibre est dans l'axe y. (Images extraites de (Harrison et al. 2007)).

Plusieurs modèles pour la structure cross β des fibres ont été proposés (**Figure I - 3**). Les modèles de structure « zipper stérique » (**Figure I – 3, A, B**) (Nelson et al. 2005; Sawaya et al. 2007) sont différents dans l'organisation des brins β des feuillets (parallèle ou antiparallèle) et dans la façon dont les paire-de-feuillets se rassemblent pour former une fibre (*face-to-face, face-to-back, back-to-back*). Cette structure a été observée pour des fibres formées à partir des courts fragments (de 6 à 29 résidus) des différents protéines/peptides : Aβ, α-synucléine, hIAPP, insuline, tau, lysozyme, calcitonine, prion Sup35 (Sawaya et al. 2007).

Alternativement, des structures de type β-hélices ou nanotubes sont proposées (Perutz et al. 2002; Paravastu et al. 2008). Dans ces modèles, un ou plusieurs feuillets β étendus s'enroulent autour d'un noyau creux de façon hélicoïdale et les brins adjacents de l'hélice sont reliés par des liaisons hydrogène (**Figure I – 3, C-F**). Pour la protéine HET-s (218-289), l'objet de cette étude, la reconstruction 3D des fibres a révélé une structure β-hélice parallèle de trois faces (Wasmer et al. 2008). Cette structure sera détaillée dans la partie **IV.1.2** de ce chapitre (page 43).

D'autres modèles d'assemblage de fibres amyloïdes conservent principalement la structure native des monomères (Ure2p-un prion de la levure, transthyrétine) (Makin and Serpell 2005).

Existe-t-il des polymorphismes au sein d'une classe d'agrégats amyloïdes ?

Le polymorphisme est observé entre les fibres d'une protéine ou de différentes protéines (Kodali and Wetzel 2007; Kreplak and Aebi 2006; Goldsbury et al. 2011). Ce polymorphisme pourrait être dû simplement au nombre (**Figure I – 4, A**) (Goldsbury et al. 1997; Goldsbury et al. 2011) et à la façon dont les protofilaments s'associent entre eux pour former des fibres matures (**Figure I – 4, B**) (Goldsbury et al. 2000; Meinhardt et al. 2009; Goldsbury et al. 2011) ou il pourrait être associé à un polymorphisme de structure au niveau moléculaire dans la différence de conformation des polypeptides constituants (Heise et al. 2005; Petkova et al. 2005; Toyama et al. 2007; Kodali and Wetzel 2007; Miller et al. 2009).

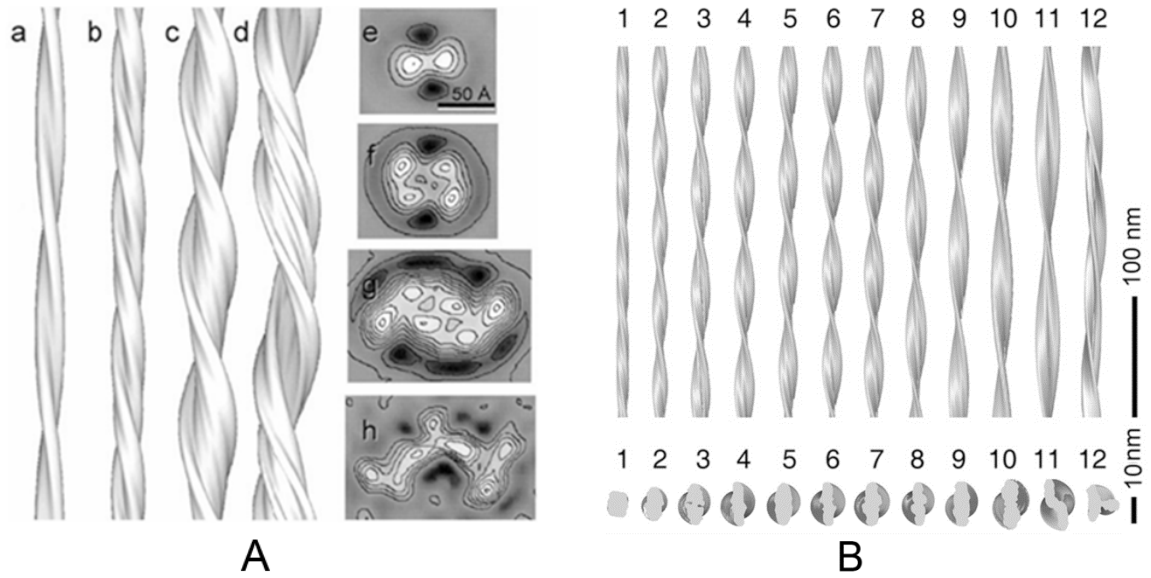


Figure I - 4: (**A**) Représentation 3D et coupe de quatre structures de fibres de l'insuline bovine. (*a et e*) Structure de fibres formées par deux protofibres torsadent entre eux. (*b* et *f*) Fibres formées de quatre protofibres. (*c* et *g*) Fibres formées de six prptofilaments (*d et h*) "The twisted ribbon". (*e–h*, bar = 50 Å) (Jimenez et al. 2002). (**B**) Micrographes électroniques des 12 types de fibres de peptide Aβ (1-40) formées dans un tampon borate de sodium 50 mM à pH 7,8 à 22°C. Vue de coté (haute) et vue de coupe des fibres (basse) (Meinhardt et al. 2009).

III. Hypothèses de toxicité

Dans certaines maladies impliquant l'agrégation des protéines comme des amyloses systémiques, la pathogenèse est souvent associée à l'accumulation de grande quantité (voire quelques kilogrammes dans certains cas) de dépôts amyloïdes qui peut perturber/affecter physiquement les organes spécifiques et donc le bon fonctionnement des tissus et organes liés. Cette perturbation pourrait être le facteur le plus important dans la pathogenèse de ces maladies (Tan and Pepys 1994; Chiti and Dobson 2006). Dans le cas des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, les symptômes primaires sont certainement le résultat d'une toxicité associée à l'agrégation des protéines amyloïdes (Taylor et al. 2002)

Il est ainsi affirmé que la toxicité est liée à l'agrégation des protéines amyloïdes en général, indépendamment de séquence peptidique, longueur et chiralité des protéines amyloïdes précurseurs (Bucciantini et al. 2002; Pastor et al. 2008).

Le processus de formation de fibres et de plaques amyloïdes à partir du peptide monomérique soluble, sujet de nombreuses recherches, n'a pas encore été élucidé. Mais il est admis que ce processus passe par l'association de petits agrégats ordonnés ou unités de nucléation, dont la croissance va déboucher sur de longs protofilaments qui s'enroulent ou se rassemblent latéralement pour former des fibres amyloïdes matures comme schématisé sur la **Figure I - 5** (Chiti and Dobson 2006; Kodali and Wetzel 2007).

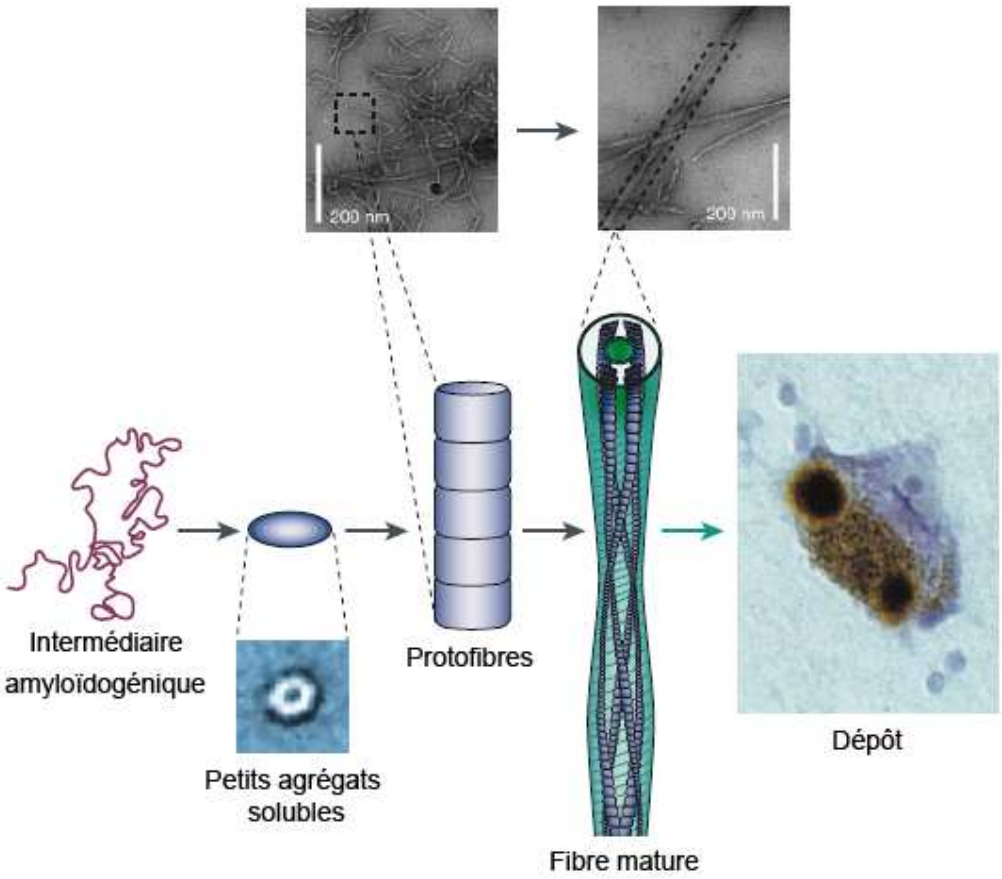


Figure I - 5: Représentation schématique du processus de formation des fibres amyloïdes (adapté de (Dobson et al. 2003)).

L'existence des inhibiteurs qui bloquent sélectivement soit la formation des oligomères toxiques soit la formation des fibres amyloïdes (Necula et al. 2007; Kodali and Wetzel 2007) suggère que les oligomères toxiques ne sont pas obligatoirement des produits *on-pathway* de la formation des fibres.

Pour une meilleure compréhension de la toxicité des espèces formées au cours de l'amyloïdose, voici une courte définition de termes utilisés (Goldsbury et al. 2011):

Tableau I - 4: Termes décrits des espèces formées au cours de la formation des fibres amyloïdes

Monomère	Les protéines amyloïdes composantes principales des plaques
Nucléus	Dans le contexte de la polymérisation, le nucléus est un état très rare qui contrôle la cinétique globale de la formation amyloïde. Une fois formés, les nucléus ne s'accumulent pas, ils peuvent s'agréger pour former des fibres ou se désagréger (Kodali and Wetzel 2007).
Oligomères	Les complexes auto-assemblés de protéines ou peptides amyloïdes mais pas en forme de fibre/filament. Les petits oligomères solubles pourraient être produits comme intermédiaires dans la formation des fibres matures ou être le résultat d'une fragmentation des agrégats plus grands ou des fibres matures (Martins et al. 2008; Glabe 2009; Tomic et al. 2009) ou être des produits *off-pathway* d'un mécanisme alternatif d'agrégation (Necula et al. 2007; Haataja et al. 2008; Meier et al. 2006; Ehrnhoefer et al. 2008).
Protofibres	= Protofilaments : Les sous-unités de fibres en général (Makin and Serpell 2005) ou des fois des premières fibres peu stables apparues dans le processus d'agrégation. Les protofibres sont courtes, de forme de tiges ou globulaires (Kodali and Wetzel 2007). Malgré sa définition, les protofibres pourraient être les produits semi-stables d'un *off-pathway* (Goldsbury et al. 2011).
Fibres	= Filaments, amyloïdes : Les dépôts fibrillaires finaux

La nature moléculaire des espèces intermédiaires dans la fibrillation reste encore mal décrite à cause de leur nature métastable (Kodali and Wetzel 2007) ou de la difficulté pour les isoler (Eichner and Radford 2011). Un consensus général des points communs et différences des assemblages intermédiaires n'est pas encore abouti. Quelques auteurs ont démontré que les intermédiaires *on pathway* possèdent une structure similaire en feuillets β (Chimon et al. 2007; Frare et al. 2009) ou différente de celle des fibres, soit en feuillets β (Kim et al. 2009; Cerf et al. 2009) soit désordonnée (Ahmed et al. 2010). Les oligomères *on pathway* deviennent de plus en plus stables au cours de l'assemblage (Orte et al. 2008; Smith et al. 2010).

Malgré le nombre important d'études portant sur les protéines amyloïdes, les mécanismes moléculaires d'auto-assemblages conduisant à la toxicité ne sont toujours pas connus. Plusieurs aspects essentiels restent à élucider: ***Quelle morphologie est toxique ? Quelle est la cible ? Et quel est le mécanisme de toxicité ?***

III.1. **Quelle morphologie est toxique ?**

La toxicité des protéines amyloïdes est liée à leurs processus d'auto-assemblage (Chiti and Dobson 2006; Aisenbrey et al. 2008). Au cours de ces processus, plusieurs morphologies sont apparues : monomère, oligomères, protofibres, fibres. Chacun ou plusieurs d'entre eux peuvent contribuer à la pathogénie des amyloïdoses (Lansbury and Lashuel 2006).

Actuellement, de plus en plus d'indications montrent que ceux sont plutôt les intermédiaires, les oligomères solubles formés au cours de fibrillation qui sont les formes toxiques (Lopes et al. 2007; Glabe 2009; Malchiodi-Albedi et al. 2011).

D'une part, parce que les altérations pathologiques sont fréquemment observées avant l'apparition des dépôts amyloïdes (Moechars et al. 1999; Larson et al. 1999; Westerman et al. 2002; Palop et al. 2003; Westphalen et al. 2003; Schaffar et al. 2004; Billings et al. 2005; Hermann et al. 2009).

D'autre part, il existe une cohérence entre le niveau des espèces solubles avec des conséquences pathologiques dans les maladies amyloïdoses. La sévérité des traumatismes de mémoire et des dysfonctionnements cognitifs corrèlent bien avec le niveau élevé des oligomères dans le cerveau (McLean et al. 1999; Lue et al. 1999; Tomic et al. 2009) (Aβ) ; (Minaki et al. 2009) (PrP). La quantité des oligomères solubles des protéines amyloïdes dans le cerveau des patients atteints de la maladie est significativement plus grande que les non-atteints (Ferreira et al. 2007) (Aβ), (Paleologou et al. 2009) (α-synucléine) (jusqu'à 70 fois plus grande dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer) (Ferreira et al. 2007).

De plus, ce sont les oligomères d'Aβ mais ni les monomères ni les fibres amyloïdes, qui perturbent la plasticité synaptique *in vivo* à des concentrations retrouvées dans le cerveau humain et le liquide céphalo-rachidien (Walsh et al. 2002). *In vitro*, les oligomères de l'Aβ (1-42) sont plus toxiques que des fibres (Ahmed et al. 2010). Les oligomères solubles de α-synucléine sont reconnus par l'anticorps A11 - un anticorps pour neurotoxicité des oligomères (Kim et al. 2009). Ainsi, l'inhibition de la formation des fibres d'hIAPP par la rifampicine n'induit pas une diminution de la formation des oligomères toxiques et n'empêche pas la mort des cellules β (Meier et al. 2006).

En complément, il y a également d'autres preuves qui excluent l'effet toxique des monomères et des fibres matures (Lansbury and Lashuel 2006). Un des arguments les plus importants dans le cas des monomères est un manque de corrélation directe entre la forte concentration physiologique de protéines amyloïdes à l'état de monomère et la pathogénie (le commencement et la progression) des maladies amyloïdes (par exemple : α-synucléine dans la maladie de Parkinson, SOD1 dans la maladie sclérose latérale amyotrophique (ALS) (Lansbury and Lashuel 2006). Idem pour les fibres matures, il n'y a pas de corrélation directe entre des dépôts amyloïdes et les symptômes pathologiques ainsi que leur sévérité chez des patients et des modèles animaux atteints des maladies amyloïdes (Bell 1959; Auluck et al. 2002; Lo Bianco et al. 2002; Masliah et al. 2000; Petkova et al. 2005; Oddo et al. 2006; Lansbury and Lashuel 2006; Ferreira et al. 2007; Haataja et al. 2008).

Des preuves génétiques soutiennent également la théorie de toxicité des oligomères: la mutation "Arctique" (E693G) de la protéine précurseur d'Aβ, associée à une manifestation précoce héréditaire de la maladie d'Alzheimer, augmente *in vitro* la formation de protofibres mais pas de fibres (Nilsberth et al. 2001). Dans le cas de l'α-synucléine pour des mutants qui forment des oligomères, la perte dopaminergique et la mort cellulaire chez les rats modèles sont fortement augmentées (Winner et al. 2011).

Toutes ces informations suggèrent que les formes oligomériques des protéines amyloïdes peuvent représenter les principales espèces toxiques dans les amyloïdoses. Glabe (2006) a proposé un mécanisme commun des maladies amyloïdoses dans lequel l'effet de perméabilisation des membranes par les oligomères est la principale cause de la mort cellulaire (**Figure I - 6**) (Glabe 2006).

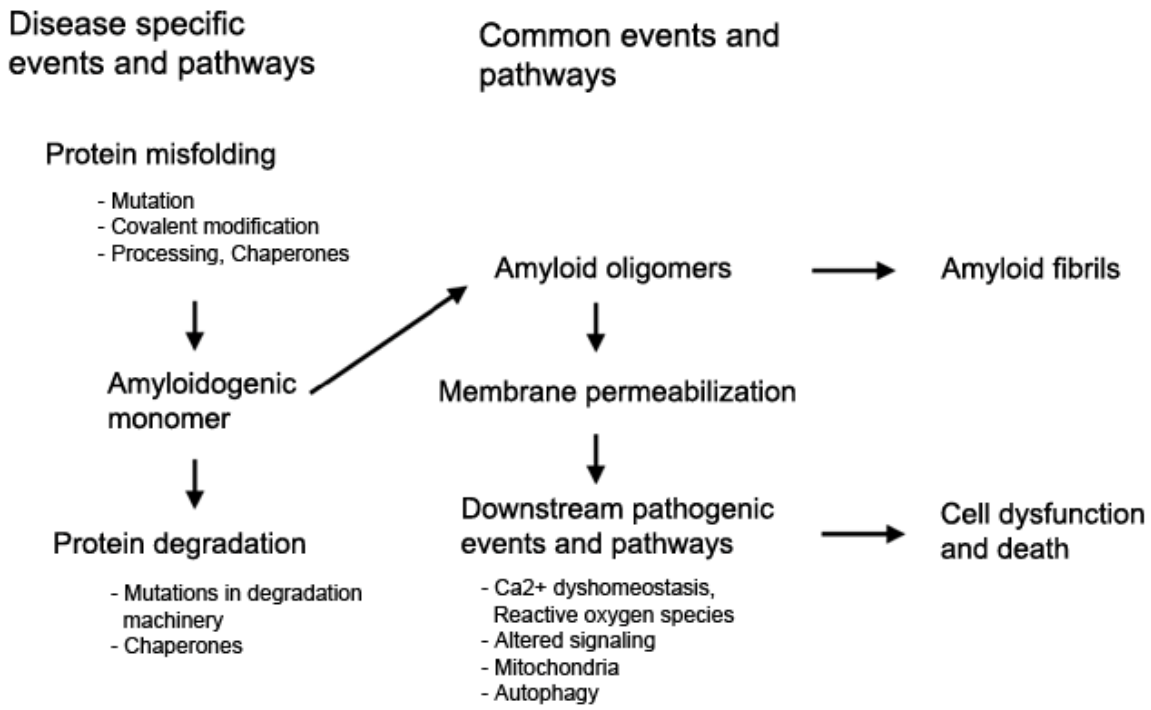


Figure I - 6: Mécanisme commun des maladies amyloïdoses (Glabe 2006)

III.2. **Cible de toxicité dans les maladies amyloïdes**

Les résultats sur la toxicité des oligomères de protéines liées à aucune maladie suggèrent que les oligomères toxiques des protéines amyloïdes ont un mécanisme de toxicité commun (Bucciantini et al. 2002). De plus, le fait que la toxicité des oligomères des protéines amyloïdes différentes est inhibée par un anticorps commun indépendamment de leur location intracellulaire ou extracellulaire (par exemple : Aβ réside extracellulaire mais α-synucléine est intracytoplasmique) semble indiquer que les protéines amyloïdes interagissent avec la membrane cellulaire qui est en effet accessible *via* les deux régions intracellulaire et extracellulaire (Kayed et al. 2003). En particulier, les plaques Aβ extracellulaires et les

inclusions Aβ intracellulaires sont également réduites par l'immunothérapie Aβ chez des souris, cela suggère que les stocks de Aβ intracellulaires et extracellulaires sont réversibles (Oddo et al. 2006). Une corrélation entre la toxicité et l'adhésion de Aβ aux cellules musculaires lisses de l'endothélium vasculaire indique ainsi que la toxicité est une conséquence directe de l'adhésion des protéines amyloïdes sur les membranes (Subasinghe et al. 2003). De plus, les oligomères amyloïdes dérivés des protéines et peptides cytosoliques comme α-synucléine et poly Q sont aussi toxiques pour les cellules quand ils sont appliqués extracellulairement. Cela indique que les cibles de la toxicité ne sont pas spécifiquement intracellulaires (Glabe 2009). Pour la PrP, son ancrage à la membrane via une partie glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Stahl et al. 1987) est essentiel pour la propagation des lésions neuronales dans les infections liées à la PrP (Klingeborn et al. 2011).

Toutes ces observations indiquent le rôle important des membranes dans les maladies amyloïdoses.

III.2.1. Interactions des protéines amyloïdes avec les membranes

Le mécanisme moléculaire des interactions protéine amyloïde-membrane (cellulaire ou organelle) n'est pas encore élucidé. L'utilisation des modèles membranaires (monocouches, bicouches) a permis d'approfondir des connaissances sur la nature de ces interactions. Il y a de plus en plus d'études qui confirment l'importance des interactions membranaires dans la fibrillation et la toxicité des protéines prions et des protéines amyloïdes (Lopes et al. 2007). L'interaction complexe entre protéines amyloïdes et les membranes peut être influencée significativement par la structure et composition membranaire, par l'état et la morphologie des agrégats (Wang et al. 2011; Hane et al. 2011).

III.2.1.1. *Effets sur la membrane*

Les interactions avec les protéines amyloïdes altèrent la fluidité (Gibson Wood et al. 2003; Peters et al. 2009), l'intégrité des membranes (Volles et al. 2001; Green et al. 2004) (**Figure I - 7)** et augmentent la conductance membranaire (Kayed et al. 2004), voire dans certains cas la formation de pores ou de canaux est observée (voir partie II.2.3, page 31) (Arispe et al. 1993a; Arispe et al. 1993b; Arispe et al. 1996; Jang et al. 2007; Lin et al. 2001) (Aβ), (Quist et al. 2005) (Aβ 1-40, α-synucléine, amyline); (Porat et al. 2003; Anguiano et al. 2002) (hIAPP).

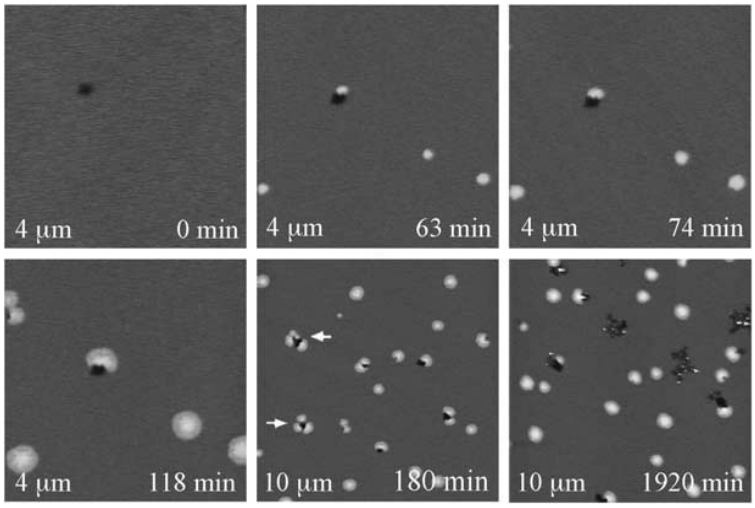


Figure I - 7: Effets de peptide Aβ (1-40) sur une bicouche de POPC/POPG (3/1, mol/mol, formée à partir des monocouches à pression 34-36 mN/m, technique Langmuir-Blodgett) déposée sur mica, étudiée par AFM. (Aβ 20 mM, Tris–HCl 10 mM, pH 7.4). Le temps après l'injection et les dimensions sont indiqués dans chaque image (Green et al. 2004).

La capacité d'augmenter la perméabilité des membranes est une propriété commune des différents types d'oligomères d'amyloïdes (Aβ, α-synucléine, polyQ, hIAPP…) (Glabe 2006; Glabe 2009).

Des études récentes *in vitro* ont montré une capacité commune des intermédiaires d'amyloïdes solubles de rendre perméable les bicouches lipidiques à des espèces aussi petites que des ions calcium et aussi grandes que des colorants tels que la calcéine (~622 Da) (Williams and Serpell 2011) (Aβ 1-40, Aβ 1-42) ; (van Rooijen et al. 2010) (α-synucléine) ; (Engel et al. 2008) (hIAPP)) ou Alexa546 (~1300Da) (Ambroggio et al. 2005) (Aβ 1-42).

La perturbation du compartiment cellulaire et la perte de potentiel chimique à travers une membrane sont à l'origine du stress cellulaire qui peut conduire à la mort cellulaire l'apoptose (Hebda and Miranker 2009).

Ces perturbations peuvent survenir avant la fibrillation, après la fixation, ou dans la phase de latence de la formation des fibres, ou coïncide avec la formation de fibres (Hebda and Miranker 2009). Egalement, plusieurs études utilisant des membranes modèles ont conforté l'idée que la toxicité est liée aux formes oligomères, et non pas aux monomères ou aux fibres (Ashley et al. 2006; Kim et al. 2009; Peters et al. 2009; Williams et al. 2010; Winner et al. 2011).

III.2.1.2. ***Effets sur la fibrillation des protéines amyloïdes***

La restriction géométrique 2D à la surface de la membrane cellulaire par rapport à l'espace 3D dans le cytosol (**Figure I - 8 A, B**) a en effet des conséquences importantes pour l'agrégation des protéines. Dans un espace 3D, la distance moyenne entre des molécules est

liée à la racine cubique de la quantité totale de protéines, alors que dans un espace 2D la distance moyenne est liée à la racine carrée du nombre total (**Figure I - 8, C**) (Aisenbrey et al. 2008).

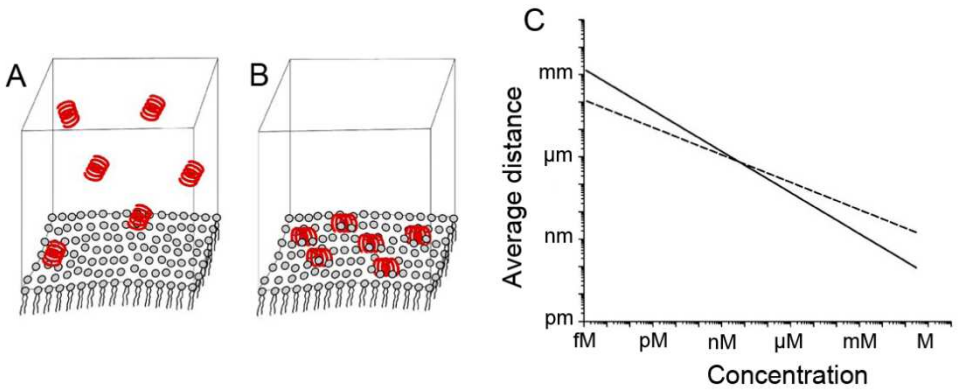


Figure I - 8: (A) Distribution de molécules dans une espace 3D, (B) Distribution de molécules dans l'espace 2D de la surface membranaire, (C) Distance moyenne entre molécules à une concentration donnée dans la solution (courbe pointillée) et adsorbées à surface de 1500m^2/l (Adapté de (Aisenbrey et al. 2008).

L'agrégation des protéines amyloïdes à la surface membranaire entraîne deux effets moléculaires qui, ensemble, conduisent à l'augmentation de la déstabilisation des protéines, résultant en une augmentation spectaculaire des produits amyloïdogéniques (Aisenbrey et al. 2008) :

- Effet de surface « crowding ». Les interactions électrostatiques et hydrophobes sont les facteurs déterminants dans l'association des protéines à la membrane et dans l'agrégation des protéines (Bokvist and Gröbner 2007).
- Matrice d'agrégation, pouvant catalyser la transition des protéines amyloïdes en des espèces toxiques même à une faible concentration (Aisenbrey et al. 2008).

Le contact avec les membranes peut accélérer (Wang et al. 2011; Lopes et al. 2007) ou inhiber (Micelli et al. 2004) la fibrillation. Par exemple, la fibrillation des protéines amyloïdes est significativement accélérée en présence de membranes modèles (Wang et al. 2011) (Aβ 1-42) ; (Knight and Miranker 2004; Khemtemourian et al. 2008; Sparr et al. 2004) (hIAPP). L'activité catalytique du lipide membranaire pour la fibrillation de hIAPP a été attribuée à l'augmentation de la concentration locale de IAPP et à l'alignement des protéines à la surface de la membrane (Knight and Miranker 2004; Khemtemourian et al. 2009) ainsi qu'à l'effet stabilisant de la membrane pour des intermédiaires en hélices α (Williamson et al. 2009). L'ancrage de la protéine PrP à la membrane via son ancre GPI est spécifique pour sa transition de conformation vers une structure en feuillets β intermoléculaires (Elfrink et al. 2008). L'interaction de la protéine PrP avec les membranes semble ainsi impliquée dans la

conversion de PrP^{C} à PrP^{Sc} et par conséquent dans le mécanisme des maladies à prions (Stahl et al. 1990; Safar et al. 1991; Sanghera and Pinheiro 2002; Noinville et al. 2008; Elfrink et al. 2008).

D'ailleurs, les lipides biologiquement trouvés dans le cerveau sont capables de resolubiliser des fibres amyloïdes matures non toxiques en des oligomères toxiques pour les cellules neuronales (Martins et al. 2008). L'aspect réciproque de l'interaction protéines amyloïdes – membranes a été récemment confirmé par les résultats de Peters et al. qui établissent que la diminution en fluidité de la membrane favorise le clivage amyloïdogénique d'APP donc l'augmentation de la production de Aβ (Peters et al. 2009).

III.2.2. Influence de la composition membranaire sur l'interaction avec les protéines amyloïdes

III.2.2.1. *Effets de la charge des membranes*

La charge des membranes joue un rôle important dans l'interaction des protéines amyloïdes et des membranes (Terzi et al. 1997; Vargas et al. 2000) ainsi que dans l'assemblage et la fibrillation des protéines amyloïdes (Kremer and Murphy 2003; Lopes et al. 2007; Aisenbrey et al. 2008). Les forces électrostatiques sont considérées prépondérantes pour les interactions entre les monomères et les membranes, mais les forces hydrophobes sont plus importantes pour les interactions entre les fibres et les membranes (Lin et al. 2007).

La présence des phospholipides anioniques est importante pour le dépôt extensif des fibres amyloïdes à la surface des bicouches supportées (Yip and McLaurin 2001) (Aβ) ; (Domanov and Kinnunen 2008) (hIAPP) ; (Winner et al. 2011) (α-synucléine). Les phospholipides négatifs comme PS accélèrent la formation des fibres d'un grand nombre de protéines (lysozyme, insuline, glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogenase, myoglobine, transthyrétine, cytochrome c, histone H1, and R-lactalbumine (Zhao et al. 2004).

Tableau I - 5 présente un résumé non-exhaustif des effets de charge des membranes sur l'interaction de différentes protéines amyloïdes avec les membranes modèles (monocouches, bicouches).

Tableau I - 5: Effets de la charge membranaire à l'interaction protéine amyloïde – membrane

Protéine	Techniques	Effet de la charge membranaire	Modèle	Référence
Aβ 1-40	CD, EM, AFM	- Bicouches chargées accélèrent la fibrillation et la transition en structure riche en feuillets β	Liposomes	(Bokvist and Gröbner 2007); (Yip and McLaurin 2001)
Aβ 1-40	FM	- Les interactions électrostatiques sont des forces essentielles dans l'adsorption des protéines aux monocouches lipidiques	Monocouche à l'interface air-eau	(Lin et al. 2009)
Aβ 1-42	AFM	- La charge et la fluidité membranaire affectent l'interaction des oligomères Aβ 1-42 avec les membranes, modifient la cinétique d'adsorption des protéines, la structure de la membrane, et la structure des dépôts amyloïdes.	Bicouches	(Hane et al. 2011)
α-synucléine	Epi-fluorescence	- L'adsorption de l'α-synucléine aux régions riches en PA est plus forte qu'aux régions riches en PC de la membrane.	Bicouches	(Haque et al. 2010)
α-synucléine	CD, AFM, SPR	- Protofibres de α-synucléine, au contraire des monomères et fibres adhèrent fortement aux vésicules de eggPG via une structure riche en feuillets β et perméabilisent les membranes PG mais pas PC	Liposomes	(Volles et al. 2001)
hIAPP	FM, EM	- DOPG augmente fortement la fibrillation de hIAPP par rapport à DOPC - La cinétique de fibrillation dépend de la présence de DOPG et de la concentration en DOPG	Liposomes	(Knight and Miranker 2004)
hIAPP	FM ; ATR-FTIR; CD; AFM; FRET	- La présence de phospholipides anioniques dans les bicouches supportées est importante pour la formation de fibres amyloïdes à la surface de la membrane - Le phospholipide anionique DOPG accélère la fibrillation	Bicouches supportées	(Domanov and Kinnunen 2008); (Jha et al. 2009)
hIAPP	IRRAS, AFM	- Le phospholipide anionique POPG accélère la fibrillation à l'interface air-eau, pas d'interaction avec la monocouche POPC	Monocouche à l'interface air-eau	(Lopes et al. 2007)
PrP 106-126	TEM, AFM, ATR-FTIR	- Attraction initiale de la PrP (106-126) à la monocouche lipidique est gouvernée par des forces électrostatiques - Phospholipides chargées négativement augmentent significativement la fibrillation et orientent les fibres à la surface lipidique	Monocouche à l'interface air-eau	(Dorosz et al. 2009)
$A^{136}R^{154}Q^{171}$ mutant de PrP ovin ($ARQ^{23–234}$), ARQ^{23-102} et leurs 12mères	SPR	- L'extrémité N-terminale de $ARQ^{23–234}$ (chargée positivement) est impliquée dans l'interaction avec les liposomes chargés négativement (asolectine). L'élimination de cette partie (ARQ^{23-102}) entraîne une diminution de l'adsorption/l'insertion sur/dans les membranes.	Liposomes	(Steunou et al. 2010)
SHaPrP(90-231)	FM	- L'effet de perméabilisation de SHaPrP(90-231) sur les liposomes de POPG est plus fort que sur les liposomes de POPC - L'adsorption de SHaPrP(90-231) aux liposomes de POPG est plus rapide qu'aux liposomes de POPC/POPG (rapport molaire 70/30)	Liposomes	(Sanghera and Pinheiro 2002)
pénétratine	CD, diffraction de rayon X	- La réponse (cinétique de fibrillation, de transition conformationelle) est beaucoup plus importante pour les bicouches chargées	Bicouches	(Sun et al. 2010)

CD: Circular Dichroism, EM: Electronique Microscopy, AFM: Atomic Force Microscopy, FM: Fluorescence Microscopy, SPR: Surface Plasmon Resonance spectroscopy, ATR-FTIR: Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared spectroscopy, FRET: fluorescence resonance energy transfer, IRRAS: Infrared Reflection Absorption Spectroscopy, TEM: Transmission Electron Microscopy.

III.2.2.2. ***Interactions avec des récepteurs membranaires***

L'hypothèse que les protéines amyloïdes pourraient induire leur toxicité via les récepteurs membranaires reste encore un débat. Selon quelques auteurs, certains récepteurs membranaires peuvent être impliqués dans la toxicité des protéines amyloïdes. Par exemple, pour l'Aβ (Lauren et al. 2009; Snyder et al. 2005) et pour l'α-synucléine (Martin-Ruiz et al. 2002; Leng et al. 2001). En particulier, les oligomères de Aβ induisent un dysfonctionnement synaptique via l'interaction avec la forme cellulaire, non-infectieuse de la PrP (Lauren et al. 2009; Bate and Williams 2011). L'activation des récepteurs GABA (A) par la taurine et le muscimol bloque la toxicité de Aβ 1-42 pour les neurones hippocampaux et corticaux chez des souris. Le blocage des récepteurs N-methyl-D-asparte (NMDA)-type glutamate par la mémantine et blocage des domaines extra-cellulaires de ces récepteurs par des anticorps inhibent l'augmentation de calcium intracellulaire causé par Aβ (Ferreira et al. 2007).

Au contraire, Cribbs et al. ont montré que la toxicité de protéine amyloïde ne semble pas être une conséquence d'une réaction stéréo-isomère spécifique de type ligand-récepteur car des séquences de Aβ (Aβ 1-42, Aβ 25-35) constituées entièrement d'acides aminés D- ou L- possèdent une toxicité similaire sur les cellules neuronales (Cribbs et al. 1997).

III.2.2.3. ***Effets de « lipides rafts »:***

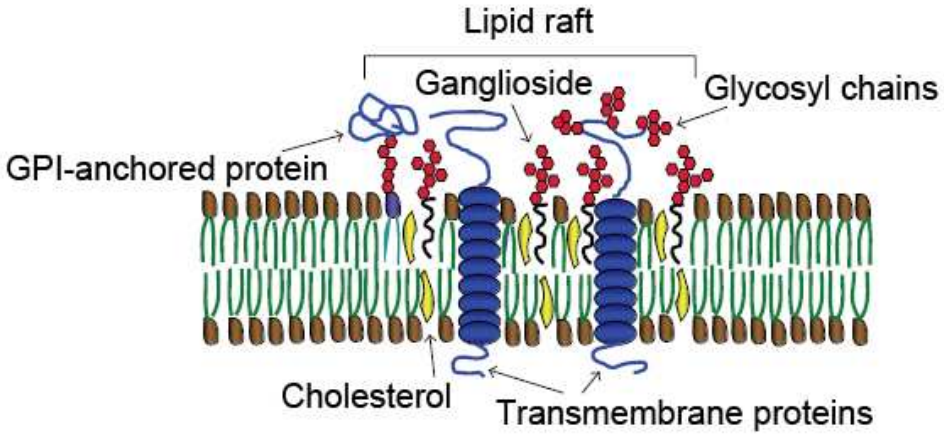


Figure I - 9: Représentation schématique d'un lipide raft riche en ganglioside et cholestérol. Les protéines transmembranaires glycosylated et non-glycosylated sont également représentées (Malchiodi-Albedi et al. 2011)

« Lipides rafts » (LRs) sont définis comme des microdomaines de sphingolipides, de cholestérol et de protéines fluctuant dans une matrice plus fluide de phospholipides (**Figure I - 9**) (Malchiodi-Albedi et al. 2011; Askarova et al. 2011). LRs sont plus denses que les autres domaines membranaires due à des liaisons hydrogène intermoléculaires entre des sphingolipides et le cholestérol (Askarova et al. 2011).

L'association des protéines amyloïdes aux membranes est favorisée par LRs (Diociaiuti et al. 2006; Fantini et al. 2011; Valencia et al. 2010), ce qui semble jouer un rôle important dans le mécanisme de leur toxicité (Valencia et al. 2010).

En particulier, LRs est probablement le site de conversion de PrP^{C} à PrP^{Sc}. En plus, les études *in vitro* montrent que le cholestérol semble important dans la formation de PrP^{Sc}. L'élimination de cholestérol membranaire réduit la formation de PrP^{Sc}, l'élimination de sphingolipides augmente la formation de PrP^{Sc} (Noinville et al. 2008) Les oligomères solubles de calcitonine forment des pores dans le domaine de lipides rafts des membranes cellulaires neuronales, donc, entraînent la dysrégulation de Ca^{2+} (augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+}) (Malchiodi-Albedi et al. 2011). La quantité relative de cholestérol dans les membranes pourrait affecter de manière significative l'insertion, l'adsorption, la fibrillation et la perméabilisation induite par Aβ (Ji et al. 2002; Ashley et al. 2006; Micelli et al. 2004; Subasinghe et al. 2003; Beel et al. 2008). Par ailleurs, la diminution du rapport cholestérol/phospholipide dans les cerveaux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer peut affecter le clivage de l'APP, et favoriser la génération de Aβ (Beel et al. 2008; Colell et al. 2009; Askarova et al. 2011).

Des changements de la concentration et de la composition des gangliosides dans des régions cérébrales différentes ont été observés dans les maladies de démence comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson (Ariga et al. 2008). L'interaction des protéines amyloïdes avec les gangliosides dans les rafts lipidiques semble être critique dans les maladies amyloïdoses : pour la maladie d'Alzheimer (Choo-Smith et al. 1997; Williams et al. 2010; Ariga et al. 2008; Williams and Serpell 2011), pour la maladie de Parkinson (Fortin et al. 2004; Martinez et al. 2007; Park et al. 2009; Fantini and Yahi 2011). Les gangliosides favorisent ainsi la fabrication des agrégats amyloïdes toxiques de Aβ 1-40 (Okada et al. 2007). Les gangliosides influencent la formation des feuillets β du PrP106–126 et hIAPP ou modifient la formation des canaux dans les membranes de α-synucléine (Kawahara et al. 2011).

Les membranes des cellules neuronales étant plus riches en LRs sont donc probablement plus vulnérables à la toxicité des amyloïdes (Malchiodi-Albedi et al. 2011).

III.2.3. Mécanismes de toxicité proposés

Dans la littérature, trois mécanismes de toxicité des protéines amyloïdes pour les membranes sont proposés: effet « carpet », effets détergents, formation de pore (pour revue, voir (Hebda and Miranker 2009; Williams and Serpell 2011) (**Figure I – 10**).

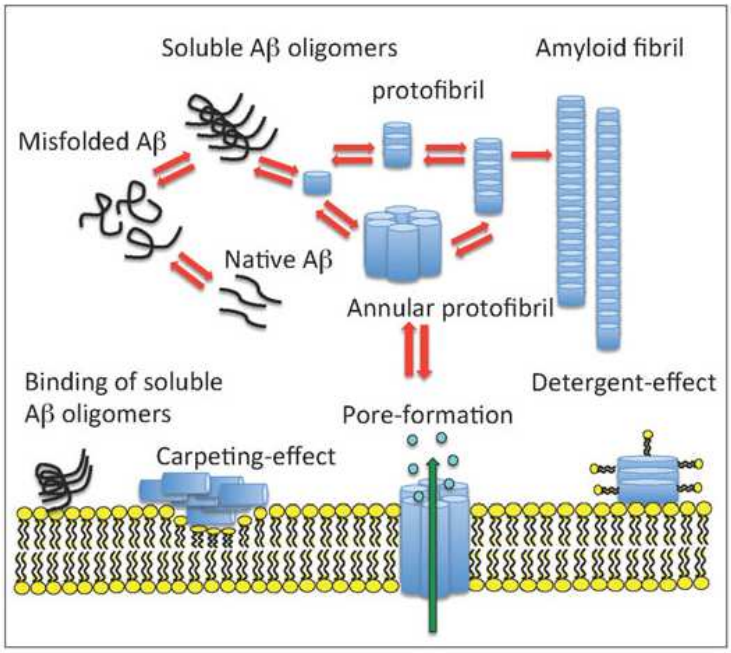


Figure I - 10: Trois mécanismes supposés d'altération de la membrane de Aβ (Williams and Serpell 2011)

III.2.3.1. ***Effet « carpet »***

Les effets « carpets » sont définis comme l'adhésion des protéines/agrégats à une face de la membrane. Cette association provoque une pression asymétrique entre deux faces membranaires dont la relaxation est accompagnée par le relargage de petites molécules (Hebda and Miranker 2009; Williams and Serpell 2011). L'association de hIAPP aux membranes cellulaires a été montrée accompagnée par une perte de lipides des membranes (Green et al. 2004).

III.2.3.2. ***Effet de type détergent***

Les effets détergents provoquent la solubilisation des lipides par des interactions avec les protéines. L'enlèvement peut avoir lieu sur une face de la membrane résultant en une pression asymétrique entre deux feuillets comme l'effet « carpet » ou sur deux faces résultant en la formation de trou. La suppression de la feuille externe peut entraîner l'amincissement de la membrane, facilitant l'entrée des ions ou de petites molécules à travers la barrière membranaire (Hebda and Miranker 2009; Williams and Serpell 2011).

Les études sur des lipides marqués détectable par fluorescence ont mis en évidence l'enlèvement des lipides de la membrane par la présence de fibres contenant des phospholipides (Zhao et al. 2004; Domanov and Kinnunen 2008). L'explication donnée pour ce phénomène est l'effet « carpet » ou détergent. Pourtant, ce modèle est considéré avoir une contribution faible dans la perturbation membranaire car hIAPP et rIAPP-non

amyloïdogenique ont les mêmes effets sur les membranes modèles (Sparr et al. 2004; Engel et al. 2008).

III.2.3.3. ***Formation du pore et/ou canaux***

Le contact avec des protéines amyloïdes peut entraîner la formation de pores ou de canaux ioniques dans des bicouches membranaires: Aβ 1-40 (Arispe et al. 1993b; Arispe et al. 1993a) ; Aβ 1-42 (Lin et al. 2001) ; calcitonine (Diociaiuti et al. 2006). Les pores formés sont entourés et stabilisés par des protéines (Demuro et al. 2005).

In vitro, des oligomères de différentes protéines amyloïdes induisent une perturbation membranaire *via* la formation de pores et canaux ioniques dans les membranes : l'α-synucléine (Kim et al. 2009) (bicouches planes) ; Aβ42, PrP (106-126), hIAPP, polyglutamine, et lysozyme (Demuro et al. 2005) (membranes cellulaires) ; PrP (24-234) et PrP (104-234) (Chich et al. 2010) (liposomes) ; calcitonine (Diociaiuti et al. 2006) (liposomes).

Différentes structures des pores/canaux formés sont reportées : des canaux à 2 sous unités, des canaux carrés de 4 sous unités, des canaux de 6 sous unités (**Figure I – 11, A-C**) (Lin et al. 2001), des canaux formés par des hexamères ou octamères de Aβ.

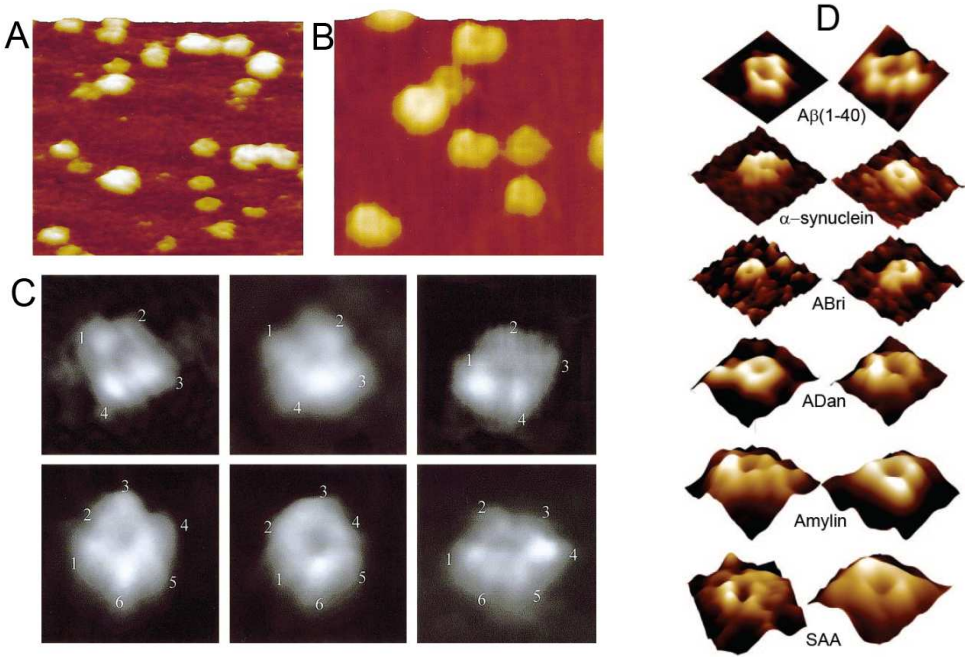


Figure I - 11: Images AFM de canaux formés par le peptide Aβ 1-42 dans une bicouche d'asolectine déposée sur le mica. (A, B) Plots de surface, B) Images agrandies montrent les organisations des unités en fonction de la luminosité, (C) Images agrandies des canaux formés dans la bicouche constituant de quatre et six sous unités (Lin et al. 2001). (D) Structures de type canaux formées par des protéines différentes dans des bicouches lipidiques (en éclatant des vésicules de protéine/DOPC (1/20, w/w) sur un mica. Le nombre des sous unités forment des canaux sont de 4 à 8. Les dimensions des images sont : 25 nm pour Aβ (1– 40), pour α-synuclein et pour amyline, 35 nm pour ABri, 20 nm pour ADan et pour SAA (apo-sérum amyloïde A humaine) (Quist et al. 2005).

Les pores des octamères peuvent être constitués de sous unités tétramériques et hexamériques structurés en feuillets β, les pores transmembranaires constitués de six hexamères couvrent la surface lipidique et fusionnent en formant des tonneaux β (Williams and Serpell 2011), ou des formes « doughnut » de 8-12 nm avec la taille intérieure du pore de 1-2 nm qui dépasse ~ 1 nm au-dessus de la surface lipidique (**Figure I – 11, D**) (Quist et al. 2005).

L'interaction membrane-protéine amyloïde peut se décrire par l'ensemble de ces trois mécanismes. Chaque mécanisme peut être impliqué dans la rupture des membranes biologiques, soit lors d'une étape particulière lors de l'agrégation des protéines amyloïdes ou soit lors d'un chemin réactionnel (*pathways*) spécifique de la fibrillation (Williams and Serpell 2011).

III.2.4. Modèles d'interaction protéine amyloïde-membrane

Différents modèles d'interaction avec les membranes cellulaires ont été récemment proposés pour le peptide hIAPP (**Figure I - 12**).

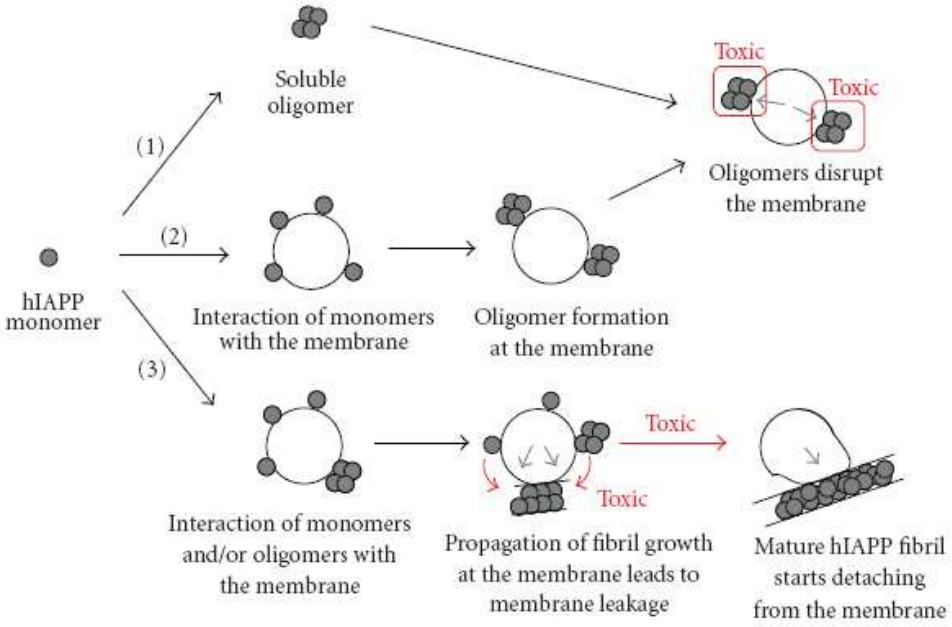


Figure I - 12: Représentation schématique des différents modèles d'interaction hIAPP-membrane (Khemtemourian et al. 2008). Les rectangles rouges montrent les espèces toxiques et les flèches rouges montrent les processus toxiques selon différentes hypothèses. Le cercle noir représente une membrane phospholipidique (liposomes), les cercles gris représentent respectivement les monomères d'hIAPP, et les groupes de 4 ou plusieurs cercles représentent les oligomères et les fibres de l'hIAPP. Les dommages à la membrane sont schématiquement indiqués par les flèches grises. Modèle (1) comprend deux étapes: (i) la formation des oligomères solubles de l'hIAPP, (ii) l'interaction des oligomères toxiques avec la membrane. Modèle (2) comprend trois étapes: (i) l'adhésion des monomères accompagnée d'un changement de conformation de random coil à l'hélice α, (ii) l'oligomérisation entre des hIAPP membranaires, et (iii) l'interaction des oligomères toxiques de l'hIAPP avec la membrane conduisant à endommager les membranes. Modèle (3) comprend trois étapes: (i) l'interaction des monomères et éventuellement des oligomères de l'hIAPP avec la membrane, (ii) la croissance des fibrilles d'hIAPP à la membrane (flèches rouges) conduisant à un changement important de la morphologie de la membrane en concomitante avec la rupture de la membrane, et (iii) le détachement des fibres matures de la membrane déformée.

Quelques études sur les protéines amyloïdes ont montré que c'est **le processus de fibrillation** mais pas une espèce précise dans ce processus qui perturbe l'intégrité membranaire par exemple pour le peptide hIAPP (Engel et al. 2008) et pour la protéine Aβ (Wogulis et al. 2005). Le modèle de toxicité proposé est le suivant (**Figure I – 12 - (3)**): d'abord, les monomères ou oligomères s'adsorbent/s'insèrent dans la membrane riche en phospholipides. En conséquence, la concentration locale de la protéine augmente et probablement s'accompagne d'un changement d'orientation ou de conformation favorable ce qui induit l'interaction des protéines entre elles et avec la membrane pour former des fibres. La formation des fibres au niveau de la membrane entraîne un changement de la courbure dont la conséquence est la perturbation membranaire.

IV. Protéine HET-s, un modèle pour étudier la toxicité des amyloïdes

Le « scrapie agent » provoque les maladies neurodégénératives chez les mammifères. Le terme prion (pour « proteinaceous infectious ») est proposé pour la première fois par Stanley Prusiner en 1982 pour différencier cet agent de pathogène des virus, des plasmides et des viroïdes, et il l'a définit comme « une petite particule protéique infectieuse résistante aux procédures d'inactivation qui modifient les acides nucléiques » (Prusiner 1982).

In vitro, les protéines prions forment des fibres à caractère amyloïde : stabilité inhabituelle, capacité à ensemencer leur propre formation, profil de diffraction de rayon X de structure cross β (Sipe and Cohen 2000).

La découverte de la toxicité des auto-assemblages formés par des protéines non liées à des maladies a suggéré que non seulement la toxicité des protéines amyloïdes pourrait être un phénomène général mais aussi la pathogenèse des maladies de dépôts protéiques pourrait être principalement liée à la structure et ou la nature des agrégats, plutôt qu'à leurs séquences d'acides aminés spécifiques (Bucciantini et al. 2002). Il est donc tout à fait possible et pertinent d'utiliser une protéine prion pour étudier l'agrégation et la toxicité des protéines amyloïdes.

La plupart de prions de la levure et des champignons sont des amyloïdes y compris les prions [PSI+], [URE3], [PIN+], et [MCA] de *S. cerevisiae*, et [Het-s] du *Podospora anserina*, qui sont les prions du Sup35p, Ure2p, Rnq1p, Mca1p, et HET-s, respectivement (Wickner et al. 2004; Roberts and Wickner 2003, 2004; Wickner et al. 2011).

IV.1. **Protéine HET-s de *Podospora anserina* (*P. anserina*)**

P. anserina est un champignon filamenteux ascomycète qui se développe exclusivement sur les déjections d'herbivores (Paoletti and Saupe 2008). Actuellement, *P. anserina* est utilisé largement comme une espèce modèle pour l'étude de type sexuel, le vieillissement, la biologie de mort cellulaire, les conflits du génome, l'incompatibilité d'hétérokaryon, et les prions (Bidard et al. 2011; Osiewacz et al. 2010; Brust et al. 2010; El-Khoury et al. 2008; Espagne et al. 2008; Saupe 2011).

IV.1.1. HET-s et incompatibilité végétative

Chez les champignons filamenteux, quand deux mycéliums rentrent en contact, il y aura la fusion entre des filaments. La fusion entre des hyphes de souches différentes conduit à la formation de filaments hétérocaryotiques qui contiennent un mélange des noyaux des deux souches parentales dans un cytoplasme commun. Pourtant, dans la plupart des cas, cette fusion somatique entraine la mort cellulaire des hyphes fusionnelles *via* un mécanisme de la reconnaissance du non-soi appelé incompatibilité d'hétérocaryon ou incompatibilité végétative (Turcq and Begueret 1998) (**Figure I - 13**). Ce phénomène est ubiquitaire chez les champignons filamenteux (Glass and Dementhon 2006). Chez beaucoup d'espèces, en conditions de laboratoire, l'incompatibilité entre les souches peut être détectée par la présence d'un barrage au niveau du contact entre les mycéliums incompatibles (Turcq and Begueret 1998).

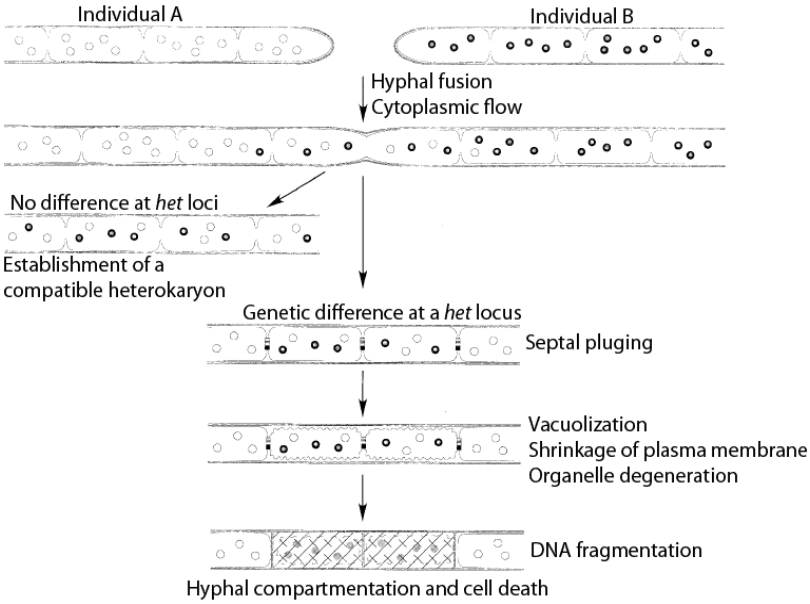


Figure I - 13: Schéma de la conséquence de la fusion des hyphes entre deux individus filamenteux. Si deux champignons sont identiques en spécificité allélique au niveau des loci *het*, le hétérokaryon formé est indiscernable des colonies sauvages homokaryotes. Si deux champignons sont différents en spécificité allélique au niveau des loci *het*, les cellules fusionnées seront mortes (Glass and Kaneko 2003).

Il semble que cette incompatibilité peut favoriser l'isolement génétique et sert ainsi à limiter la transmission horizontale des éléments extrachromosomiques dont certains peuvent avoir des effets délétères comme par exemple des mycovirus et des parasites (Turcq and Begueret 1998).

L'incompatibilité végétative est contrôlée génétiquement par un ou plusieurs locus appelés *het*. Les gènes présents aux locus *het* peuvent être impliqués dans un déterminisme allélique ou non allélique de l'incompatibilité. Dans le cas des systèmes alléliques, l'incompatibilité est déclenchée par la co-expression de deux allèles *het* comme *het-s* et *het-S* chez *P. anserina*.

Pour une meilleure compréhension de la suite du texte, une note de terminologie est présentée dans la **Tableau I - 6**.

Tableau I - 6: Nomenclature de [HET-s] (extrait de (Saupe 2011)).

het-s	L'allèle *het-s* et locus *het-s*
het-S	L'allèle *het-S*
[Het-s]	Le phénotype de la forme prion d'une souche *het-s*
[Het-s*]	Le phénotype de la forme libre du prion d'une souche *het-s*
[Het-S]	Le phénotype d'une souche *het-S*
HET-s	La protéine encodée par allèle *het-s*
HET-S	La protéine encodée par allèle *het-S*
HET-s(218-289)	Le domaine prion de HET-s

Chez *P. anserina*, 9 loci *het* ont été identifiés dont le locus *het-s* (Turcq and Begueret 1998; Saupe 2011). Deux allèles incompatibles *het-s* et *het-S* ont été décrits pour ce locus *het-s*. La souche *het-s* qui code la protéine HET-s peut exprimer deux phénotypes alternatifs : [Het-s] and [Het-s*]. La souche *het-S* codant la protéine HET-S exprime phénotype [Het-S]. La fusion entre deux phénotypes [Het-s] et [Het-S] induit la mort cellulaire visualisée par un barrage (**Figure I - 14**) (Turcq and Begueret 1998).

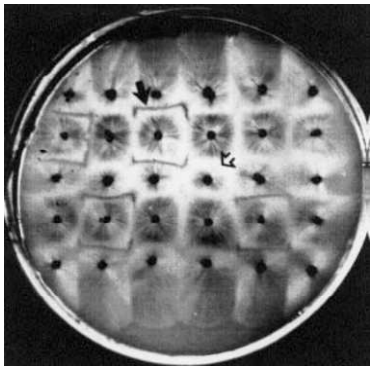


Figure I - 14: Aspect macroscopique de la réaction de la mort cellulaire chez *P. anserina*. Différentes souches de *P. anserina* ont été mises en croissance dans une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé. La flèche noire montre un bourrelet mycélien appelé « barrage ». Les souches de part et d'autre du bourrelet sont donc incompatibles. La flèche blanche montre un contact normal (absence de « barrage ») entre deux souches compatibles (Turcq and Begueret 1998).

La différence de réactivité incompatible entre [Het-s] et [Het-s*] vers une souche [het-S] n'est pas due à des expressions différentes du gène *het-s* mais à une modification post-traductionnelle (Coustou et al. 1997). La protéine HET-s est en effet un prion. La souche [Het-s*] peut être transformée en [Het-s] par surexpression du gène *het-s* ou lentement par contact avec le phénotype [Het-s] (Coustou et al. 1997). Autrement dit, l'incompatibilité est déclenchée par la réaction de la protéine HET-S avec la forme prion de la protéine HET-s.

L'inactivité du gène *het-s* supprime la réaction d'incompatibilité mais l'accomplissement du cycle biologique du champignon n'est pas affecté (Coustou et al. 1997; Turcq and Begueret 1998).

Les protéines HET-s et HET-S possèdent également des séquences d'acides aminés de 289 résidus qui diffèrent par 13 acides aminés. La nature de l'acide aminé en position 33 est essentielle à la spécificité allélique. Cet acide aminé est une proline dans le polypeptide codé par *het-s*, et une histidine dans celui codé par *het-S* (Turcq and Begueret 1998). Ces deux protéines se composent de deux domaines : l'extrémité N-terminale globulaire nommé HeLo et l'extrémité C-terminale non-structurée appelée domaine de formation de prion (PFD) (Greenwald et al. 2010).

Un modèle de mécanisme d'incompatibilité est proposé (Greenwald et al. 2010) en insistant sur le rôle du domaine globulaire de HET-S (mais pas de HET-s) et l'importance du domaine prion des deux protéines. Le PFD de HET-S adopte une structure β-solénoïde en interaction avec "prion seed" de [Het-s]. Ce repliement pourrait déclencher un repliement du domaine HeLo qui à son tour activerait la toxicité par un mécanisme inconnu.

Le comportement prion de [HET-s] et l'antagonisme HET-s/HET-S sont également observés au cours du cycle sexuel de *P. anserina* (Coppin et al. 1997; Greenwald et al. 2010).

IV.1.1. Propriétés biochimiques et fibrillation de la protéine HET-s et son domaine prion HET-s (218-289)

IV.1.1.1. *Fibrillation de la protéine HET-s*

Comme le prion PrP, [Het-s] propage des agrégats amyloïdes de la protéine HET-s. Cette infectivité est spécifique de la forme amyloïde de HET-s, les formes solubles ou des agrégats amorphes de cette protéine ne présentent pas l'infectivité (Dos Reis et al. 2002; Maddelein et al. 2002)

La protéine recombinante HET-s (sous forme histidine-tagged) forme des fibres amyloïdes *in vitro* dans un tampon Tris à pH 8 (Dos Reis et al. 2002). Les fibres formées sont de largeur environ 15-20 nm, et de longueur de l'ordre de quelques µm. Elles semblent formées par les sous-unités qui s'enroulent, ce qui ressemblent aux fibres amyloïdes d'Aβ.

Ces fibres sont teintées rouges par le rouge Congo et présentent une biréfringence sous lumière polarisée. La fibrillation est accompagnée par une transition de la structure secondaire : diminution des hélices α et augmentation des feuillets β comme dans le cas de la protéine PrP (Dos Reis et al. 2002). La région N-terminale dans l'état d'agrégation semble être plus sensible à la protéolyse que l'état soluble (Balguerie et al. 2003). Ainsi la partie N-terminale pourrait être affectée lors de la formation des amyloïdes (Balguerie et al. 2003).

Les agrégats présentent un fragment de ~7 kDa qui résiste à la protéolyse, contrairement au fragment de ~25 kDa dans le cas des protéines solubles (pendant un temps court) et qui possède l'infectivité dans l'essai biolistique (Maddelein et al. 2002). La conversion d'une souche [Het-s*] en une souche [Het-s] a été réalisée en introduisant mécaniquement de la protéine HET-s recombinante dans un mycélium (**Figure I - 15**). Cette approche a permis d'établir que le caractère infectieux était relié au caractère amyloïde.

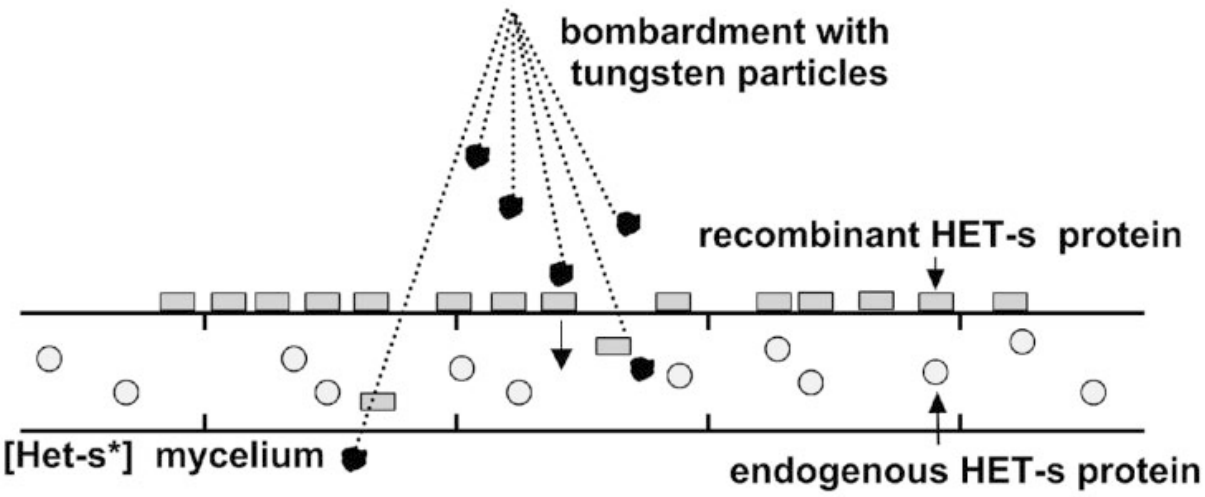


Figure I - 15: Principe de la biolistique. La protéine recombinante est introduite mécaniquement au sein d'un mycélium [Het-s*]. Ce mycélium est ensuite testé contre une souche [Het-S] pour déterminer s'il est devenu [Het-s] ou non. D'après (Maddelein et al. 2002).

Ce fragment de ~7kDa correspond au domaine de résidu 218 au résidu 289 qui a été montré nécessaire et suffisant pour la propagation de prion et la formation de fibres amyloïdes (Balguerie et al. 2003). La suppression de ce domaine soit dans la séquence de HET-s ou de HET-S entraine l'inactivité de l'incompatibilité végétative. Cela suggère que la réaction de mort cellulaire entre les cellules *het-s* et *het-S* est intimement liée à la fibrillation en fibres amyloïdes (Balguerie et al. 2003).

IV.1.1.2. ***Domaine prion de la protéine HET-s***

Le domaine PFD de 72 acides aminés (218-289) chez HET-s a été montré responsable de la propagation du prion *in vivo* et de la formation d'amyloïdes *in vitro* (Balgurie et al.

2003). Pourtant, l'expression de ce domaine seul chez *P. anserina* ne suffit pas pour provoquer l'incompatibilité d'hétérokaryon. Pour restaurer cette fonction, au moins une partie de l'extrémité N-terminale de HET-s est nécessaire (Balguerie et al. 2004). Ce domaine PFD est ainsi le domaine le plus sensible à la protéase à l'état soluble et le plus résistant sous forme amyloïde de cette protéine (Dos Reis et al. 2002; Balguerie et al. 2003). Les données RMN montrent qu'à l'état soluble, ce domaine PFD de la protéine entière est désordonné (Balguerie et al. 2003).

Sa composition en acide aminés n'est pas riche ni en résidu N ni en résidu Q mais riche en résidus chargés, elle est donc différente de celle des domaines PFDs des autres prions présents chez la levure (Sabate et al. 2007).

Indépendamment du modèle amyloïdogénique, les conditions d'agrégation comme : l'agitation, le pH, la température, la concentration en protéine altèrent le polymorphisme des agrégats formés (amorphes ou bien structurés) (Pedersen et al. 2006; Ruschak and Miranker 2007; Sabate et al. 2007; Sabate et al. 2009a). Suivant une gamme de température de 20°C à 50°C, il y a l'accélération d'agrégation accompagnée par l'augmentation du niveau de désorganisation des agrégats de HET-s (Sabate et al. 2009a). A pH différents, les auto-assemblages formés sont différents non seulement en morphologie mais aussi en infectivité (Sabate et al. 2007).

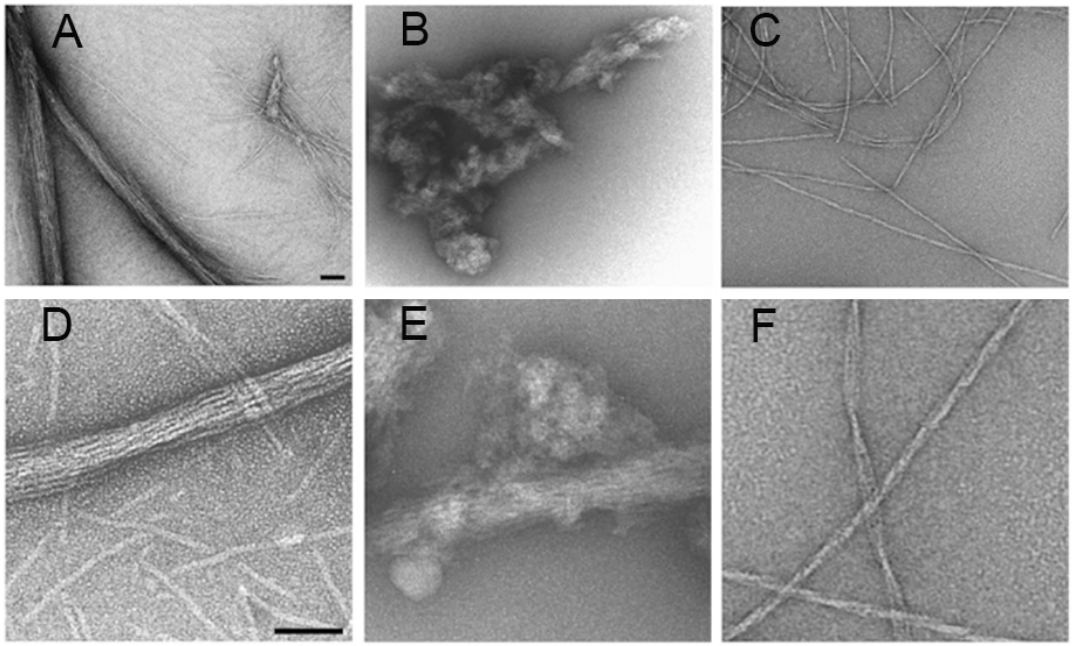


Figure I - 16: Images électroniques des différents types d'amyloïde de HET-s (218-289). (A, D) Amyloïdes formés à pH 7,2 à forces ioniques élevées sont des paquets organisées de fibres de 5 nm de largeur, (B, E) Amyloïdes formés à pH 7 à forces ioniques faibles, (C, F) Amyloïdes formés à pH 2 sont des triplets des protofibres de 5 nm qui s'enroulent entre elles en majorité. Les expériences de polymérisation ont été faites à une concentration en protéine à 10 µM à 37°C. Les images en haut (A, B, C) sont de faible grossissement et les images en bas (D, E, F) sont de grand grossissement. Les bars (A, D) présentent 50 nm (extrait de (Sabate et al. 2007)).

Les fibres formées à pH 7,2 à forces ioniques élevées (acétique acide 87,5 mM, Tris 0,5 M) sont fibrilleuses et organisées par rapport aux agrégats désordonnés formés à pH 7 à forces ioniques faibles (0,02 M trisodium phosphate dodecahydrate) et les fibres formées à pH 2 (anhydre d'acide borique 0,04 M, acide citrique monohydrate 0,01 M, NaCl 0,007 M) sont plus épaisses (**Figure I - 16**). L'infectivité des fibres formées semble associée aux fibres formées à pH 7 (Sabate et al. 2007).

Similairement, une étude récente a montré la différence de morphologie et d'infectivité entre les fibres formées à pH> 3 à 4°C (« singlet », infectieuse) et des fibres formées à pH<3 à 4°C (« triplets », non-infectieuses) (Mizuno et al. 2011). La formation des auto-assemblages de plusieurs sous-unités de PFD de HET-s (218-289) à pH acide est également visualisée par Sen et al. en 2007 en utilisant la microscopie à balayage par transmission (STEM-Scanning Transmission Electron Microscopy) (**Figure I - 17**).

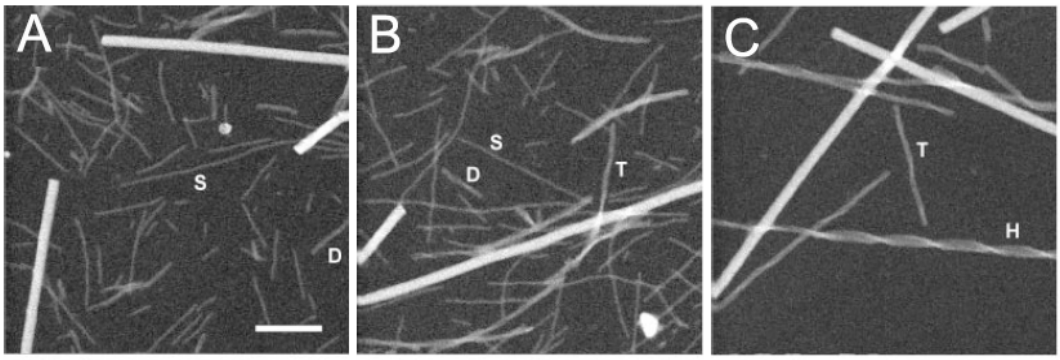


Figure I - 17: Images STEM des fibres de HET-s formées à différents pH. (A) pH 3,9, (B) pH 3,3, and (C) pH 2,0. Exemples de différents types de fibres: à pH pH 3,9, S = singlet (8,7 kDa/nm), D = doublet (18,5 kDa/nm); à pH 3,3, S = singlet (8,5 kDa/nm), D =doublet (17,8 kDa/nm), et T = triplet (24,0 kDa/nm); à pH 2,0, T = triplet (26,0 kDa/nm), H = sextuplet (52,0 kDa/nm) (Extrait de (Sen et al. 2007).

Pourtant, ils ont ainsi étonnamment noté que la cinétique d'agrégation de HET-s (218-289) ne dépend pas de la concentration en protéine dans une gamme de 2,5 à 100 µM (Sabate et al. 2009a). Il est également intéressant de noter que dans le cas de HET-s, à pH physiologique, il n'y a pas de polymorphisme des fibres formées, cela peut être une caractéristique adaptée de prion qui a une fonction bénéfique pour la cellule hôte (Sabate et al. 2009a; Baxa 2008). Dans les conditions physiologiques, les fibres formées par HET-s sont non-ramifiées, d'environ 5 nm de diamètre associées en groupes de largeur variable (même à 100-200 nm). La longueur des fibres peut atteindre plusieurs µm (Sabate et al. 2007; Berthelot et al. 2009).

In vitro, la fibrillation de HET-s (218-289) au pH physiologique présente une évolution sigmoïdale caractéristique de la formation d'un amyloïde, soit de trois étapes : une phase de latence, une phase de croissance exponentielle, et une phase de plateau (Sabate et al.

2007; Sabate et al. 2009a). Ce profil d'agrégation correspond bien à un processus de polymérisation par nucléation. Pendant la phase de latence, il n'y a pas de changement significatif de la structure secondaire (random coil), puis une structuration en feuillets β parallèle apparait et augmente exponentiellement (**Figure I - 18**) (Sabate et al. 2009a; Berthelot et al. 2010).

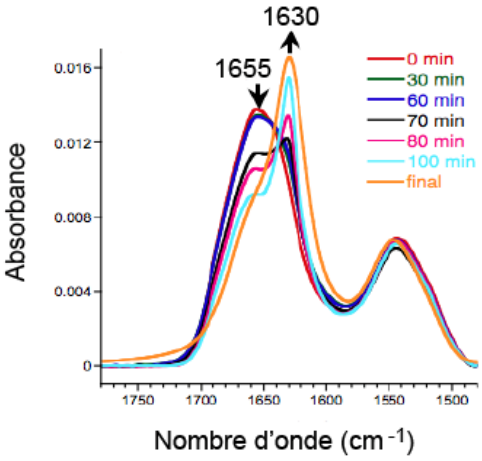


Figure I - 18: Evolution structurale de HET-s 218-289 suivie par spectroscopie ATR-FTIR. L'expérience est réalisée à une concentration en protéine de 50 µM dans un tampon PBS à pH 7,4 à 37°C (Berthelot et al. 2010).

Un modèle cinétique est proposé pour la polymérisation de HET-s (218-289) (Sabate et al. 2009a) dans lequel la nucléation dépend de la présence d'un premier assemblage peu structuré de HET-s (218-289). Des fibres formées sont rallongées par l'ajout des monomères dont la conformation est modélisée par les fibres elles-mêmes. Dans ce modèle, il n'y a pas de désintégration des fibres formées au cours de l'assemblage. Le modèle proposé par Berthelot et al. (**Figure I - 19**) est également un processus de polymérisation qui commence par une étape de nucléation lente (k_1) suivie par une élongation plus rapide des fibres (k_2). La différence est que dans ce modèle les premiers assemblages sont déjà structurés et la fragmentation des fibres n'est pas exclue (Berthelot et al. 2010).

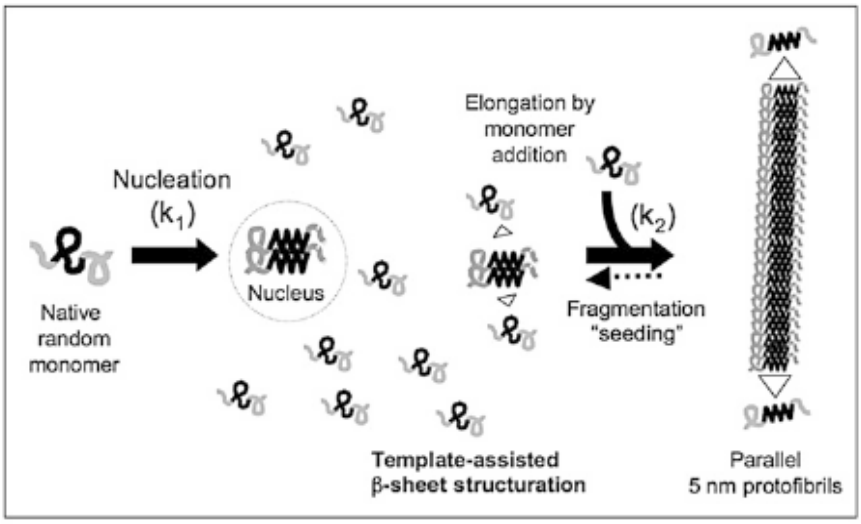


Figure I - 19: Modèles de polymérisation de HET-s (218-289) (Berthelot et al. 2010). La formation des nucléus (β parallèles) à partir des monomères (random coils) est lente (k_1) et n'est pas détectable. L'élongation (k_2) par l'addition des monomères non-organisés aux nucléus de manière « template assisted β-sheet structuration ». Les protofibres formées ensuite s'enroulent entre elles formant des fibres plus complexes.

IV.1.2. Structure tridimensionnelle de l'amyloïde du PFD de HET-s

A l'heure actuelle, la structure amyloïde du PFD de HET-s (du résidu 218 au résidu 289) est la plus détaillée (Ritter et al. 2005; Sen et al. 2007; Wasmer et al. 2008; Wasmer et al. 2009b; Van Melckebeke et al. 2010; Van Melckebeke et al. 2011).

La structure amyloïde du domaine de prion des fibres formée par les PFD domaines isolés est presque identique à celle formées par les protéines HET-s entières (Wasmer et al. 2009b). Les faibles différences structurales observées se trouvent principalement hors du cœur de la structure de fibres.

Wasmer et al. (2008) a montré que le PFD de HET-s forme un solénoïde β *left-handed* (**Figure I - 20 A**) (Wasmer et al. 2008) de pas de 410Å (Mizuno et al. 2011) avec un cœur hydrophobe triangulaire et chaque monomère forme deux turns (**Figure I – 20 B**).

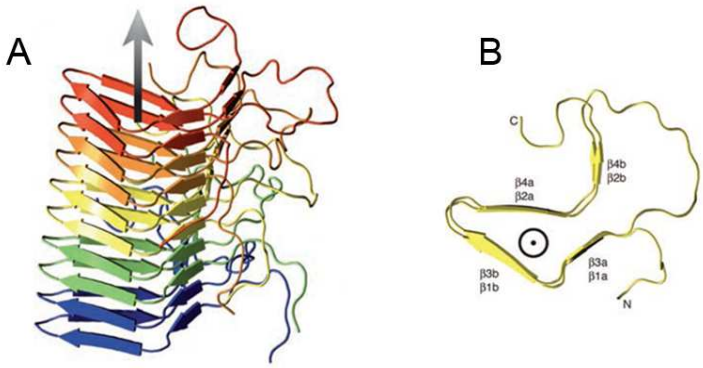


Figure I - 20: (A-B) Structure des fibres de HET-s (218–289). L'axe des fibrilles est indiqué par une flèche. (A) Vue latérale des cinq molécules centrales de la structure de plus faible énergie du pentamère de HET-s (218-289) calculée à partir des contraintes RMN. (B) Vue du haut de la molécule centrale de (A). β3 et β4 sont au dessus de β1 et β2, respectivement (Wasmer et al. 2008).

Les deux turns dans chaque monomère sont deux répétitions imparfaites de 21 acides aminés (**Figure I - 21 B, C**). Chaque turn (ou pseudo-répétition) est composé de deux brins β (Ritter et al. 2005) qui se divisent en deux petits brins β courts dont les trois premiers déterminent le cœur triangulaire et le quatrième point à l'extérieur (**Figure I - 21 A**). Ces deux couches de brins β sont liées par un boucle flexible de 15 acides aminés (Ritter et al. 2005; Siemer et al. 2006). Les extrémités N-terminale et C-terminale sont flexibles (Van Melckebeke et al. 2011). L'extrémité C-terminale forme une poche semi-hydrophobe constituant des résidus aromatiques (Van Melckebeke et al. 2011).

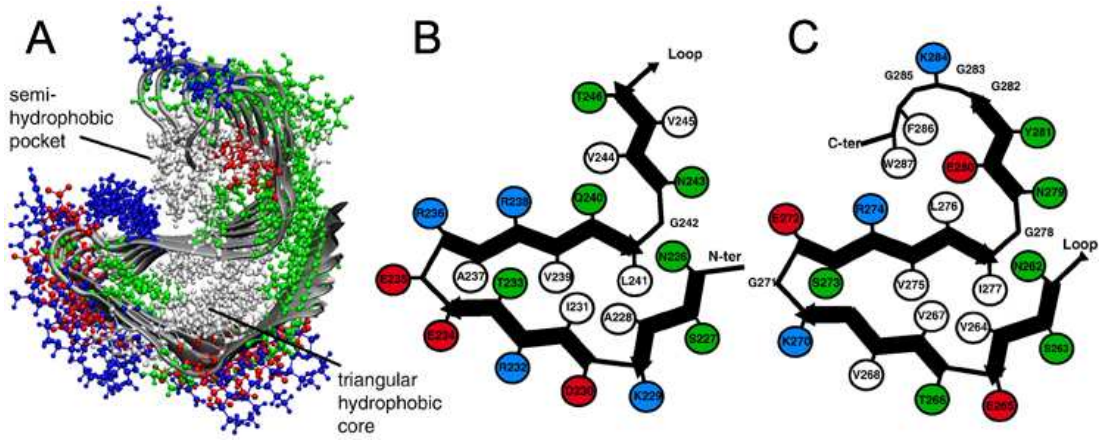


Figure I - 21: Représentation schématique de fibres de HET-s (218–289). (A) Empilement du pentamère est montré, avec le squelette polypeptidique en ruban. Les deux couches formées par une molécule HET-s (218-289) sont indiquées séparément dans (B) et (C). Les résidus sont de couleur codé comme suit: blanc, hydrophobe ; bleu et rouge, chargé ; vert, polaire (Van Melckebeke et al. 2011).

Ce modèle est supporté par les résultats de Sen et al. (Sen et al. 2007) : la diffraction des rayons X montre une forte réflexion méridionale à $(0,47\ nm)^{-1}$ caractéristique des fibres amyloïdes indiquant une structure cross β (**Figure I - 22**) ; la microscopie électronique à balayage par transmission montre une valeur de masse par unité de longueur de 9,2 ± 1,44 kDa/nm. Pour une masse de sous-unités de 8,52 kDa, cette valeur de masse par unité de longueur correspond à 1,02 ± 0,16 sous-unités par 0,94 nm (Sen et al. 2007).

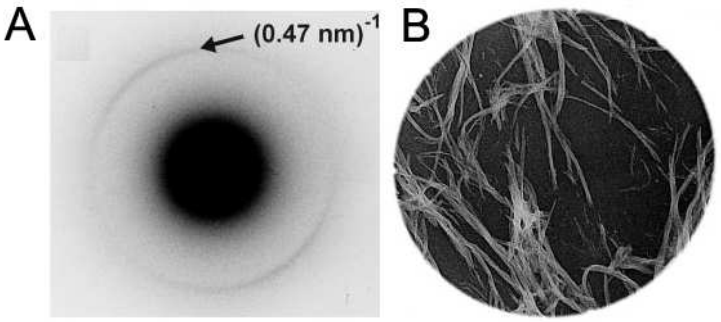


Figure I - 22: Diffractogramme électronique (A) d'un champ (B) de HET-s-(218-289) montre des fibres avec une réflexion méridionale forte à $(0,47\ nm)^{-1}$ (flèche) (Sen et al. 2007).

Ce modèle de type dimères des pseudo-répétitions peut être impliqué pour l'optimisation de polymérisation de HET-s (218-289) (Ritter et al. 2005).

Le solénoïde de HET-s (218-289) a un cœur hydrophobe avec des résidus polaires à la surface, au moins 23 liaisons hydrogène, 3 ponts salins (Van Melckebeke et al. 2011; Van Melckebeke et al. 2010). Le noyau hydrophobe ne contient que deux résidus polaires T233 et S273 qui sont engagés dans une liaison hydrogène intermoléculaire (**Figure I - 23**) (Van Melckebeke et al. 2011; Van Melckebeke et al. 2010).

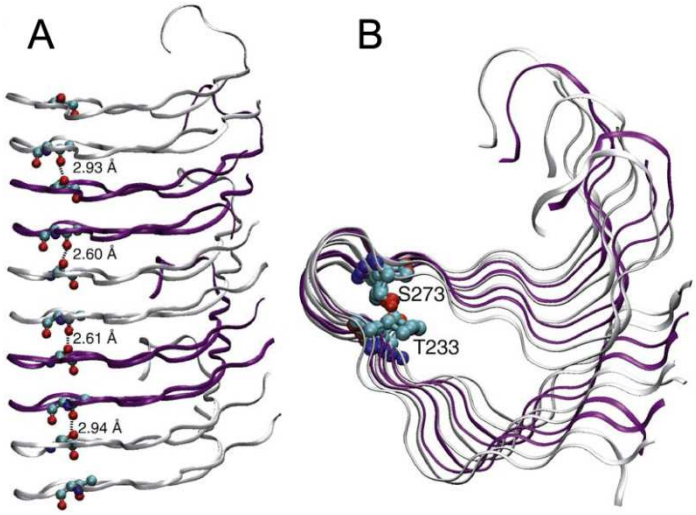


Figure I - 23: Liaisons hydrogène intermoléculaires entre les chaînes latérales des résidus S273 et T233. (A) Vue latérale et (B) Vue du haut (Van Melckebeke et al. 2011)

Les analyses de dynamique moléculaire ont suggéré que les ponts salins contribuant à la stabilité de la structure sont dynamiques et peuvent basculer entre des états intra- et intermoléculaires (Lange et al. 2009; Vitagliano et al. 2009). Yamazaki et al. par les calculs de solvatation moléculaire en trois dimensions suggèrent la présence des molécules d'eau bloquées dans l'axe des fibres qui s'intègrent dans la structure fibrillaire et peuvent jouer un rôle important dans la stabilité des fibres (Yamazaki et al. 2008). Des études sur la dénaturation chimique de HET-s (218-289) suggèrent que les interactions ioniques contribuent à la stabilité des fibres (Sabate et al. 2007).

L'étude récente de Van Melckebeke et al. sur l'accessibilité à l'eau des fibres amyloïdes de HET-s a montré que les résidus T233, S273 et W287 ne sont pas accessibles à l'échange H/D même après plusieurs mois d'expérience. Le fait que T233 et S273 se trouve à l'intérieur du corps hydrophobe des fibres indique donc une stabilité élevée des fibres amyloïdes de HET-s (218-289) dans des conditions physiologiques (Van Melckebeke et al. 2011). Le résidu W287 se trouve dans la poche semi-hydrophobe. Dans la même étude, l'accès à l'eau d'environnement des résidus polaires à la surface du corps hydrophobe a été démontré. Ces résultats confirment que dans les structures plus complexes des fibres (formées

par l'assemblage des protofilaments), les protofilaments sont entourés par les molécules d'eau (Van Melckebeke et al. 2011).

Tous ces résultats détaillés sur la structure des fibres amyloïdes de HET-s (218-289) en fait un bon modèle pour étudier la fibrillation et la toxicité des protéines amyloïdes.

IV.2. **Etude de toxicité des amyloïdes – approche mutagenèse aléatoire**

La levure de boulanger (*S. cerevisiae*) est utilisée depuis de nombreuses années en tant qu'organisme modèle en laboratoire. A notre connaissance, la première structure amyloïde toxique utilisée comme modèle chez la levure a été constituée à partir de l'huntingtine (Krobitsch and Lindquist 2000). Cette étude a mis en évidence que la délétion de certaines protéines chaperonnes, en particulier de *HSP104* supprime complètement l'agrégation des polyQ. L'étude de Sherman et collaborateur en 2002 a relié pour la première fois l'agrégation de fragments polyQ-GFP à leur toxicité (Meriin et al. 2002). Depuis, plusieurs études ont utilisé la levure comme modèle pour étudier la fonction, l'agrégation et la toxicité des protéines amyloïdes : α-synucléine (Outeiro and Lindquist 2003; Willingham et al. 2003; Fiske et al. 2011; Lee et al. 2011; Cooper et al. 2006) ; Aβ 1-42 (Bagriantsev and Liebman 2006; Caine et al. 2007; Caine et al. 2011). Ce modèle a permis de mettre en évidence les modulateurs de la toxicité des amyloïdes chez les autres modèles eukaryotes (Cooper et al. 2006; Fiske et al. 2011). Récemment, un criblage à haut débit pour les inhibiteurs de la polymérisation de peptide Aβ1-42 a été développé et validé en utilisant ce modèle de levure (Park et al. 2011).

Toutes ces études valident le modèle levure pour la recherche de facteurs modulant la toxicité ou l'agrégation des protéines amyloïdes.

Par une approche en mutagenèse dirigée, la partie PFD a été montrée comme la partie fonctionnelle et infectieuse du prion HET-s ((Balguerie et al. 2003). L'évidence des similarités de structure et l'infectivité entre les fibres formées *in vitro* et le corps d'inclusion chez *E. coli* subi de surexpression de HET-s (Wasmer et al. 2009a; Sabate et al. 2009b) montre que les fibres formées dans les conditions physiologiques *in vitro* peuvent être obtenue dans les cellules vivantes donc être la forme de propagation du prion *in vivo*.

L'existence de mutants de protéines amyloïdes qui ont une plus grande tendance à s'auto-assembler et qui augmentent la susceptibilité pour la maladie a permis de relier les caractéristiques de polymérisation avec la pathogenèse (Conway et al. 2000; Nilsberth et al. 2001). Par une approche mutagenèse, Ritter et al. en 2005 a corrélé pour la première fois la structure en feuillets β avec l'infectivité des fibres amyloïdes de HET-s (218-289) (Ritter et

al. 2005). Cela confirme la pertinence de modèle HET-s (218-289) pour l'étude des protéines amyloïdes.

L'expression *in vivo* de la forme prion de HET-s (218-289) ne présente pas de toxicité chez *S. cerevisiae* (Taneja et al. 2007; Couthouis et al. 2009). Un criblage génétique aléatoire des mutants toxiques de HET-s (218-289) (WT) i*n vivo* a permis d'isoler un mutant fortement toxique chez *S. cerevisiae*, mutant M8 différent du WT par 10 résidus (Couthouis et al. 2009) (**Figure I - 24 A**).

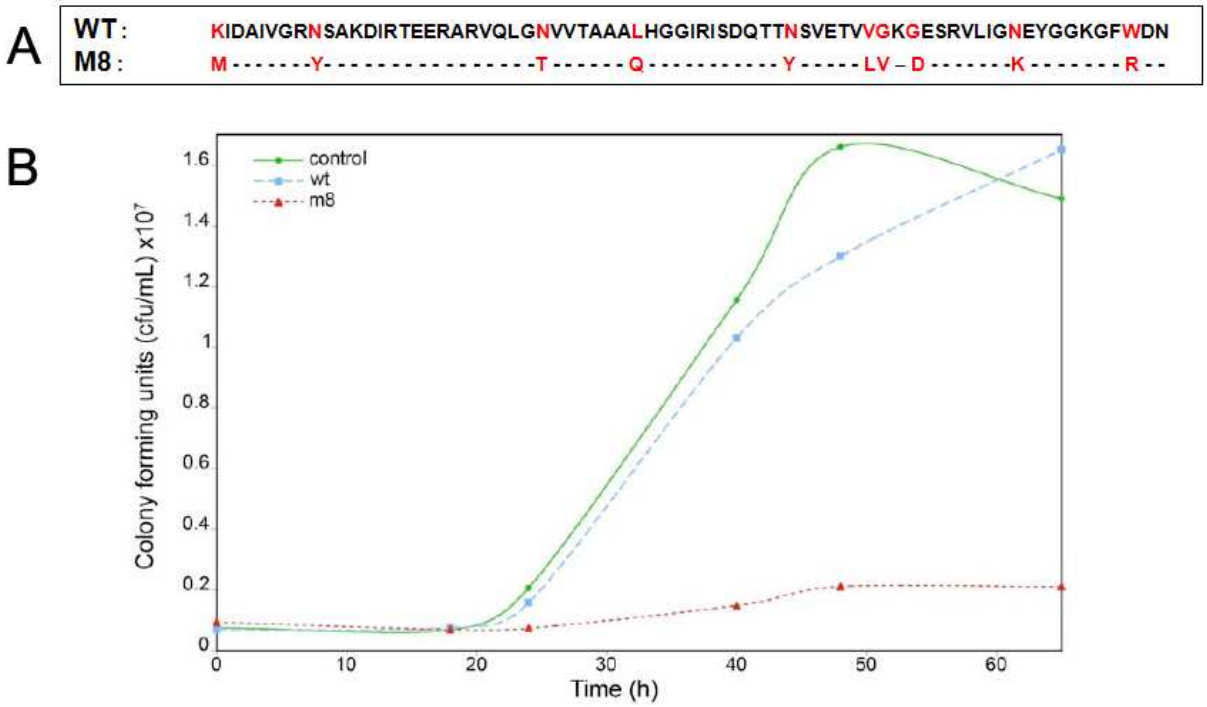


Figure I - 24: Séquence peptidique de WT et M8

Chez *S. cerevisiae*, ce mutant ralentit le développement des cellules (**Figure I - 24 B, Figure I - 25 A**). La forme GFP de ce mutant forme des agrégats granulaires différents de ceux du WT (agrégats de formes anneaux) (**Figure I - 25 B**) qui semblent appartenir à une voie d'agrégation différente contrôlée par *Hsp104*, un facteur clé dans les mécanismes d'agrégation dans la levure (Couthouis et al. 2009).

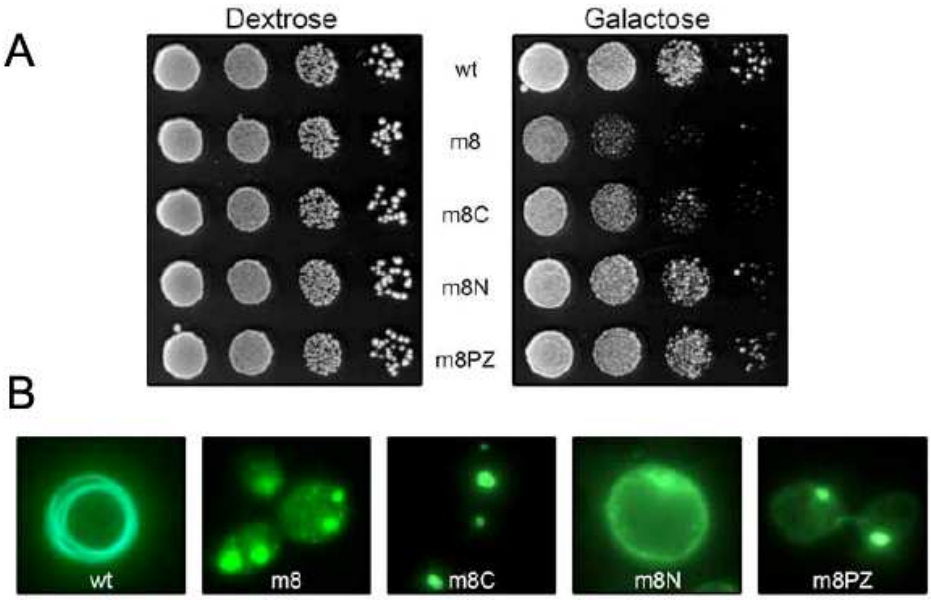


Figure I - 25: Identification de mutants toxiques de HET-s. (A) Une série de dilution de dix fois des transformant variés est déposée dans le milieu solide de dextrose ou de galactose et la croissance des cellules est observée après 48 heures. (B) Mutants présentent patterns d'agrégation différents de GFP chez la levure. Les cellules sont examinées sous un microscope de fluorescence après 72 heures de croissance sur le milieu galactose liquide. Extrait de (Couthouis et al. 2009).

Deux protéines présentent les caractéristiques des amyloïdes : agrégation en fibres avec des structures secondaires riches en feuillets β ; distance interfeuillets perpendiculairement à l'axe des fibres de 0,47 nm, caractéristique des structures cross β ; positives pour les colorants spécifiques des protéines amyloïdes (rouge Congo, ANS (1-anilinonaphthalene 8-sulfonate) (Berthelot et al. 2009). Pourtant, ces deux protéines s'auto-assemblent différemment (Berthelot et al. 2009; Berthelot et al. 2010). *In vitro*, le mutant M8 forme des fibres qui sont différentes de celles formées par le WT dans leurs caractéristiques biophysiques (Berthelot et al. 2009; Berthelot et al. 2010). En particulier, *in vitro* ce mutant forme des fibrilles de longueur finie (pas plus de 80 nm) (**Figure I – 26, C-D**) et présente une structure principalement en feuillets β antiparallèles au lieu de la structure principalement en feuillets β parallèles de la forme sauvage – WT (**Figure I - 26 E**) (Berthelot et al. 2009; Berthelot et al. 2010).

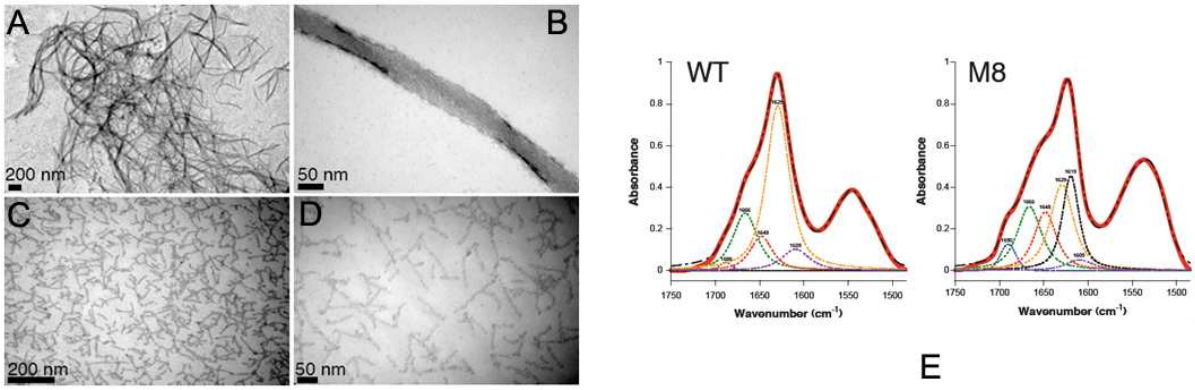


Figure I - 26: Morphologie des fibres formées par WT (A, B) et M8 (C, D) (pH 7,4). (E) Structure secondaire des fibres formées par WT est riche en feuillets β parallèles, celle des fibres formées par M8 est riche en feuillets β antiparallèles (Berthelot et al. 2009).

Au cours du processus de fibrillation du WT, seulement les formes protofibres, fibres ou paquets de fibres sont détectées, alors que pour le M8 différentes morphologies d'oligomères sphériques (~10 nm) à nanofibres (~10-100 nm) ont été détectées (Berthelot et al. 2010). De plus, la fibrillation du M8 est beaucoup plus rapide que celle du WT non seulement en terme de changement de morphologie (Berthelot et al. 2009) mais également en transition de structure (**Figure I - 27**) (Berthelot et al. 2010).

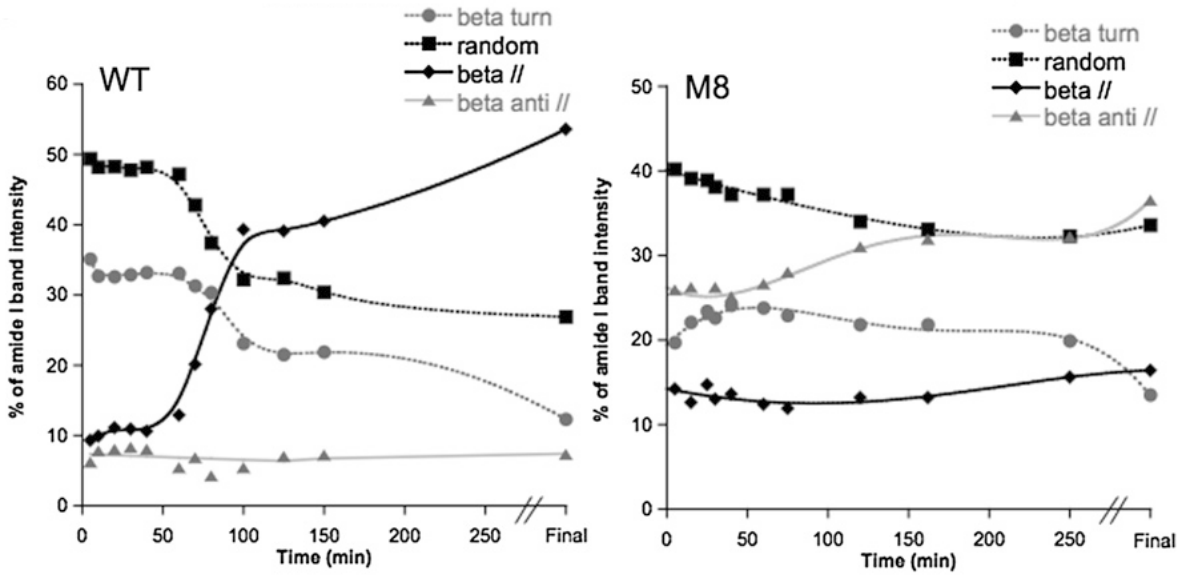


Figure I - 27: Cinétique de structuration de WT et M8 suivie par spectroscopie IR. L'expérience est réalisée à une concentration en protéine de 50 µM dans un tampon PBS à pH 7,4 à 37°C (Berthelot et al. 2010).

L'ensemble de ces preuves démontre que le mutant toxique M8 possède un mode de polymérisation différent du WT non toxique. En réalisant des mutations directes sur la séquence peptidique du WT en les points mutés correspondant au M8, 38 mutants ont été générés (Berthelot et al. 2011). La toxicité de ces mutants a été corrélée à la structure

secondaire de leurs fibres formées dans les conditions physiologiques. De façon intéressante, les mutants toxiques forment des fibres riches en feuillets β antiparallèles comme le mutant M8.

L'observation que la structure des oligomères toxiques de Aβ est ainsi riche en feuillets β antiparallèles (Cerf et al. 2009) et que les dimensions des fibres amyloïdes sont liées à leurs perturbations sur les membranes et à leur toxicité (Xue et al. 2009) suggèrent que la toxicité du M8 ainsi que des autres mutants toxiques du WT peut être liée à leur morphologie, à leur structure et à leurs interactions avec les membranes cellulaires.

V. Conclusions et objectifs de la thèse

Cette étude bibliographique nous a permis de situer notre travail dans le contexte des connaissances actuelles concernant les maladies liées au mauvais repliement des protéines amyloïdes.

Au cours de l'auto-assemblage des protéines amyloïdes, plusieurs espèces peuvent être formées et venir interagir avec les membranes. La toxicité des protéines amyloïdes est liée fortement à l'interaction de celles-ci avec les membranes cellulaires.

Lors de cette interaction, non seulement les membranes sont endommagées causant des effets fatals sur le métabolisme cellulaire mais l'agrégation des protéines peut être aussi modifiée. Les membranes peuvent engendrer une accélération ou un ralentissement de la fibrillation des protéines. La présence des membranes peut ainsi favoriser la fabrication des espèces toxiques, probablement des oligomères.

A l'heure actuelle, les mécanismes cellulaires de l'auto-assemblage et des interactions des protéines amyloïdes avec les membranes restent encore à élucider.

- Quelles sont les effets causés par des protéines amyloïdes aux membranes ?
- Quelle est la morphologie toxique ?
- Quelle est la structure de ces morphologies en interaction avec les membranes ?

L'utilisation des amyloïdes modèles et des membranes modèles est une bonne approche pour répondre à ces questions.

In vivo, la protéine HET-s du champignon *P. anserina* possède une fonction importante dans l'incompatibilité végétative de ce champignon. Son domaine de prion (HET-s 218-289) a été montré nécessaire et suffisant pour la propagation et l'agrégation de cette protéine. De plus, actuellement la structure 3D de la protéine HET-s 218-289 (WT) est résolue. Par une approche mutagenèse aléatoire, un mutant toxique de celle-ci a été généré (le M8). Ces deux protéines qui se différencient de 10 mutations en séquence peptidique forment des fibres amyloïdes de morphologie et de structure secondaire différentes. En plus, la cinétique de fibrillation du M8 est beaucoup plus rapide que celle du WT et les deux protéines semblent suivre deux modes de fibrillation différents. La morphologie, la cinétique de fibrillation et la structure secondaire de fibres du M8 peut être liées à sa toxicité. De plus, il n'y a pas d'études sur l'interaction de HET-s avec les membranes jusqu'au début de ce travail.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à la relation structure - toxicité des protéines amyloïdes. Nous avons réalisé une étude comparative (de toxicité, de

structure) des protéines amyloïdes en prenant en compte le rôle important des membranes cellulaires. Nous avons utilisé pour l'ensemble de nos travaux deux protéines amyloïdes modèles : la HET-s 218-289 non toxique et son mutant M8 toxique. Dans quelques expériences, afin de corréler la toxicité *in vivo*, la structure secondaire de fibres formées avec l'effet perturbant aux membranes de protéines, nous avons utilisé également des mutants de différents groupes en fonction de la structure secondaire de leurs fibres. Nous avons examiné leurs interactions avec des membranes modèles monocouches et bicouches de différents lipides : neutres (PC, PE) et chargés négativement (PG, PI, PS, asolectine). Les modèles membranaires couplés à des techniques différentes ont permis de corréler les effets toxiques des protéines à leurs structures et leurs morphologies différentes :

- La tensiométrie avec les mesures de la pression de surface nous a permis de déterminer l'adsorption et/ou l'insertion des protéines dans les monocouches lipidiques déposées à l'interface air-eau.

- L'ellipsométrie a permis de visualiser les changements de morphologie des couches lipidiques provoqués par l'assemblage des protéines sur les monocouches.

- La spectroscopie de fluorescence avec l'utilisation d'un marqueur de fluorescence a donné des informations sur les effets de perméabilisation des protéines à des membranes bicouches.

- La spectroscopie PWR (Plasmon-Waveguide Resonance) a permis de quantifier les interactions protéine-lipide (adsorption, insertion et constantes d'affinité)

- La spectroscopie IR (Infrarouge) a apporté des informations structurales des protéines et lipides dans toutes ces interactions.

Nous avons utilisé ces techniques pour étudier la relation structure-toxicité des protéines amyloïdes en interaction avec des membranes modèles en utilisant en parallèle la protéine sauvage non toxique (WT) et le mutant toxique (M8).

Afin d'étudier les différentes étapes de l'auto-assemblage des protéines ainsi que l'interaction de ces différents assemblages avec les membranes modèles, nous avons développé une première cellule microfluidique adaptable à la détection *en ligne* par spectroscopie infrarouge.

Bibliographie

Ahmed, M., J. Davis, D. Aucoin, T. Sato, S. Ahuja, S. Aimoto, J. I. Elliott, W. E. Van Nostrand, and S. O. Smith. **2010**. Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17 (5):561-567.

Aisenbrey, C., T. Borowik, R. Bystrom, M. Bokvist, F. Lindstrom, H. Misiak, M. A. Sani, and G. Grobner. **2008**. How is protein aggregation in amyloidogenic diseases modulated by biological membranes? *Eur. Biophys. J.* 37 (3):247-255.

Ambroggio, E. E., D. H. Kim, F. Separovic, C. J. Barrow, K. J. Barnham, L. A. Bagatolli, and G. D. Fidelio. **2005**. Surface behavior and lipid interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide 1-42: a membrane-disrupting peptide. *Biophys. J.* 88 (4):2706-2713.

Anguiano, M., R. J. Nowak, and P. T. Lansbury, Jr. **2002**. Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. *Biochemistry* 41 (38):11338-11343.

Ariga, T., M. P. McDonald, and R. K. Yu. **2008**. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease-a review. *J. Lipid. Res.* 49 (6):1157-1175.

Arispe, N., H. B. Pollard, and E. Rojas. **1993a**. Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90 (22):10573-10577.

———. **1996**. Zn2+ interaction with Alzheimer amyloid beta protein calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93 (4):1710-1715.

Arispe, N., E. Rojas, and H. B. Pollard. **1993b**. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90 (2):567-571.

Ashley, R. H., T. A. Harroun, T. Hauss, K. C. Breen, and J. P. Bradshaw. **2006**. Autoinsertion of soluble oligomers of Alzheimer's Abeta(1-42) peptide into cholesterol-containing membranes is accompanied by relocation of the sterol towards the bilayer surface. *BMC. Struct. Biol.* 6:21.

Askarova, S., X. Yang, and J. C. Lee. **2011**. Impacts of membrane biophysics in Alzheimer's disease: from amyloid precursor protein processing to abeta Peptide-induced membrane changes. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2011:134971.

Auluck, P. K., H. Y. Chan, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, and N. M. Bonini. **2002**. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. *Science* 295 (5556):865-868.

Bagriantsev, S., and S. Liebman. **2006**. Modulation of Abeta42 low-n oligomerization using a novel yeast reporter system. *BMC Biol.* 4:32.

Balguerie, A., S. Dos Reis, B. Coulary-Salin, S. Chaignepain, M. Sabourin, J. M. Schmitter, and S. J. Saupe. **2004**. The sequences appended to the amyloid core region of the HET-s prion protein determine higher-order aggregate organization in vivo. *J. Cell. Sci.* 117 (Pt 12):2599-2610.

Balguerie, A., S. D. Reis, C. Ritter, S. Chaignepain, B. Coulary-Salin, V. Forge, K. Bathany, I. Lascu, J.-M. Schmitter, R. Riek, and S. J.Saupe. **2003**. Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of Podospora anserina. *The EMBO Journal* 22 (9):2071-2081.

Barnhart, M. M., and M. R. Chapman. **2006**. Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:131-147.

Bate, C., and A. Williams. **2011**. Amyloid-β-induced synapse damage is mediated via cross-linkage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* 286 (44):37955-37963.

Baxa, U. **2008**. Structural basis of infectious and non-infectious amyloids. *Curr. Alzheimer. Res.* 5 (3):308-318.

Beel, A. J., C. K. Mobley, H. J. Kim, F. Tian, A. Hadziselimovic, B. Jap, J. H. Prestegard, and C. R. Sanders. **2008**. Structural studies of the transmembrane C-terminal domain of

the amyloid precursor protein (APP): does APP function as a cholesterol sensor? *Biochemistry* 47 (36):9428-9446.

Bell, E. T. **1959**. Hyalinization of the islets of Langerhans in nondiabetic individuals. *Am. J. Pathol.* 35 (4):801-805.

Berthelot, K., F. Immel, J. Gean, S. Lecomte, R. Oda, B. Kauffmann, and C. Cullin. **2009**. Driving amyloid toxicity in a yeast model by structural changes: a molecular approach. *FASEB J.* 23 (7):2254-2263.

Berthelot, K., S. Lecomte, J. Gean, F. Immel, and C. Cullin. **2010**. A yeast toxic mutant of HET-s((218-289)) prion displays alternative intermediates of amyloidogenesis. *Biophys. J.* 99 (4):1239-1246.

Berthelot, K., H. P. Ta, J. Gean, S. Lecomte, and C. Cullin. **2011**. In vivo and in vitro analyses of toxic mutants of HET-s: FTIR antiparallel signature correlates with amyloid toxicity. *J. Mol. Biol.* 412 (1):137-152.

Bidard, F., J. Ait Benkhali, E. Coppin, S. Imbeaud, P. Grognet, H. Delacroix, and R. Debuchy. **2011**. Genome-wide gene expression profiling of fertilization competent mycelium in opposite mating types in the heterothallic fungus Podospora anserina. *PLoS One* 6 (6):e21476.

Billings, L. M., S. Oddo, K. N. Green, J. L. McGaugh, and F. M. LaFerla. **2005**. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45 (5):675-688.

Bokvist, M., and G. Gröbner. **2007**. Misfolding of Amyloidogenic Proteins at Membrane Surfaces: The Impact of Macromolecular Crowding. *J. Am. Chem. Soc.* 129:14848-14849.

Brust, D., B. Daum, C. Breunig, A. Hamann, W. Kuhlbrandt, and H. D. Osiewacz. **2010**. Cyclophilin D links programmed cell death and organismal aging in Podospora anserina. *Aging Cell* 9 (5):761-775.

Bucciantini, M., E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli, J. Zurdo, N. Taddei, G. Ramponi, C. M. Dobson, and M. Stefani. **2002**. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416 (6880):507-511.

Budka, H. **2003**. Neuropathology of prion diseases. *Br. Med. Bull.* 66:121-130.

Caine, J., S. Sankovich, H. Antony, L. Waddington, P. Macreadie, J. Varghese, and I. Macreadie. **2007**. Alzheimer's Abeta fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response. *FEMS Yeast Res.* 7 (8):1230-1236.

Caine, J. M., P. R. Bharadwaj, S. E. Sankovich, G. D. Ciccotosto, V. A. Streltsov, and J. Varghese. **2011**. Oligomerization and toxicity of Abeta fusion proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409 (3):477-482.

Cerf, E., R. Sarroukh, S. Tamamizu-Kato, L. Breydo, S. Derclaye, Y. F. Dufrene, V. Narayanaswami, E. Goormaghtigh, J. M. Ruysschaert, and V. Raussens. **2009**. Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide. *Biochem. J.* 421 (3):415-423.

Chapman, M. R., L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, and S. J. Hultgren. **2002**. Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295 (5556):851-855.

Chich, J. F., C. Chapuis, C. Henry, J. Vidic, H. Rezaei, and S. Noinville. **2010**. Vesicle permeabilization by purified soluble oligomers of prion protein: a comparative study of the interaction of oligomers and monomers with lipid membranes. *J. Mol. Biol.* 397 (4):1017-1030.

Chimon, S., M. A. Shaibat, C. R. Jones, D. C. Calero, B. Aizezi, and Y. Ishii. **2007**. Evidence of fibril-like beta-sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's beta-amyloid. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (12):1157-1164.

Chiti, F., and C. M. Dobson. **2006**. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75:333-366.

Choo-Smith, L. P., W. Garzon-Rodriguez, C. G. Glabe, and W. K. Surewicz. **1997**. Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of Abeta-(1-40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 272 (37):22987-22990.

Colell, A., A. Fernandez, and J. C. Fernandez-Checa. **2009**. Mitochondria, cholesterol and amyloid beta peptide: a dangerous trio in Alzheimer disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (5):417-423.

Conway, K. A., S. J. Lee, J. C. Rochet, T. T. Ding, R. E. Williamson, and P. T. Lansbury, Jr. **2000**. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97 (2):571-576.

Cooper, A. A., A. D. Gitler, A. Cashikar, C. M. Haynes, K. J. Hill, B. Bhullar, K. Liu, K. Xu, K. E. Strathearn, F. Liu, S. Cao, K. A. Caldwell, G. A. Caldwell, G. Marsischky, R. D. Kolodner, J. Labaer, J. C. Rochet, N. M. Bonini, and S. Lindquist. **2006**. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 313 (5785):324-328.

Coppin, E., R. Debuchy, S. Arnaise, and M. Picard. **1997**. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (4):411-428.

Coustou, V., C. Deleu, S. Saupe, and J. Begueret. **1997**. The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus Podospora anserina behaves as a prion analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94 (18):9773-9778.

Couthouis, J., K. Rebora, F. Immel, K. Berthelot, M. Castroviejo, and C. Cullin. **2009**. Screening for toxic amyloid in yeast exemplifies the role of alternative pathway responsible for cytotoxicity. *PLoS One* 4 (3):e4539.

Cribbs, D. H., C. J. Pike, S. L. Weinstein, P. Velazquez, and C. W. Cotman. **1997**. All-D-enantiomers of beta-amyloid exhibit similar biological properties to all-L-beta-amyloids. *J. Biol. Chem.* 272 (11):7431-7436.

Demuro, A., E. Mina, R. Kayed, S. C. Milton, I. Parker, and C. G. Glabe. **2005**. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* 280 (17):17294-17300.

Diociaiuti, M., L. Z. Polzi, L. Valvo, F. Malchiodi-Albedi, C. Bombelli, and M. C. Gaudiano. **2006**. Calcitonin forms oligomeric pore-like structures in lipid membranes. *Biophys. J.* 91 (6):2275-2281.

Dobson, C. B., M. A. Wozniak, and R. F. Itzhaki. **2003**. Do infectious agents play a role in dementia? *Trends Microbiol.* 11 (7):312-317.

Dobson, C. M. **2002**. Getting out of shape. *Nature* 418 (6899):729-730.

———. **2003**. Protein folding and misfolding. *Nature* 426:884-890.

Domanov, Y. A., and P. K. Kinnunen. **2008**. Islet amyloid polypeptide forms rigid lipid-protein amyloid fibrils on supported phospholipid bilayers. *J. Mol. Biol.* 376 (1):42-54.

Dorosz, J., R. Volinsky, E. Bazar, S. Kolusheva, and R. Jelinek. **2009**. Phospholipid-induced fibrillation of a prion amyloidogenic determinant at the air/water interface. *Langmuir* 25 (21):12501-12506.

Dos Reis, S., B. Coulary-Salin, V. Forge, I. Lascu, J. Begueret, and S. J. Saupe. **2002**. The HET-s prion protein of the filamentous fungus Podospora anserina aggregates in vitro into amyloid-like fibrils. *J. Biol. Chem.* 277 (8):5703-5706.

Eanes, E. D., and G. G. Glenner. **1968**. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J. Histochem. Cytochem.* 16 (11):673-677.

Ehrnhoefer, D. E., J. Bieschke, A. Boeddrich, M. Herbst, L. Masino, R. Lurz, S. Engemann, A. Pastore, and E. E. Wanker. **2008**. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15 (6):558-566.

Eichner, T., and S. E. Radford. **2011**. A diversity of assembly mechanisms of a generic amyloid fold. *Mol. Cell.* 43 (1):8-18.

el-Agnaf, O. M., and G. B. Irvine. **2002**. Aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein and related peptides. *Biochem. Soc. Trans.* 30 (4):559-565.

El-Khoury, R., C. H. Sellem, E. Coppin, A. Boivin, M. F. Maas, R. Debuchy, and A. Sainsard-Chanet. **2008**. Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus Podospora anserina. *Curr. Genet.* 53 (4):249-258.

Elfrink, K., J. Ollesch, J. Stohr, D. Willbold, D. Riesner, and K. Gerwert. **2008**. Structural changes of membrane-anchored native PrP(C). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (31):10815-10819.

Engel, M. F., L. Khemtemourian, C. C. Kleijer, H. J. Meeldijk, J. Jacobs, A. J. Verkleij, B. de Kruijff, J. A. Killian, and J. W. Hoppener. **2008**. Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (16):6033-6038.

Espagne, E., O. Lespinet, F. Malagnac, C. Da Silva, O. Jaillon, B. M. Porcel, A. Couloux, J. M. Aury, B. Segurens, J. Poulain, V. Anthouard, S. Grossetete, H. Khalili, E. Coppin, M. Dequard-Chablat, M. Picard, V. Contamine, S. Arnaise, A. Bourdais, V. Berteaux-Lecellier, D. Gautheret, R. P. de Vries, E. Battaglia, P. M. Coutinho, E. G. Danchin, B. Henrissat, R. E. Khoury, A. Sainsard-Chanet, A. Boivin, B. Pinan-Lucarre, C. H. Sellem, R. Debuchy, P. Wincker, J. Weissenbach, and P. Silar. **2008**. The genome sequence of the model ascomycete fungus Podospora anserina. *Genome Biol.* 9 (5):R77.

Fahn, S. **2003**. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 991:1-14.

Fantini, J., D. Carlus, and N. Yahi. **2011**. The fusogenic tilted peptide (67-78) of alpha-synuclein is a cholesterol binding domain. *Biochim. Biophys. Acta.* 1808 (10):2343-2351.

Fantini, J., and N. Yahi. **2011**. Molecular basis for the glycosphingolipid-binding specificity of alpha-synuclein: key role of tyrosine 39 in membrane insertion. *J. Mol. Biol.* 408 (4):654-669.

Ferreira, S. T., M. N. Vieira, and F. G. De Felice. **2007**. Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life* 59 (4-5):332-345.

Findley, L. J. **2007**. The economic impact of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 13 Suppl:S8-S12.

Fiske, M., S. Valtierra, K. Solvang, M. Zorniak, M. White, S. Herrera, A. Konnikova, R. Brezinsky, and S. Debburman. **2011**. Contribution of Alanine-76 and Serine Phosphorylation in alpha-Synuclein Membrane Association and Aggregation in Yeasts. *Parkinsons Dis.* 2011:392180.

Fortin, D. L., M. D. Troyer, K. Nakamura, S. Kubo, M. D. Anthony, and R. H. Edwards. **2004**. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J. Neurosci.* 24 (30):6715-6723.

Fowler, D. M., A. V. Koulov, C. Alory-Jost, M. S. Marks, W. E. Balch, and J. W. Kelly. **2006**. Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* 4 (1):e6.

Fowler, D. M., A. V. Koulov, W. E. Balch, and J. W. Kelly. **2007**. Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* 32 (5):217-224.

Frare, E., M. F. Mossuto, P. P. de Laureto, S. Tolin, L. Menzer, M. Dumoulin, C. M. Dobson, and A. Fontana. **2009**. Characterization of oligomeric species on the aggregation pathway of human lysozyme. *J. Mol. Biol.* 387 (1):17-27.

Geddes, A. J., K. D. Parker, E. D. Atkins, and E. Beighton. **1968**. "Cross-beta" conformation in proteins. *J. Mol. Biol.* 32 (2):343-358.

Gibson Wood, W., G. P. Eckert, U. Igbavboa, and W. E. Muller. **2003**. Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1610 (2):281-290.

Gillmore, J. D., and P. N. Hawkins. **2006**. Drug Insight: emerging therapies for amyloidosis. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 2 (5):263-270.

Glabe, C. **2009**. Amyloide oligomer Structure and toxicity. *The open biology journal* 2:222-227.

Glabe, C. G. **2006**. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol. Aging* 27 (4):570-575.

Glass, N. L., and K. Dementhon. **2006**. Non-self recognition and programmed cell death in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 9 (6):553-558.

Glass, N. L., and I. Kaneko. **2003**. Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryot. Cell.* 2 (1):1-8.

Goldsbury, C., U. Baxa, M. N. Simon, A. C. Steven, A. Engel, J. S. Wall, U. Aebi, and S. A. Muller. **2011**. Amyloid structure and assembly: insights from scanning transmission electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 173 (1):1-13.

Goldsbury, C. S., G. J. Cooper, K. N. Goldie, S. A. Muller, E. L. Saafi, W. T. Gruijters, M. P. Misur, A. Engel, U. Aebi, and J. Kistler. **1997**. Polymorphic fibrillar assembly of human amylin. *J. Struct. Biol.* 119 (1):17-27.

Goldsbury, C. S., S. Wirtz, S. A. Muller, S. Sunderji, P. Wicki, U. Aebi, and P. Frey. **2000**. Studies on the in vitro assembly of a beta 1-40: implications for the search for a beta fibril formation inhibitors. *J. Struct. Biol.* 130 (2-3):217-231.

Green, J. D., L. Kreplak, C. Goldsbury, X. Li Blatter, M. Stolz, G. S. Cooper, A. Seelig, J. Kistler, and U. Aebi. **2004**. Atomic force microscopy reveals defects within mica supported lipid bilayers induced by the amyloidogenic human amylin peptide. *J. Mol. Biol.* 342 (3):877-887.

Greenwald, J., C. Buhtz, C. Ritter, W. Kwiatkowski, S. Choe, M. L. Maddelein, F. Ness, S. Cescau, A. Soragni, D. Leitz, S. J. Saupe, and R. Riek. **2010**. The mechanism of prion inhibition by HET-S. *Mol. Cell.* 38 (6):889-899.

Haataja, L., T. Gurlo, C. J. Huang, and P. C. Butler. **2008**. Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis. *Endocr. Rev.* 29 (3):303-316.

Halfmann, R., S. Alberti, and S. Lindquist. **2010**. Prions, protein homeostasis, and phenotypic diversity. *Trends Cell Biol.* 20 (3):125-133.

Hane, F., E. Drolle, R. Gaikwad, E. Faught, and Z. Leonenko. **2011**. Amyloid-beta Aggregation on Model Lipid Membranes: An Atomic Force Microscopy Study. *J. Alzheimers Dis.* 26 (3):10.

Haque, F., A. P. Pandey, L. R. Cambrea, J. C. Rochet, and J. S. Hovis. **2010**. Adsorption of alpha-synuclein on lipid bilayers: modulating the structure and stability of protein assemblies. *J. Phys. Chem. B* 114 (11):4070-4081.

Harrison, R. S., P. C. Sharpe, Y. Singh, and D. P. Fairlie. **2007**. Amyloid peptides and proteins in review. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 159:1-77.

Hebda, J. A., and A. D. Miranker. **2009**. The interplay of catalysis and toxicity by amyloid intermediates on lipid bilayers: insights from type II diabetes. *Annu. Rev. Biophys.* 38:125-152.

Heise, H., W. Hoyer, S. Becker, O. C. Andronesi, D. Riedel, and M. Baldus. **2005**. Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length alpha-synuclein fibrils studied by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102 (44):15871-15876.

Hermann, D., M. Both, U. Ebert, G. Gross, H. Schoemaker, A. Draguhn, K. Wicke, and V. Nimmrich. **2009**. Synaptic transmission is impaired prior to plaque formation in amyloid precursor protein-overexpressing mice without altering behaviorally-correlated sharp wave-ripple complexes. *Neuroscience* 162 (4):1081-1090.

Howie, A. J., and D. B. Brewer. **2009**. Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms. *Micron* 40 (3):285-301.

Jang, H., J. Zheng, and R. Nussinov. **2007**. Models of beta-amyloid ion channels in the membrane suggest that channel formation in the bilayer is a dynamic process. *Biophys. J.* 93 (6):1938-1949.

Jha, S., D. Sellin, R. Seidel, and R. Winter. **2009**. Amyloidogenic propensities and conformational properties of ProIAPP and IAPP in the presence of lipid bilayer membranes. *J. Mol. Biol.* 389 (5):907-920.

Ji, S. R., Y. Wu, and S. F. Sui. **2002**. Cholesterol is an important factor affecting the membrane insertion of beta-amyloid peptide (A beta 1-40), which may potentially inhibit the fibril formation. *J. Biol. Chem.* 277 (8):6273-6279.

Jimenez, J. L., E. J. Nettleton, M. Bouchard, C. V. Robinson, C. M. Dobson, and H. R. Saibil. **2002**. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99 (14):9196-9201.

Kahn, S. E., S. Andrikopoulos, and C. B. Verchere. **1999**. Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes* 48 (2):241-253.

Kayed, R., E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, and C. G. Glabe. **2003**. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300 (5618):486-489.

Kayed, R., Y. Sokolov, B. Edmonds, T. M. McIntire, S. C. Milton, J. E. Hall, and C. G. Glabe. **2004**. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J. Biol. Chem.* 279 (45):46363-46366.

Khemtemourian, L., J. A. Killian, J. W. Hoppener, and M. F. Engel. **2008**. Recent insights in islet amyloid polypeptide-induced membrane disruption and its role in beta-cell death in type 2 diabetes mellitus. *Exp. Diabetes. Res.* 2008:9.

Khemtemourian, L., G. Lahoz Casarramona, D. P. Suylen, T. M. Hackeng, J. D. Meeldijk, B. de Kruijff, J. W. Hoppener, and J. A. Killian. **2009**. Impaired processing of human pro-islet amyloid polypeptide is not a causative factor for fibril formation or membrane damage in vitro. *Biochemistry* 48 (46):10918-10925.

Kim, H. Y., M. K. Cho, A. Kumar, E. Maier, C. Siebenhaar, S. Becker, C. O. Fernandez, H. A. Lashuel, R. Benz, A. Lange, and M. Zweckstetter. **2009**. Structural properties of pore-forming oligomers of alpha-synuclein. *J. Am. Chem. Soc.* 131 (47):17482-17489.

Klingeborn, M., B. Race, K. D. Meade-White, R. Rosenke, J. F. Striebel, and B. Chesebro. **2011**. Crucial role for prion protein membrane anchoring in the neuroinvasion and neural spread of prion infection. *J. Virol.* 85 (4):1484-1494.

Knight, J. D., and A. D. Miranker. **2004**. Phospholipid catalysis of diabetic amyloid assembly. *J. Mol. Biol.* 341 (5):1175-1187.

Knowles, T. P., D. A. White, A. R. Abate, J. J. Agresti, S. I. Cohen, R. A. Sperling, E. J. De Genst, C. M. Dobson, and D. A. Weitz. **2011**. Observation of spatial propagation of amyloid assembly from single nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108 (36):14746-14751.

Kodali, R., and R. Wetzel. **2007**. Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Current Opinion in Structural Biology* 17:48-57.

Kremer, J. J., and R. M. Murphy. **2003**. Kinetics of adsorption of beta-amyloid peptide Abeta(1-40) to lipid bilayers. *J. Biochem Biophys Methods* 57 (2):159-169.

Kreplak, L., and U. Aebi. **2006**. From the polymorphism of amyloid fibrils to their assembly mechanism and cytotoxicity. *Adv. Protein Chem.* 73:217-233.

Krobitsch, S., and S. Lindquist. **2000**. Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97 (4):1589-1594.

Lange, A., Z. Gattin, H. Van Melckebeke, C. Wasmer, A. Soragni, W. F. van Gunsteren, and B. H. Meier. **2009**. A combined solid-state NMR and MD characterization of the stability and dynamics of the HET-s(218-289) prion in its amyloid conformation. *Chembiochem* 10 (10):1657-1665.

Lansbury, P. T., and H. A. Lashuel. **2006**. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature* 443:774-779.

Larson, J., G. Lynch, D. Games, and P. Seubert. **1999**. Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Res.* 840 (1-2):23-35.

Lauren, J., D. A. Gimbel, H. B. Nygaard, J. W. Gilbert, and S. M. Strittmatter. **2009**. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457 (7233):1128-1132.

Lee, Y. J., S. Wang, S. R. Slone, T. A. Yacoubian, and S. N. Witt. **2011**. Defects in very long chain fatty acid synthesis enhance alpha-synuclein toxicity in a yeast model of Parkinson's disease. *PLoS One* 6 (1):e15946.

Leng, Y., T. N. Chase, and M. C. Bennett. **2001**. Muscarinic receptor stimulation induces translocation of an alpha-synuclein oligomer from plasma membrane to a light vesicle fraction in cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 276 (30):28212-28218.

Lin, H., R. Bhatia, and R. Lal. **2001**. Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J.* 15 (13):2433-2444.

Lin, M. S., X. B. Chen, S. S. Wang, Y. Chang, and W. Y. Chen. **2009**. Dynamic fluorescence imaging analysis to investigate the cholesterol recruitment in lipid monolayer during the interaction between beta-amyloid (1-40) and lipid monolayers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 74 (1):59-66.

Lin, M. S., H. M. Chiu, F. J. Fan, H. T. Tsai, S. S. Wang, Y. Chang, and W. Y. Chen. **2007**. Kinetics and enthalpy measurements of interaction between beta-amyloid and liposomes by surface plasmon resonance and isothermal titration microcalorimetry. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 58 (2):231-236.

Lo Bianco, C., J. L. Ridet, B. L. Schneider, N. Deglon, and P. Aebischer. **2002**. alpha -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99 (16):10813-10818.

Lopes, D. H. J., A. Meister, A. Gohlke, A. Hauser, A. Blume, and R. Winter. **2007**. Mechanism of Islet Amyloid Polypeptide Fibrillation at Lipid Interfaces Studied by Infrared Reflection Absorption Spectroscopy. *Biophys. J.* 93 (9):3132-3141.

Lue, L. F., Y. M. Kuo, A. E. Roher, L. Brachova, Y. Shen, L. Sue, T. Beach, J. H. Kurth, R. E. Rydel, and J. Rogers. **1999**. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 155 (3):853-862.

Maddelein, M.-L., S. D. Reis, S. Duvezin-Caubet, B. Coulary-Salin, and S. J. Saupe. **2002**. Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. *PNAS* 99 (11):7402-7407

Makin, O. S., and L. C. Serpell. **2005**. Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.* 272 (23):5950-5961.

Malchiodi-Albedi, F., S. Paradisi, A. Matteucci, C. Frank, and M. Diociaiuti. **2011**. Amyloid oligomer neurotoxicity, calcium dysregulation, and lipid rafts. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2011:906964.

Martin-Ruiz, C., S. Lawrence, M. Piggott, A. Kuryatov, J. Lindstrom, C. Gotti, M. R. Cookson, R. H. Perry, E. Jaros, E. K. Perry, and J. A. Court. **2002**. Nicotinic receptors in the putamen of patients with dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease: relation to changes in alpha-synuclein expression. *Neurosci. Lett.* 335 (2):134-138.

Martinez, Z., M. Zhu, S. Han, and A. L. Fink. **2007**. GM1 specifically interacts with alpha-synuclein and inhibits fibrillation. *Biochemistry* 46 (7):1868-1877.

Martins, I. C., I. Kuperstein, H. Wilkinson, E. Maes, M. Vanbrabant, W. Jonckheere, P. Van Gelder, D. Hartmann, R. D'Hooge, B. De Strooper, J. Schymkowitz, and F. Rousseau. **2008**. Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J.* 27 (1):224-233.

Masliah, E., E. Rockenstein, I. Veinbergs, M. Mallory, M. Hashimoto, A. Takeda, Y. Sagara, A. Sisk, and L. Mucke. **2000**. Dopaminergic loss and inclusion body formation in

alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287 (5456):1265-1269.

McLean, C. A., R. A. Cherny, F. W. Fraser, S. J. Fuller, M. J. Smith, K. Beyreuther, A. I. Bush, and C. L. Masters. **1999**. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 46 (6):860-866.

Meier, J. J., R. Kayed, C. Y. Lin, T. Gurlo, L. Haataja, S. Jayasinghe, R. Langen, C. G. Glabe, and P. C. Butler. **2006**. Inhibition of human IAPP fibril formation does not prevent beta-cell death: evidence for distinct actions of oligomers and fibrils of human IAPP. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291 (6):E1317-1324.

Meinhardt, J., C. Sachse, P. Hortschansky, N. Grigorieff, and M. Fandrich. **2009**. Abeta(1-40) fibril polymorphism implies diverse interaction patterns in amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* 386 (3):869-877.

Meriin, A. B., X. Zhang, X. He, G. P. Newnam, Y. O. Chernoff, and M. Y. Sherman. **2002**. Huntington toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. *J. Cell. Biol.* 157 (6):997-1004.

Micelli, S., D. Meleleo, V. Picciarelli, and E. Gallucci. **2004**. Effect of sterols on beta-amyloid peptide (AbetaP 1-40) channel formation and their properties in planar lipid membranes. *Biophys. J.* 86 (4):2231-2237.

Miller, Y., B. Ma, and R. Nussinov. **2009**. Polymorphism of Alzheimer's Abeta17-42 (p3) oligomers: the importance of the turn location and its conformation. *Biophys. J.* 97 (4):1168-1177.

Minaki, H., K. Sasaki, H. Honda, and T. Iwaki. **2009**. Prion protein oligomers in Creutzfeldt-Jakob disease detected by gel-filtration centrifuge columns. *Neuropathology* 29 (5):536-542.

Mizuno, N., U. Baxa, and A. C. Steven. **2011**. Structural dependence of HET-s amyloid fibril infectivity assessed by cryoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108 (8):3252-3257.

Moechars, D., I. Dewachter, K. Lorent, D. Reverse, V. Baekelandt, A. Naidu, I. Tesseur, K. Spittaels, C. V. Haute, F. Checler, E. Godaux, B. Cordell, and F. Van Leuven. **1999**. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J. Biol. Chem.* 274 (10):6483-6492.

Necula, M., R. Kayed, S. Milton, and C. G. Glabe. **2007**. Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J. Biol. Chem.* 282 (14):10311-10324.

Nelson, R., M. R. Sawaya, M. Balbirnie, A. O. Madsen, C. Riekel, R. Grothe, and D. Eisenberg. **2005**. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435 (7043):773-778.

Nilsberth, C., A. Westlind-Danielsson, C. B. Eckman, M. M. Condron, K. Axelman, C. Forsell, C. Stenh, J. Luthman, D. B. Teplow, S. G. Younkin, J. Naslund, and L. Lannfelt. **2001**. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat. Neurosci.* 4 (9):887-893.

Nilsson, M. R. **2004**. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 34 (1):151-160.

Noinville, S., J. F. Chich, and H. Rezaei. **2008**. Misfolding of the prion protein: linking biophysical and biological approaches. *Vet. Res.* 39 (4):48.

Nussbaum, R. L., and C. E. Ellis. **2003**. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 348 (14):1356-1364.

Oddo, S., A. Caccamo, I. F. Smith, K. N. Green, and F. M. LaFerla. **2006**. A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of Abeta. *Am. J. Pathol.* 168 (1):184-194.

Okada, T., M. Wakabayashi, K. Ikeda, and K. Matsuzaki. **2007**. Formation of toxic fibrils of Alzheimer's amyloid beta-protein-(1-40) by monosialoganglioside GM1, a neuronal membrane component. *J. Mol. Biol.* 371 (2):481-489.

Orte, A., N. R. Birkett, R. W. Clarke, G. L. Devlin, C. M. Dobson, and D. Klenerman. **2008**. Direct characterization of amyloidogenic oligomers by single-molecule fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (38):14424-14429.

Osiewacz, H. D., D. Brust, A. Hamann, B. Kunstmann, K. Luce, M. Muller-Ohldach, C. Q. Scheckhuber, J. Servos, and I. Strobel. **2010**. Mitochondrial pathways governing stress resistance, life, and death in the fungal aging model Podospora anserina. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1197:54-66.

Outeiro, T. F., and S. Lindquist. **2003**. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science* 302 (5651):1772-1775.

Paleologou, K. E., C. L. Kragh, D. M. Mann, S. A. Salem, R. Al-Shami, D. Allsop, A. H. Hassan, P. H. Jensen, and O. M. El-Agnaf. **2009**. Detection of elevated levels of soluble alpha-synuclein oligomers in post-mortem brain extracts from patients with dementia with Lewy bodies. *Brain* 132 (Pt 4):1093-1101.

Palop, J. J., B. Jones, L. Kekonius, J. Chin, G. Q. Yu, J. Raber, E. Masliah, and L. Mucke. **2003**. Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100 (16):9572-9577.

Pan, D., Z. Ganim, J. E. Kim, M. A. Verhoeven, J. Lugtenburg, and R. A. Mathies. **2002**. Time-resolved resonance Raman analysis of chromophore structural changes in the formation and decay of rhodopsin's BSI intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* 124 (17):4857-4864.

Paoletti, M., and S. J. Saupe. **2008**. The genome sequence of Podospora anserina, a classic model fungus. *Genome Biol.* 9 (5):4.

Paravastu, A. K., R. D. Leapman, W. M. Yau, and R. Tycko. **2008**. Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (47):18349-18354.

Park, J. Y., K. S. Kim, S. B. Lee, J. S. Ryu, K. C. Chung, Y. K. Choo, I. Jou, J. Kim, and S. M. Park. **2009**. On the mechanism of internalization of alpha-synuclein into microglia: roles of ganglioside GM1 and lipid raft. *J. Neurochem.* 110 (1):400-411.

Park, S. K., S. D. Pegan, A. D. Mesecar, L. M. Jungbauer, M. J. Ladu, and S. W. Liebman. **2011**. Development and validation of a yeast high-throughput screen for inhibitors of Aβ42 oligomerization. *Dis. Model. Mech.* 4.

Pastor, M. T., N. Kummerer, V. Schubert, A. Esteras-Chopo, C. G. Dotti, M. Lopez de la Paz, and L. Serrano. **2008**. Amyloid toxicity is independent of polypeptide sequence, length and chirality. *J. Mol. Biol.* 375 (3):695-707.

Pedersen, J. S., D. Dikov, J. L. Flink, H. A. Hjuler, G. Christiansen, and D. E. Otzen. **2006**. The changing face of glucagon fibrillation: structural polymorphism and conformational imprinting. *J. Mol. Biol.* 355 (3):501-523.

Pepys, M. B. **2006**. Amyloidosis. *Annu. Rev. Med.* 57:223-241.

Perutz, M. F., J. T. Finch, J. Berriman, and A. Lesk. **2002**. Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99 (8):5591-5595.

Peters, I., U. Igbavboa, T. Schutt, S. Haidari, U. Hartig, X. Rosello, S. Bottner, E. Copanaki, T. Deller, D. Kogel, W. G. Wood, W. E. Muller, and G. P. Eckert. **2009**. The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788 (5):964-972.

Petkova, A. T., R. D. Leapman, Z. Guo, W. M. Yau, M. P. Mattson, and R. Tycko. **2005**. Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science* 307 (5707):262-265.

Porat, Y., S. Kolusheva, R. Jelinek, and E. Gazit. **2003**. The human islet amyloid polypeptide forms transient membrane-active prefibrillar assemblies. *Biochemistry* 42 (37):10971-10977.

Prusiner, S. B. **1982**. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216 (4542):136-144.

———. **1994**. Biology and genetics of prion diseases. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:655-686.

Quist, A., I. Doudevski, H. Lin, R. Azimova, D. Ng, B. Frangione, B. Kagan, J. Ghiso, and R. Lal. **2005**. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102 (30):10427-10432.

Ritter, C., M. L. Maddelein, A. B. Siemer, T. Luhrs, M. Ernst, B. H. Meier, S. J. Saupe, and R. Riek. **2005**. Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature* 435 (7043):844-848.

Roberts, B. T., and R. B. Wickner. **2003**. Heritable activity: a prion that propagates by covalent autoactivation. *Genes Dev.* 17 (17):2083-2087.

———. **2004**. A new kind of prion: a modified protein necessary for its own modification. *Cell Cycle* 3 (2):100-103.

Ruschak, A. M., and A. D. Miranker. **2007**. Fiber-dependent amyloid formation as catalysis of an existing reaction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104 (30):12341-12346.

Sabate, R., U. Baxa, L. Benkemoun, N. Sanchez de Groot, B. Coulary-Salin, M. L. Maddelein, L. Malato, S. Ventura, A. C. Steven, and S. J. Saupe. **2007**. Prion and non-prion amyloids of the HET-s prion forming domain. *J. Mol. Biol.* 370 (4):768-783.

Sabate, R., V. Castillo, A. Espargaro, S. J. Saupe, and S. Ventura. **2009a**. Energy barriers for HET-s prion forming domain amyloid formation. *FEBS J.* 276 (18):5053-5064.

Sabate, R., A. Espargaro, S. J. Saupe, and S. Ventura. **2009b**. Characterization of the amyloid bacterial inclusion bodies of the HET-s fungal prion. *Microb. Cell. Fact.* 8:56.

Safar, J., M. Ceroni, D. C. Gajdusek, and C. J. Gibbs, Jr. **1991**. Differences in the membrane interaction of scrapie amyloid precursor proteins in normal and scrapie - or Creutzfeldt-Jakob disease-infected brains. *J. Infect. Dis.* 163 (3):488-494.

Sanghera, N., and T. J. Pinheiro. **2002**. Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion. *J. Mol. Biol.* 315 (5):1241-1256.

Sattianayagam, P. T., P. N. Hawkins, and J. D. Gillmore. **2009**. Systemic amyloidosis and the gastrointestinal tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 6 (10):608-617.

Saupe, S. J. **2011**. The [Het-s] prion of Podospora anserina and its role in heterokaryon incompatibility. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 22 (5):460-468.

Sawaya, M. R., S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol, M. J. Thompson, M. Balbirnie, J. J. Wiltzius, H. T. McFarlane, A. O. Madsen, C. Riekel, and D. Eisenberg. **2007**. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447 (7143):453-457.

Schaffar, G., P. Breuer, R. Boteva, C. Behrends, N. Tzvetkov, N. Strippel, H. Sakahira, K. Siegers, M. Hayer-Hartl, and F. U. Hartl. **2004**. Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. *Mol. Cell.* 15 (1):95-105.

Selkoe, D. J. **2003**. Folding proteins in fatal ways. *Nature* 426 (6968):900-904.

Sen, A., U. Baxa, M. N. Simon, J. S. Wall, R. Sabate, S. J. Saupe, and A. C. Steven. **2007**. Mass analysis by scanning transmission electron microscopy and electron diffraction validate predictions of stacked beta-solenoid model of HET-s prion fibrils. *J. Biol. Chem.* 282 (8):5545-5550.

Siemer, A. B., A. A. Arnold, C. Ritter, T. Westfeld, M. Ernst, R. Riek, and B. H. Meier. **2006**. Observation of highly flexible residues in amyloid fibrils of the HET-s prion. *J. Am. Chem. Soc.* 128 (40):13224-13228.

Sipe, J. D., M. D. Benson, J. N. Buxbaum, S. Ikeda, G. Merlini, M. J. Saraiva, and P. Westermark. **2010**. Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 17 (3-4):101-104.

Sipe, J. D., and A. S. Cohen. **2000**. Review: history of the amyloid fibril. *J. Struct. Biol.* 130 (2-3):88-98.

Smith, D. P., S. E. Radford, and A. E. Ashcroft. **2010**. Elongated oligomers in beta2-microglobulin amyloid assembly revealed by ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107 (15):6794-6798.

Snyder, E. M., Y. Nong, C. G. Almeida, S. Paul, T. Moran, E. Y. Choi, A. C. Nairn, M. W. Salter, P. J. Lombroso, G. K. Gouras, and P. Greengard. **2005**. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat. Neurosci.* 8 (8):1051-1058.

Sparr, E., M. F. Engel, D. V. Sakharov, M. Sprong, J. Jacobs, B. de Kruijff, J. W. Hoppener, and J. A. Killian. **2004**. Islet amyloid polypeptide-induced membrane leakage involves uptake of lipids by forming amyloid fibers. *FEBS Lett.* 577 (1-2):117-120.

Stahl, N., D. R. Borchelt, K. Hsiao, and S. B. Prusiner. **1987**. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51 (2):229-240.

Stahl, N., D. R. Borchelt, and S. B. Prusiner. **1990**. Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochemistry* 29 (22):5405-5412.

Stefani, M., and C. M. Dobson. **2003**. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med. (Berl)* 81 (11):678-699.

Steunou, S., J. F. Chich, H. Rezaei, and J. Vidic. **2010**. Biosensing of lipid-prion interactions: insights on charge effect, Cu(II)-ions binding and prion oligomerization. *Biosens. Bioelectron.* 26 (4):1399-1406.

Subasinghe, S., S. Unabia, C. J. Barrow, S. S. Mok, M. I. Aguilar, and D. H. Small. **2003**. Cholesterol is necessary both for the toxic effect of Abeta peptides on vascular smooth muscle cells and for Abeta binding to vascular smooth muscle cell membranes. *J. Neurochem.* 84 (3):471-479.

Sun, Y., C. C. Lee, T. H. Chen, and H. W. Huang. **2010**. Kinetic process of beta-amyloid formation via membrane binding. *Biophys. J.* 99 (2):544-552.

Sunde, M., L. C. Serpell, M. Bartlam, P. E. Fraser, M. B. Pepys, and C. C. Blake. **1997**. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* 273 (3):729-739.

Tan, S. Y., and M. B. Pepys. **1994**. Amyloidosis. *Histopathology* 25 (5):403-414.

Taneja, V., M. L. Maddelein, N. Talarek, S. J. Saupe, and S. W. Liebman. **2007**. A non-Q/N-rich prion domain of a foreign prion, [Het-s], can propagate as a prion in yeast. *Mol. Cell* 27 (1):67-77.

Tartaglia, G. G., A. P. Pawar, S. Campioni, C. M. Dobson, F. Chiti, and M. Vendruscolo. **2008**. Prediction of aggregation-prone regions in structured proteins. *J. Mol. Biol.* 380 (2):425-436.

Taylor, J. P., J. Hardy, and K. H. Fischbeck. **2002**. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296 (5575):1991-1995.

Terzi, E., G. Holzemann, and J. Seelig. **1997**. Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide(1-40) with lipid membranes. *Biochemistry* 36 (48):14845-14852.

Tomic, J. L., A. Pensalfini, E. Head, and C. G. Glabe. **2009**. Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction. *Neurobiol. Dis.* 35 (3):352-358.

Toyama, B. H., M. J. Kelly, J. D. Gross, and J. S. Weissman. **2007**. The structural basis of yeast prion strain variants. *Nature* 449 (7159):233-237.

Turcq, B., and J. Begueret. **1998**. L'incompatibilité végétative chez les champignons filamenteux: quelles informations apporte la caracterisation des gènes impliqués. *Société Français de Génétique* 14 (6-7).

Valencia, A., P. B. Reeves, E. Sapp, X. Li, J. Alexander, K. B. Kegel, K. Chase, N. Aronin, and M. DiFiglia. **2010**. Mutant huntingtin and glycogen synthase kinase 3-beta accumulate in neuronal lipid rafts of a presymptomatic knock-in mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci. Res.* 88 (1):179-190.

Van Melckebeke, H., P. Schanda, J. Gath, C. Wasmer, R. Verel, A. Lange, B. H. Meier, and A. Bockmann. **2011**. Probing water accessibility in HET-s(218-289) amyloid fibrils by solid-state NMR. *J. Mol. Biol.* 405 (3):765-772.

Van Melckebeke, H., C. Wasmer, A. Lange, E. Ab, A. Loquet, A. Bockmann, and B. H. Meier. **2010**. Atomic-resolution three-dimensional structure of HET-s(218-289) amyloid fibrils by solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 132 (39):13765-13775.

van Rooijen, B. D., M. M. Claessens, and V. Subramaniam. **2010**. Membrane Permeabilization by Oligomeric alpha-Synuclein: In Search of the Mechanism. *PLoS One* 5 (12):e14292.

Vargas, J., J. M. Alarcon, and E. Rojas. **2000**. Displacement currents associated with the insertion of Alzheimer disease amyloid beta-peptide into planar bilayer membranes. *Biophys. J.* 79 (2):934-944.

Vitagliano, L., F. Stanzione, A. De Simone, and L. Esposito. **2009**. Dynamics and stability of amyloid-like steric zipper assemblies with hydrophobic dry interfaces. *Biopolymers* 91 (12):1161-1171.

Volles, M. J., S. J. Lee, J. C. Rochet, M. D. Shtilerman, T. T. Ding, J. C. Kessler, and P. T. Lansbury, Jr. **2001**. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* 40 (26):7812-7819.

Wadsworth, J. D., and J. Collinge. **2011**. Molecular pathology of human prion disease. *Acta Neuropathol.* 121 (1):69-77.

Walsh, D. M., I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan, and D. J. Selkoe. **2002**. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416 (6880):535-539.

Wang, Q., N. Shah, J. Zhao, C. Wang, C. Zhao, L. Liu, L. Li, F. Zhou, and J. Zheng. **2011**. Structural, morphological, and kinetic studies of beta-amyloid peptide aggregation on self-assembled monolayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (33):15200-15210.

Wasmer, C., L. Benkemoun, R. Sabate, M. O. Steinmetz, B. Coulary-Salin, L. Wang, R. Riek, S. J. Saupe, and B. H. Meier. **2009a**. Solid-state NMR spectroscopy reveals that E. coli inclusion bodies of HET-s(218-289) are amyloids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (26):4858-4860.

Wasmer, C., A. Lange, H. V. Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, and B. H. Meier. **2008**. Amyloid Fibrils of the HET-s(218-289) Prion Form a β Solenoid with a Triangular Hydrophobic Core. *Science* 319 (5869):1523-1526.

Wasmer, C., A. Schutz, A. Loquet, C. Buhtz, J. Greenwald, R. Riek, A. Bockmann, and B. H. Meier. **2009b**. The molecular organization of the fungal prion HET-s in its amyloid form. *J. Mol. Biol.* 394 (1):119-127.

Westerman, M. A., D. Cooper-Blacketer, A. Mariash, L. Kotilinek, T. Kawarabayashi, L. H. Younkin, G. A. Carlson, S. G. Younkin, and K. H. Ashe. **2002**. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22 (5):1858-1867.

Westermark, P. **2005**. Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. *FEBS J* 272 (23):5942-5949.

Westphalen, R. I., H. L. Scott, and P. R. Dodd. **2003**. Synaptic vesicle transport and synaptic membrane transporter sites in excitatory amino acid nerve terminals in Alzheimer disease. *J. Neural. Transm.* 110 (9):1013-1027.

Wickner, R. B., H. K. Edskes, D. Kryndushkin, R. McGlinchey, D. Bateman, and A. Kelly. **2011**. Prion diseases of yeast: Amyloid structure and biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22 (5):469-475.

Wickner, R. B., H. K. Edskes, E. D. Ross, M. M. Pierce, U. Baxa, A. Brachmann, and F. Shewmaker. **2004**. Prion genetics: new rules for a new kind of gene. *Annu. Rev. Genet.* 38:681-707.

Wickner, R. B., H. K. Edskes, F. Shewmaker, and T. Nakayashiki. **2007**. Prions of fungi: inherited structures and biological roles. *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (8):611-618.

Williams, T. L., I. J. Day, and L. C. Serpell. **2010**. The effect of Alzheimer's Abeta aggregation state on the permeation of biomimetic lipid vesicles. *Langmuir* 26 (22):17260-17268.

Williams, T. L., and L. C. Serpell. **2011**. Membrane and surface interactions of Alzheimer's Abeta peptide - insights into the mechanism of cytotoxicity. *FEBS J* 278 (20):3905-3917.

Williamson, J. A., J. P. Loria, and A. D. Miranker. **2009**. Helix stabilization precedes aqueous and bilayer-catalyzed fiber formation in islet amyloid polypeptide. *J. Mol. Biol.* 393 (2):383-396.

Willingham, S., T. F. Outeiro, M. J. DeVit, S. L. Lindquist, and P. J. Muchowski. **2003**. Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. *Science* 302 (5651):1769-1772.

Winner, B., R. Jappelli, S. K. Maji, P. A. Desplats, L. Boyer, S. Aigner, C. Hetzer, T. Loher, M. Vilar, S. Campioni, C. Tzitzilonis, A. Soragni, S. Jessberger, H. Mira, A. Consiglio, E. Pham, E. Masliah, F. H. Gage, and R. Riek. **2011**. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108 (10):4194-4199.

Wogulis, M., S. Wright, D. Cunningham, T. Chilcote, K. Powell, and R. E. Rydel. **2005**. Nucleation-dependent polymerization is an essential component of amyloid-mediated neuronal cell death. *J. Neurosci.* 25 (5):1071-1080.

Xue, W. F., A. L. Hellewell, W. S. Gosal, S. W. Homans, E. W. Hewitt, and S. E. Radford. **2009**. Fibril fragmentation enhances amyloid cytotoxicity. *J Biol Chem* 284 (49):34272-34282.

Yamashita, K., M. Miyazaki, Y. Yamaguchi, M. P. Briones, H. Nakamura, and H. Maeda. **2008**. Direct circular dichroism spectra measurement of stretching long-strand DNA in a tapering microchannel. *Chemical Engineering Journal* 135S:4.

Yamazaki, T., N. Blinov, D. Wishart, and A. Kovalenko. **2008**. Hydration effects on the HET-s prion and amyloid-beta fibrillous aggregates, studied with three-dimensional molecular theory of solvation. *Biophys. J.* 95 (10):4540-4548.

Yip, C. M., and J. McLaurin. **2001**. Amyloid-beta peptide assembly: a critical step in fibrillogenesis and membrane disruption. *Biophys. J.* 80 (3):1359-1371.

Zhao, H., E. K. Tuominen, and P. K. Kinnunen. **2004**. Formation of amyloid fibers triggered by phosphatidylserine-containing membranes. *Biochemistry* 43 (32):10302-10307.

Chapitre II.

Interactions des protéines amyloïdes non-toxiques et toxiques avec des monocouches de lipides à l’interface air-eau

Table des matières

Chapitre II : Interactions des protéines amyloïdes non-toxiques et toxiques avec des monocouches de lipides à l'interface air-eau 67

I. Introduction 69

II. Interactions des protéines amyloïdes WT et M8 avec les monocouches phospholipidiques pures à l'interface air-eau : adsorption, insertion et altération 70

II.1. Résumé de l'article de Ta et al. dans Langmuir (2011) 70

II.2. Publication 70

II.3. Effet de la concentration 82

II.4. Influence du pH sur l'agrégation des protéines WT et M8 et leur interaction avec les monocouches de phospholipides 88

II.4.1. Comportement de WT et M8 à l'interface d'une solution HCl à pH 2 89

II.4.2. Interactions de WT et M8 avec la monocouche de DOPG ou DOPI à l'interface d'une solution HCl à pH2 90

III. Interactions des protéines de toxicité différente avec les monocouches de DOPG et d'asolectine 95

III.1. Auto-assemblage des protéines à l'interface air-eau 97

III.1.1. Affinité des protéines pour l'interface 97

III.1.2. Structure secondaire des protéines à l'interface air-eau 99

III.2. Interactions des protéines avec les monocouches de DOPG et d'asolectine à l'interface air-eau 100

III.2.1. Insertion 100

III.2.2. Morphologie des couches formées 101

III.2.3. Structures secondaires des protéines 103

III.2.4. Nature des agrégats formés dans les interactions des protéines WT et M8 avec la monocouche d'asolectine 106

III.3. Conclusions 107

IV. Conclusions générales et discussions 108

Bibliographie 110

Article " In vivo and in vitro analyses of toxic mutants of HET-s: FTIR antiparallel signature correlates with amyloid toxicity" 112

I. Introduction

Plus de 40 maladies humaines sont associées à l'agrégation des protéines amyloïdes. Ces protéines ne partagent pas de points communs ni au niveau de la séquence peptidique ni de leur fonctions biologiques. Leurs agrégats peuvent être non-infectieux ou infectieux comme dans les maladies à prion. Pourtant, les agrégats amyloïdes partagent des propriétés communes : la forme fibrillaire, structure cross β avec la distance méridionale caractéristique de 4.7 Å, positive avec la Thioflavine T, le rouge Congo, résistance aux protéinases (Westermark et al. 2005).

Malgré le nombre important d'études sur les protéines amyloïdes en général et les prions, le mécanisme de la propagation des prions et de la toxicité des protéines amyloïdes reste à élucider. La toxicité des protéines amyloïdes semble liée à l'interaction de formes intermédiaires avec les membranes. Il existe cependant des preuves d'un mécanisme de toxicité commun des protéines amyloïdes (Bucciantini et al. 2002; Kayed et al. 2004) ce qui permet l'utilisation de modèles amyloïdes. Nous avons choisi le domaine prion de la protéine HET-s, des résidus 218 à 289 (WT). La forme amyloïde de cette protéine a une fonction biologique dans la compatibilité végétative du champignon filamenteux *P. anserina*. Un mutant toxique nommé M8 a été généré par mutagenèse aléatoire par l'équipe de Pr. Cullin à l'IBGC (Couthouis et al. 2009). Nous avons étudié l'agrégation et la relation structure-toxicité de deux protéines amyloïdes HET-s non-toxique (WT) et son mutant toxique (M8) avec des modèles membranaires.

Les membranes naturelles sont des systèmes très complexes. L'utilisation de modèles membranaires permet d'étudier différents aspects fonctionnels de la membrane. Dans une première approche, nous avons utilisé un modèle de monocouche lipidique à l'interface air-eau (modèle de Langmuir) dont les propriétés physicochimiques telles que la pression membranaire, la composition membranaire, l'aire moléculaire… sont des paramètres faciles à contrôler par rapport aux modèles de bicouches lipidiques.

Dans une première étude, nous avons utilisé des monocouches homogènes de phospholipides de charges différentes (neutres, négatives) pour étudier les interactions avec les protéines amyloïdes. Les principaux résultats de ces études ont fait l'objet d'un article publié dans Langmuir (Ta et al. 2011). La publication constitue le corps de cette partie.

Dans une deuxième étude, nous présenterons les résultats de l'effet de la concentration et l'influence de pH sur l'interaction des protéines WT et M8 avec les monocouches.

Enfin, dans une troisième partie, nous exposerons les résultats d'une étude plus large sur divers groupes d'amyloïdes (obtenus par mutagenèse dirigé de HET-s (218-289)) et leur

interaction avec les membranes monocouches. Une partie de ces résultats ont été publiée dans J.Mol.Biol en 2011 (Berthelot et al. 2011).

II. Interactions des protéines amyloïdes WT et M8 avec les monocouches phospholipidiques pures à l'interface air-eau : adsorption, insertion et altération

II.1. **Résumé de l'article de Ta et al. dans Langmuir (2011)**

Dans cette étude, nous avons comparé l'auto-assemblage de la protéine amyloïde HET-s (218-289) non-toxique (WT) et du mutant toxique (M8) à l'interface air-eau et en interaction avec différentes monocouches de phospholipides (DOPE, DOPC, DOPI, DOPS, DOPG).

Premièrement, l'ellipsométrie et la spectroscopie PMIRRAS (Polarization Modulation InfraRed Reflexion-Absorption Spectroscopy) ont montré que l'interface air-eau favorise et modifie l'auto-assemblage du WT. En effet, injectés dans une cuve de Langmuir avec le rapport surface/volume favorisé, les monomères de WT s'agrègent presque instantanément à l'interface air-eau en formant un film avec des propriétés des fibres amyloïdes (structure secondaire essentiellement en feuillets β, forme fibrillaire, teinté avec le rouge Congo accompagné de la biréfringence sous la lumière polarisée). Cet assemblage à l'interface air-eau est bien plus rapide que la cinétique de formation de fibres en solution où une phase de latence d'environ 40 minutes est observée avant l'observation de structure en feuillets β (Berthelot et al. 2009). De plus, l'analyse des spectres PMIRRAS permet d'établir la formation de feuillets β antiparallèles du WT à l'interface air-eau alors qu'en solution elle adopte une structure essentiellement en feuillets β parallèles, observée par ATR-FTIR (Berthelot et al. 2009) et par RMN du solide (Wasmer et al. 2008). Il semble que l'interface air-eau influence la structuration du WT. En revanche, le comportement du mutant M8 à l'interface air-eau et en solution est similaire avec une cinétique d'auto-assemblage rapide et une structure secondaire principalement en feuillet β antiparallèle.

Deuxièmement, l'étude de ces deux protéines amyloïdes (WT et M8) avec les monocouches des phospholipides soit zwitterioniques (DOPC ou DOPE) soit chargées négativement (DOPI ou DOPG ou DOPS) a montré l'importance des interactions électrostatiques : les protéines interagissent majoritairement avec des phospholipides chargés négativement. La perturbation de l'intégrité des monocouches est beaucoup plus importante avec le mutant toxique M8 qu'avec le WT non toxique.

II.2. **Publication**

Langmuir

ARTICLE

pubs.acs.org/Langmuir

Comparative Studies of Nontoxic and Toxic Amyloids Interacting with Membrane Models at the Air−Water Interface

Ha Phuong Ta,[†,‡] Karine Berthelot,[§] Bénédicte Coulary-Salin,[§] Bernard Desbat,[†] Julie Géan,[†] Laurent Servant,[‡] Christophe Cullin,[§] and Sophie Lecomte[*,†]

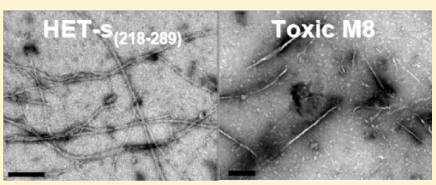
[†]Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets, Université de Bordeaux-CNRS, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France

[‡]Institut des Sciences Moléculaires, Université de Bordeaux-CNRS, 351 cours de la libération, 33405 Talence Cedex, France.

[§]Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS-Université Bordeaux 2 "Victor Segalen", 1 rue Camille Saint Saëns, 33077 Bordeaux Cedex, France

S *Supporting Information*

ABSTRACT: Many in vitro studies have pointed out the interaction between amyloids and membranes, and their potential involvement in amyloid toxicity. In a previous study, we generated a yeast toxic mutant (M8) of the harmless model amyloid protein HET-s$_{(218-289)}$. In this study, we compared the self-assembling process of the nontoxic wild-type (WT) and toxic (M8) protein at the air−water interface and in interaction with various phospholipid monolayers (DOPE, DOPC, DOPI, DOPS and DOPG). We first demonstrate using ellipsometry measurements and polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopy (PMIRRAS) that the air−water interface promotes and modifies the assembly of WT since an amyloid-like film was instantaneously formed at the interface with an antiparallel β-sheet structuration instead of the parallel β-sheet commonly observed for amyloid fibers generated in solution. The toxic mutant (M8) behaves in a similar manner at the air−water interface or in bulk, with a fast self-assembling and an antiparallel β-sheet organization. The transmission electron microscopy (TEM) images established the fibrillous morphology of the protein films formed at the air−water interface. Second, we demonstrate for the first time that the main driving force between this particular fungus amyloid and membrane interaction is based on electrostatic interactions with negatively charged phospholipids (DOPG, DOPI, DOPS). Interestingly, the toxic mutant (M8) clearly induces perturbations of the negatively charged phospholipid monolayers, leading to a massive surface aggregation, whereas the nontoxic (WT) exhibits a slight effect on the membrane models. This study allows concluding that the toxicity of the M8 mutant could be due to its high propensity to interact with membranes.



INTRODUCTION

More than 40 human pathologies are associated with amyloid proteins, and many are neurodegenerative disorders such as Alzheimer disease (amyloid-β, Aβ), Parkinson disease (α-synuclein) or Prion disease (PrP) (for review, see ref 1). Amyloids share common properties: association in fibrils, fibers, or aggregates with a cross-β sheet backbone and a classical 4.7 Å X-ray diffraction pattern. They also exhibit resistance to proteinases, and staining by various dyes as Thioflavine T or Congo red with which birefringence is observed. While numerous studies focused on pathological aspects, the origin of the amyloid toxicity remains unclear. Some authors have shed light on toxic intermediates of the fibrillization process, demonstrating that monomers,[2] oligomers,[3,4] and annular or short/quiescent fibrils[5−7] could be the toxic species. Others incriminate the deleterious formation of pores and channels into biological membranes.[8,9]

In the past decade, increasing evidence has shown that biological membranes are involved in amyloidogenesis (for review, see refs 10 and 11). Amyloids displayed toward lipids or membranes exhibit diverse properties: binding,[12] insertion,[13−15] disruption, and damages.[16−18] In addition, lipids may catalyze the aggregation process,[19,20] but it has also been shown with Aβ that natural lipids could resolubilize mature amyloid fibers into toxic protofibrils.[21] Lipid composition of the membrane may therefore impact the interaction of various amyloids with membranes in vivo.[16,18]

Amyloid bulk kinetics and structures may be significantly different from their interfacial characteristics,[22−24] which are more physiologically relevant. Langmuir monolayers therefore represent a convenient model system to mimic biological membranes and study amyloid interactions (for review, see ref 25), and infrared spectroscopy allows the characterization of secondary structures and their organizations at interfaces. Few Langmuir studies have been performed with amyloids, but many reports suggest that hydrophobic or negatively charged surfaces may promote nucleation or fibrillogenesis by favoring local concentration of proteins.[26−28] Studies at the air−water interface by compression isotherms demonstrated that hIAPP (Islet amyloid polypeptide involved in type 2 diabetes)[29] and various Aβ peptides were able to form highly stable monolayers.[18,30−33] These

Received: September 22, 2010
Revised: February 9, 2011
Published: March 15, 2011

ACS Publications © 2011 American Chemical Society

dx.doi.org/10.1021/la103788r | *Langmuir* 2011, 27, 4797–4807

amyloids were able to adhere and also insert into various negatively charged lipid monolayers, adopting a flat β-sheet conformation usually parallel to the surface.[29,31,34]

Our model amyloid is the prion-forming domain (PFD) of HET-s, a 289 amino protein of the filamentous fungus *Podospora anserina*. This protein is involved in a cell-death phenomenon termed heterocaryon incompatibility, which is able to control the cell fusion process. The prion domain HET-s$_{(218-289)}$ also assembles into an amyloid, which is nontoxic when expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.[35] In a previous work, we generated a yeast toxic mutant called M8,[35] which differs from the wild-type (WT) by 10 mutations (see Supporting Information Figure 1S). In vivo, this mutant forms small dotted aggregates that differ from the annular WT large aggregates.[35] We previously biochemically and biophysically characterized the structural particularities of the M8 mutant fibers and their differences compared to the WT amyloid.[36] In vitro, WT amyloids exhibit some typical micrometer-long fibers, while M8 proteins assemble into 80 nm-long filaments; wide-angle X-ray scattering (WAXS) and attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) allowed us to confirm that M8 fibrils were amyloids but with a totally different secondary structure based on an antiparallel organization of the β-sheets.[36] Moreover, M8 seems to clearly interfere in vivo with vesicular trafficking and membranes.[37] So far, no evidence of direct interactions between HET-s and membranes was investigated.

The complexity of biological membrane surfaces warrants the use of model membrane systems to investigate interactions between peripheral membrane proteins and phospholipids. Model systems constructed from monolayers rather than vesicles (bilayers) offer greater control over experimental variables such as surface density, surface pressure, subphase composition and molecular area. We use ellipsometry measurements and polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopy (PMIRRAS) to determine the morphological and structural properties of monolayers at the air−water interface. Ellipsometry images allow the visualization of the morphology of protein and lipid domains at the air−water interface, as well as changes in lipid monolayer organization after binding of the protein, with a spatial resolution in the micrometer order. The variations of measured ellipsometric angles allow the evaluation of the thickness of the layers present at the air−water interface. PMIRRAS gives access to the structure of the lipids, the protein secondary structure, and its orientation at the air−water interface.

In this paper, we first investigated the self-association of nontoxic amyloid (WT) versus toxic amyloid (M8) at the air−water interface. Second, in order to gain better insight into the toxicity and lipid binding specificities of the M8 mutant, we investigated the molecular interaction of toxic amyloid M8 compared to that of the nontoxic WT amyloid at the air−water interface with various kinds of lipids commonly found in yeast,[38,39] by ellipsometry and PMIRRAS. Herein we demonstrate the strong interaction of the toxic M8 amyloid with negatively charged lipids (DOPS, DOPI, and DOPG). In contrast, the interaction with the nontoxic amyloid is weaker, allowing us to propose that the toxicity of M8 could lie in its interaction with the membrane.

EXPERIMENTAL SECTION

PFD Purifications. The C-terminal histidine-tagged HET-s$_{(218-289)}$ constructs (WT and M8 ; Supporting Information Figure 1S) were purified as previously described.[36] For renaturation, the proteins were submitted to gel filtration on Hi-Trap Sephadex G-25 (GE Healthcare Europe GmbH, Orsay, France) at 4 °C, using 10 mM HCl pH 2.0 as the eluent. Subsequently, the pH was brought up to 7.4 by adding phosphate-buffered saline (PBS) 10× (1.37 M NaCl, 26.8 mM KCl, 101.4 mM Na_2HPO_4, 17.6 mM K_2HPO_4; MP Biomedicals Europe, Illkirch) at 1× final concentration. The physicochemical parameters of WT and M8 proteins are listed in Supporting Information Table 1S.

Chemicals. 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1′-*rac*-glycerol) (sodium salt) (DOPG), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1′-myo-inositol) (ammonium salt) (DOPI), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt) (DOPS), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. Organic solvents of HPLC grade were purchased from Aldrich (France). All other chemicals of the highest purity available were purchased from Sigma-Aldrich. Ultrapure water with a nominal resistivity of 18 mΩ·cm (Milli-Q, Millipore) was used for all the buffers.

Film Formation and Surface Pressure Measurements. Adsorption experiments were performed at 25 ± 1 °C on a circular Teflon trough (20.4 cm^2). The surface pressure (π) was measured with a plate of Whatman filter paper held by a Nima Wilhelmy balance. The trough was filled with 8 mL of PBS buffer (pH 7.4) or 10 mM HCl solution (pH 2.0). The surface tension of the water was measured at 72.8 mN/m. The interaction of WT or M8 with lipid films was performed in two steps. First, the lipids were spread at the air−water interface from chloroform/methanol (80%/20% v/v) solution at 0.2 mg/mL to reach the desired final surface pressure. Twenty minutes were required for solvent evaporation and pressure stabilization. Second, the proteins were injected into the subphase and stirred. The surface pressure was measured continuously until an equilibrium pressure was reached.

Ellipsometry Measurements. The thickness of the films formed was determined using a NFT IElli2000 ellipsometer (Göttingen, Germany) equipped with a doubled frequency Nd:YAG laser (532 nm, 50 mW), a polarizer, a compensating plate, an analyzer, and a CCD camera. It operates on the principle of classical null ellipsometry.[40] This parameter has been obtained from the ellipsometric angles (ψ and Δ) measured with an incidence angle of 54.58°, which give the null conditions. The morphology of films at the air−water interface was observed by the CCD camera. The spatial resolution was about 2 μm, and the size of images was 450 × 670 μm with a ×10 magnification lens used. The angles of the polarizer, compensator, and analyzer that obtained the null condition allow one to obtain the (Δ, Ψ) angles, which are related to the optical properties of the sample. For ultrathin films, Δ is proportional to the film thickness. Application of the measured data with computerized optical modeling included in the ellipsometric software leads to a deduction of film thickness for a given refractive index. The value of the film thickness mainly depends on the refractive index used. Since it is difficult to determine an accurate experimental refractive index value, we therefore decided to use the same average value of the refractive index 1.45 for both lipid layers and proteins to reduce the number of parameters introduced in our model.[41,42] We will discuss the results mainly by comparing the thickness of the various studied systems. The pictures presented in the various figures were corrected from the tilt angle observation.

Congo Red Binding and Birefringence. The protein (WT or M8) layers and the layers of lipid/WT or lipid/M8 presented at the air−water interface (0.75 μM, 25 °C after 3 h) were transferred by direct adsorption onto microscope glass coverslips (22 × 22 mm; Knittel Glaser, Germany). The glass coverslips were beforehand cleaned with CH_2Cl_2 to increase hydrophobicity and favor the adsorption of the films. Coverslips were then gently put in contact for 2 s with the interface (horizontal transfer) and let air-dried for 30 min. Adsorbed layers were

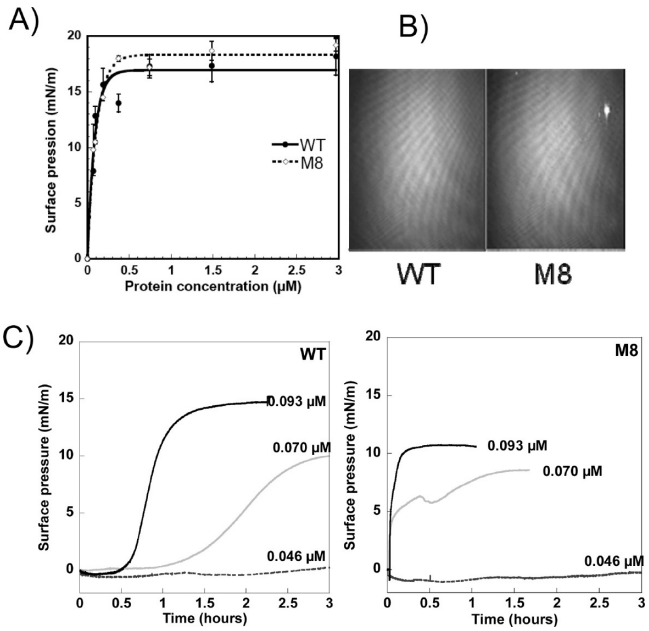


Figure 1. HET-s($_{218-289}$) (WT) and its toxic Mutant 8 (M8) are surface active. (A) Surface pressure−protein concentration curves of WT and M8 at the air−water interface (PBS pH 7.4) and at equilibrium. (B) Ellipsometric images at equilibrium (0.75 μM in PBS after 180 min). The size of the images was 450 × 670 μm. (C) Surface pressure−time curves for different concentrations of proteins (WT and M8) at the air−water interface. Temperature was at 25 °C.

then stained 2 s by incubation in a 20 μM Congo red solution in PBS buffer. Congo red binding and birefringence were observed with an ECLIPSE E600FN microscope (Nikon, Japan) with a PlanFluor 40× objective and a DXM1200 digital camera (Nikon) equipped with optimally aligned cross-polarizers.

Transmission Electron Microscopy (TEM). Protein films formed (0.75 μM, 25 °C after 1h30, thickness of about 33 Å) and visualized by ellipsometric microscopy were transferred for 2 s by adsorption onto Formvar-coated, carbon-stabilized copper grids (400 mesh) and allowed to dry for 15 min in air. Grids were then negatively stained 1 min with 10 μL of freshly prepared 2% uranyl acetate in water, dried with filter paper, and examined with a Hitachi H7650 transmission electron microscope (Hitachi, Krefeld, Germany) at an accelerating voltage of 120 kV. TEM was performed at the Pôle Imagerie Électronique of the Bordeaux Imaging Center.

PMIRRAS Measurements. PMIRRAS spectra were recorded on a Nicolet (Madison, WI) Nexus 870 spectrometer equipped with a HgCdTe (MCT) detector (SAT, Poitiers) and cooled at 77 K by nitrogen liquid at a resolution of 8 cm^{-1} by coadding 600 scans. Details of PMIRRAS experiments were described in a previous paper.[43] PMIRRAS spectra were normalized by the subphase spectrum. The room temperature was regulated at 25 ± 1 °C.

RESULTS

Amyloid-like Film Formations at the Air−Water Interface. Both nontoxic WT and toxic M8 proteins formed a homogeneous film at the air−water interface (Figure 1). Different protein concentrations from 0.046 μM to 2.969 μM were injected into the PBS subphase (pH 7.4). The surface pressure was measured continuously until equilibrium was reached. The surface pressure at the equilibrium increases with the concentration of WT or M8 in a similar manner to a maximum of about 18 mN/m,

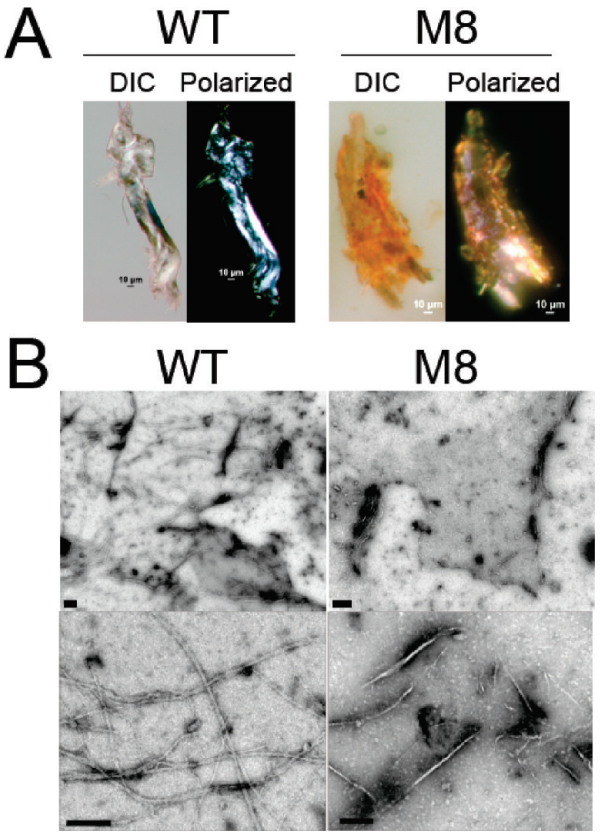


Figure 2. Fibrillous morphologies of WT and M8 films formed at the air−water interface. (A) Observation by light microscopy after staining with Congo red (left). Birefringence images (right) were observed under cross-polarized light. (B) TEM images of WT and M8 films. TEM scale bars represent 200 nm. For both microscopic observations, films were formed after protein injection of 0.75 μM in the PBS subphase at 25 °C. After 1 h 30 min (thickness of about 33 Å), the surface pressure was reached at 16 mN/m, and films were then transferred by direct adsorption onto glass coverslips or TEM grids.

when the protein concentration is superior to 0.5 μM (Figure 1A). Ellipsometric images at equilibrium are also very similar (Figure 1B). Below 0.093 μM, the formation of WT monolayer at the air−water interface was preceded by a long lag phase (Figure 1C). For M8, the surface pressure increased just after injection even at 0.07 μM and no lag phase was observed (Figure 1C). Therefore, we could assume that M8 has a protein film formation faster than WT at the air−water interface, for low concentration. In solution, we previously demonstrated that the M8 toxic mutant assembly occurs through a totally different amyloidogenic pathway when compared to WT assembly.[44]

Results confirmed that under a specific threshold the protein adsorption kinetic depended strongly on protein quantity injected into the subphase.[30] Then, injection of 0.75 μM of WT or M8 leads to a maximum surface pressure, in equilibrium conditions. The variation of the ellipsometric angle ($\delta\Delta = 9.5°$ for both WT and M8) can be used to estimate the thickness of the film formed at the air−water interface. For a refractive index value of 1.45, we determined that both WT and M8 at equilibrium formed a homogeneous film of about 33 Å ± 3 Å.

The protein films formed at the surface (WT and M8) were transferred by adsorption and dried onto microscope coverslips and TEM grids. We know from our previous study that TEM

dx.doi.org/10.1021/la103788r |Langmuir 2011, 27, 4797–4807

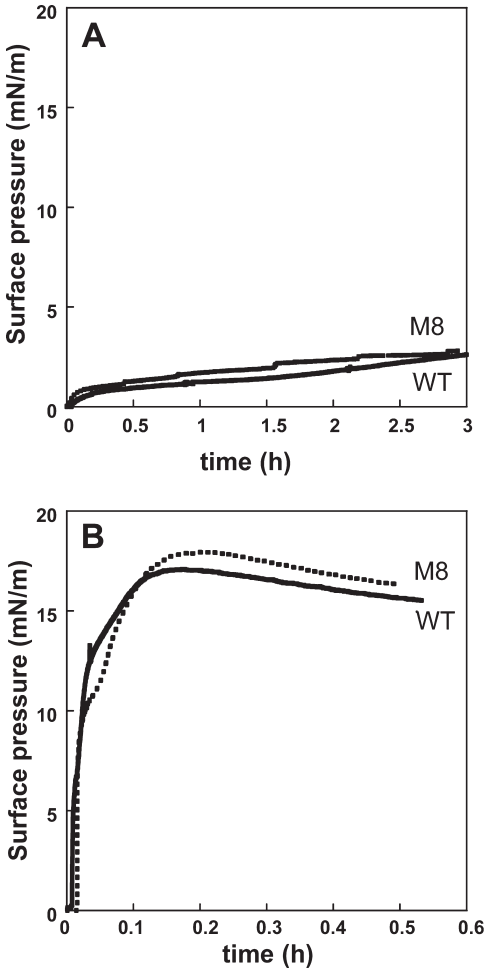


Figure 3. Pressure−time curves of WT and M8 adsorption process at air−water interface with a subphase at pH 2.0 (A) or at pH 7.4 (PBS) (B). Protein concentration was at 0.75 μM in PBS and temperature at 25 °C. NB: Different time scales, < 0.6 h for (B).

grids do not induce the polymerization of our amyloids in bulk,[44] and we assumed that the behavior was identical on glass coverslips. The samples adsorbed on microscope coverslips were then stained with Congo red dye. Observed under a microscope, the aggregates formed were quite "tissue-like", stained in red, and birefringent, which are classical amyloid characteristics (Figure 2A). We further analyzed these protein films by TEM after negative staining. A very dense fibrillar morphology was observed for the WT film (Figure 2B, top image), and the presence of numerous long fibers was detected. Indeed, our observations were very reminiscent of the amyloid fibers observed in bulk solution.[36] On the contrary, very few long fibers could be observed in the M8 film, but globally M8 forms much shorter fibers and fibrils than WT, and a large amount of small aggregates or intermediates are observed in the M8 film (white spots in Figure 2B; bottom large magnification). Nanofibers of about 80 nm and round oligomers were also a characteristic of M8 amyloidogenesis in bulk solution.[44] We previously established that the morphology of WT and M8 amyloid fibers formed in solution were also very different,[36] and we confirm also in this study that WT and M8 films differ in their molecular assembly. TEM and Congo red staining observations confirm that both WT and M8 are indeed fibrillar.

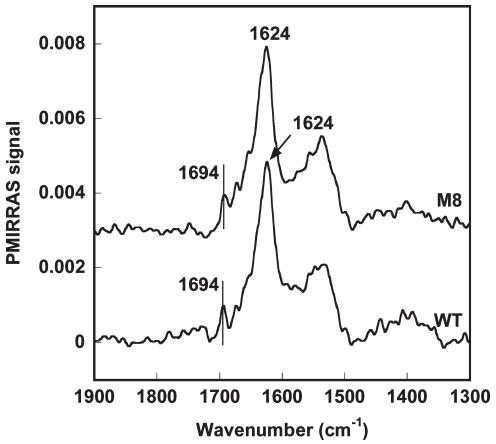


Figure 4. PMIRRAS spectra of WT and M8 aggregates at the air−water interface at pH 7.4. A cutoff of about 3×10^{-3} (PMIRRAS signal) is made between the two spectra to ensure a better observation. Protein concentration was at 0.75 μM in PBS and temperature at 25 °C. The pressure was around 16 mN/m.

Both WT and M8 proteins after purification at pH 2.0 are monomeric and unstructured.[44] A small increase of the surface pressure (2.5 mN/m) is observed if the subphase used is at pH 2.0 compared with a subphase at pH 7.4 (Figure 3). Then, the acidic interface cannot promote alone the formation of a compact peptide film at the interface (Figure 3A). Indeed the formation of WT and M8 films at the air−water interface is induced by the buffered subphase at pH 7.4, and at a concentration of 0.75 μM the kinetics of the assembling of both proteins does not present any lag phase (Figure 3B). With PBS as the subphase, the kinetic of film formation at the air−water interface is similar for the nontoxic and toxic-amyloid (Figure 3B). Ten minutes after the injection of the monomers, the maximum of surface pressure is reached and homogeneous films are formed at the air−water interface for both proteins. In addition, at the interface, we only observed a lag phase for WT at low concentrations (Figure 1B). Clearly bulk solution and interface self-assemblings are different, as WT polymerization exhibits a clear lag phase in bulk solution, even at a far higher concentration (50 μM).[44]

Figure 4 presents the PMIRRAS spectra of WT and M8 at the air−water interface, recorded 180 min after the injection of 0.75 μM of each protein in a monomeric form. In the amide I region 1600−1700 cm^{-1}, the spectra of WT or M8 aggregates showed an intense band at 1624 cm^{-1} and a faint shoulder at 1694 cm^{-1}, which is characteristic of an antiparallel β-sheet organization.[33,45] As known, an antiparallel β-sheet organization presents two components: one at low wavelength (between 1630 and 1620 cm^{-1}) and the second at higher wavelength (around 1680−1690 cm^{-1}) with an intensity ratio (I_{1690}/I_{1620}) from 1/8 to 1/10.[34,45] This explains why we observed a weak peak at 1690 cm^{-1} for both proteins. A parallel β-sheet signature would instead give a unique band around 1630 cm^{-1}, as previously observed by PMIRRAS.[46,47] Therefore, the profiles of both amide I and amide II bands are representative of antiparallel β-sheets mainly orientated parallel to the interface, as shown in previous works.[43,47] In conclusion, at the air−water interface, both proteins (WT and M8) have surface active properties, which organize as films with similar antiparallel β-sheet structures and amyloid-like properties (see above: stained by Congo red, birefringence, and fibrillous morphologies). This is clearly

dx.doi.org/10.1021/la103788r |Langmuir 2011, 27, 4797–4807

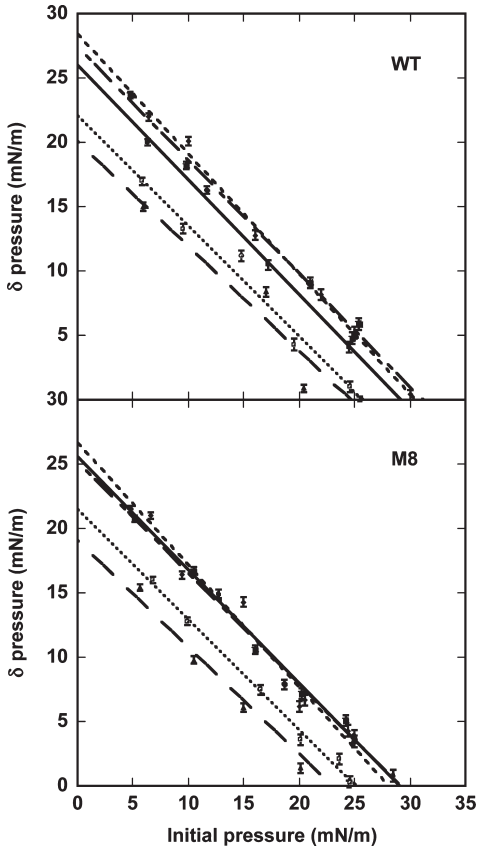


Figure 5. $\pi-\pi_i$ curves of the WT and the M8 interacting with monolayers of DOPI (●), DOPG (■), DOPS (♦), DOPC (▲), and DOPE (○). Protein concentration was 0.75 μM in PBS, and the temperature was 25 °C.

Table 1. MIP of the Proteins into Phospholipid Monolayers

	MIP (mN/m)	
	WT	M8
DOPC	24.7 ± 0.4	23.0 ± 0.4
DOPE	25.7 ± 0.5	25.2 ± 0.4
DOPI	29.2 ± 0.5	29.1 ± 0.5
DOPG	30.5 ± 0.5	29.2 ± 0.5
DOPS	30.5 ± 0.5	28.1 ± 0.5

different from the amyloid fibers formed in bulk solution, as WT is organized in parallel and M8 in antiparallel β-sheets (see Supporting Information Figure 2S).

Electrostatic Interaction Induces Insertion of M8 and WT in the Lipid Monolayers. To investigate the ability of WT and M8 to interact with a membrane, we formed monolayers of different phospholipids at the air−water interface and then injected unstructured proteins (pH 2.0) in the buffered subphase (PBS pH 7.4). Langmuir monolayers of negatively charged DOPS, DOPG, and DOPI and also zwitterionic DOPC and DOPE have been used. We carefully checked that no oxidation of the lipids occurs during the experiments following the surface pressure evolution. An oxidation of the lipids would induce a large decrease of the surface pressure, as described by Stottup et al.[48] Figure 5 illustrates the relationship between absolute

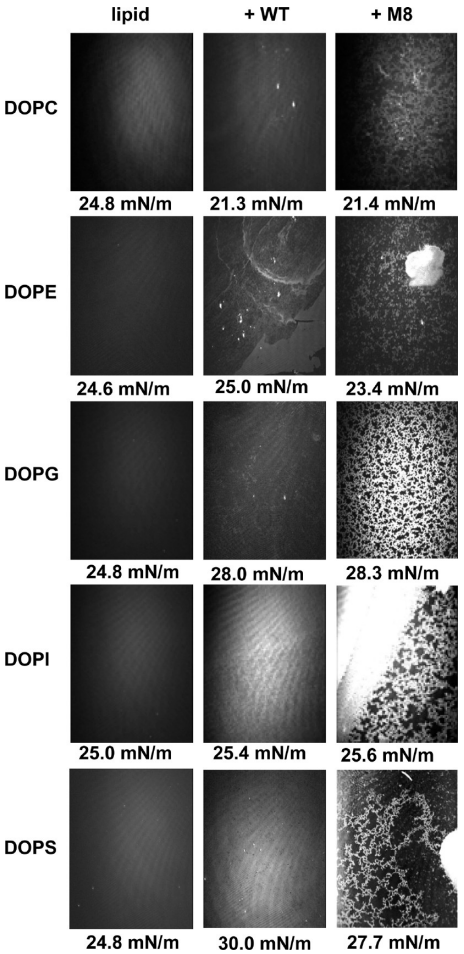


Figure 6. Ellipsometric images of DOPC, DOPE, DOPG, DOPI, and DOPS monolayers alone, and then after injection in the PBS subphase of 0.75 μM of WT and M8, respectively. Images were captured 180 min after protein injection. Surface pressure is indicated under each image. The size of the images was 450 × 670 μm.

increase in surface pressure ($\Delta\pi$) following injection of WT or M8 into the buffered subphase (pH 7.4) and the initial monolayer pressure (π_i). This graphical relationship generally reflects the relative insertion affinities to the Langmuir monolayer; higher values of the absolute increase in surface pressure indicate more pronounced insertion into the lipid monolayer. The sensitivity of both proteins to the five different monolayers of lipids are equal; indeed the slopes of the straight lines are very similar. The maximum insertion pressure (MIP), also called the critical insertion pressure (π_c), can be obtained by extrapolating the curve $\Delta\pi-\pi_i$ with the x axis. The obtained values are listed in Table 1. The MIP was observed between 24 and 25 mN/m for WT and M8 interacting with zwitterionic charged phospholipids, whereas an increase of the MIP (+4 or +5 mN/m) is observed with negatively charged lipids. Then, when the initial pressure was less than 25 mN/m, the insertion of both proteins resulted in pressure increases for all five tested phospholipids. With the initial pressure superior or equal to 25 mN/m, there was insertion only in the case of negatively charged phospholipids (DOPG, DOPS, and DOPI) with both proteins (Figure 5). Thus, both proteins have a stronger interaction with the anionic lipids than with the zwitterionic lipids. Considering the MIP of

dx.doi.org/10.1021/la103788r |Langmuir 2011, 27, 4797–4807

Table 2. Thickness of the Surface Layers and Ellipsometric Angles before and after Interaction with Proteins with PBS pH 7.4 as the Subphase[a]

	ellipsometric angle ($\delta\Delta$, Ψ) and layer thickness (Å)					
			lipid monolayer in interaction with			
	lipid monolayer		WT		M8	
	$\lvert\delta\Delta\rvert^\circ = \lvert\Delta - \Delta_0\rvert$ Ψ°	thickness (Å)	$\lvert\delta\Delta\rvert^\circ$ Ψ°	thickness (Å)	$\lvert\delta\Delta\rvert^\circ$ Ψ°	thickness (Å)
DOPC	4.7 ± 0.8	16 ± 2	6.4 ± 0.8	23 ± 3	10.4 ± 0.8	35 ± 4
	2.40 ± 0.12		2.39 ± 0.12		2.40 ± 0.12	
DOPE	4.9 ± 0.8	15 ± 2	14.1 ± 0.8	47 ± 4	13.7 ± 0.8	44 ± 4
	2.4 ± 0.12		2.37 ± 0.12		2.40 ± 0.12	
DOPG	4.5 ± 0.8	15 ± 2	6.0 ± 0.8	20 ± 2	21.0 ± 0.8	70 ± 6
	2.40 ± 0.12		2.40 ± 0.12		2.41 ± 0.12	
DOPI	5.6 ± 0.8	18 ± 1	13.6 ± 0.8	46 ± 5	32.5 ± 0.8	110 ± 11
	2.36 ± 0.12		2.37 ± 0.12		2.35 ± 0.12	
DOPS	4.8 ± 0.8	16 ± 1	10.6 ± 0.8	35 ± 3	29.2 ± 0.8	100 ± 9
	2.38 ± 0.12		2.38 ± 0.12		2.40 ± 0.12	

[a] The thickness was determined using a mean value of 1.45 for the refractive index. Results are presented as mean ± SD.

the M8 in comparison with the WT toward different phospholipids monolayers, no significant difference was demonstrated.

Toxic Amyloid (M8) Exhibits a Strong Interaction with Monolayer of Anionic Phospholipids. Although the variations of pressure are similar for M8 and WT in the presence of the studied phospholipid monolayers, ellipsometric images pointed out larger perturbations with the toxic mutant (M8) than with the WT (Figure 6). First, the ellipsometric images of the lipid monolayers alone at the initial surface pressure of around 25 mN/m show that homogeneous fluid films of lipids are formed at the air−water interface. The thickness of each phospholipid monolayer was calculated using a refractive index value of 1.45. Classical values were obtained for the phospholipid between 15 Å ± 2 Å and 16 Å ± 2 Å (see Table 2). Second, ellipsometric images of lipid monolayers in the presence of WT and M8 are presented 180 min after injection, and the surface pressure is indicated under each image (see Figure 6). As described before, an increase of the surface pressure was observed only with negatively charged phospholipids with both proteins. The films in the presence of WT always seem more homogeneous than those in the presence of M8. Stronger modifications with M8 were observed on the ellipsometric images revealing the presence of large aggregates when M8 interacts with monolayers of phospholipid, compared with WT. The brighter the aggregates are, the thicker the domains are. The thickness of the film in each case was determined from the ellipsometric angle variations and using a mean value for the refractive index (1.45) (Table 2). The difference in morphologies observed in Figure 6 images clearly revealed that the perturbation of the layers depends on specific interactions between proteins and lipids rather than on the insertion of protein into lipid layers. In the M8−lipids interaction, the appearance of aggregated domains at the air−water interface is common whatever the lipid, but the thickness of the layer increases for anionic lipids. The thicknesses (70 to 110 Å ± 10 Å) are multiplied by a factor of 5, comparing with pure DOPG, DOPI, or DOPS (15 to 16 Å ± 2 Å) . With zwitterionic lipids (DOPC, DOPE), despite very little or no insertion of M8 into the lipid layers, theses layers were considerably destabilized by the adsorption of proteins, as revealed by the observed aggregates (see Figure 6: M8+DOPC and M8+DOPE). In the WT−lipids interaction, although the surfaces were not homogeneous and they showed increased thickness at the surface (maximum ×3), the effects were obviously weaker. These results clearly demonstrated that the toxic M8 protein has significant effects toward phospholipid monolayers and more precisely with anionic phospholipids. We may suppose that the larger thickness observed for M8 indeed reflects a larger amount of M8 proteins (concentration effect) interacting with anionic lipids at the air−water interface.

WT and M8 Aggregates with Lipids Have Amyloid-like Properties. The macroscopic information on the protein (WT or M8)−lipid assembly at the air−water interface obtained by ellipsometry was then compared with PMIRRAS spectra, which provide information about the molecular structure. The PMIRRAS spectra of pure lipid monolayer in the 1800−1300 cm^{-1} range exhibit only one band at around 1730 cm^{-1}, assigned to the C=O elongation vibrational mode of the phospholipids. The broad negative peak at 1660 cm^{-1} is obviously associated with the $\delta(OH_2)$ deformation vibrational mode of the liquid water.[43] More precisely, this is due to the contrast of refraction index between lipid and water.[49] This phenomenon is observed in PMIRRAS spectra of compounds showing no absorption in the 1600−1700 cm^{-1} range, as for phospholipids.[43,47,50] In the case of peptides or proteins, it is more complex because the amide I has a strong absorption almost at the same frequency as that of the absorption of water. So the contrast between the refraction index of water and the refraction index of the protein layer is weak, and the experimental and simulation data show that the strong negative peak can almost completely disappear.[43,47,50] Depending on the orientation of the protein, this optical effect can appear or disappear.[43,47,50] When the β-sheet or α-helix are flat on the surface, the negative peak at 1660 cm^{-1} disappears, and when the β-sheet or α-helix are perpendicular (C=O group perpendicular to the surface) the negative peak appears. Such effect can be observed on the spectra of the pure proteins at the surface (Figure 4), where the relative intensities of the bands

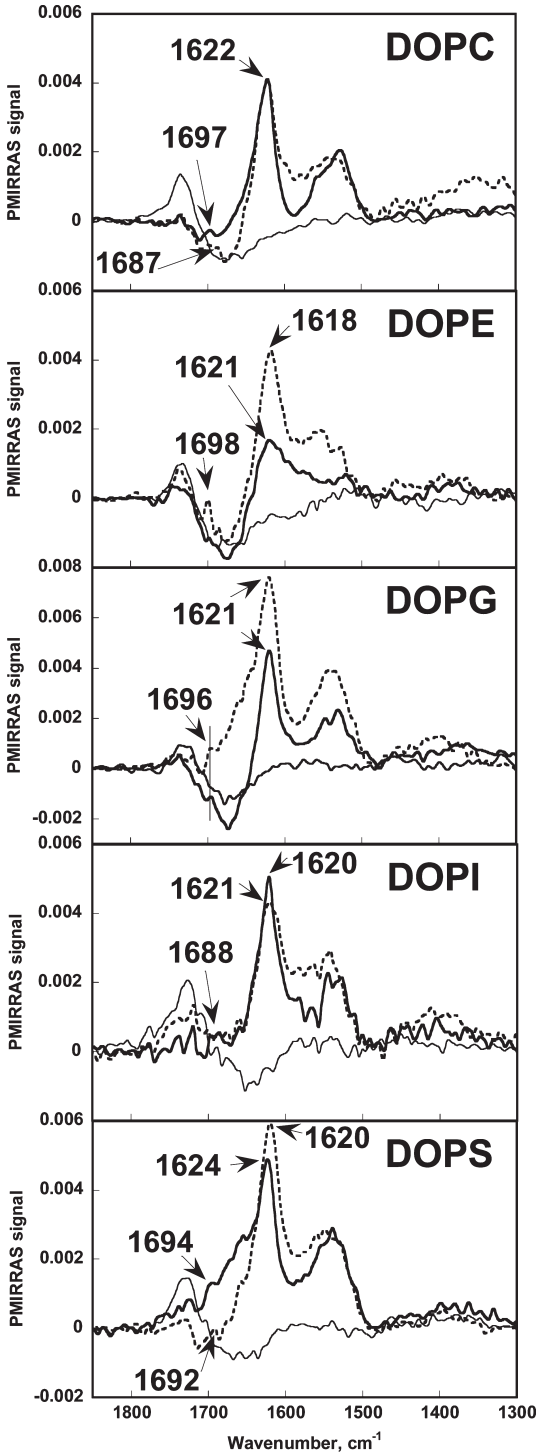


Figure 7. PMIRRAS spectra of the surface layer in protein−DOPC, DOPE, DOPG, DOPI, and DOPS interactions. Interactions are presented as lipid only (thin line), lipid−WT (bold line), and lipid−M8 (dotted line). The initial pressure of lipid monolayers was 25 mN/m.

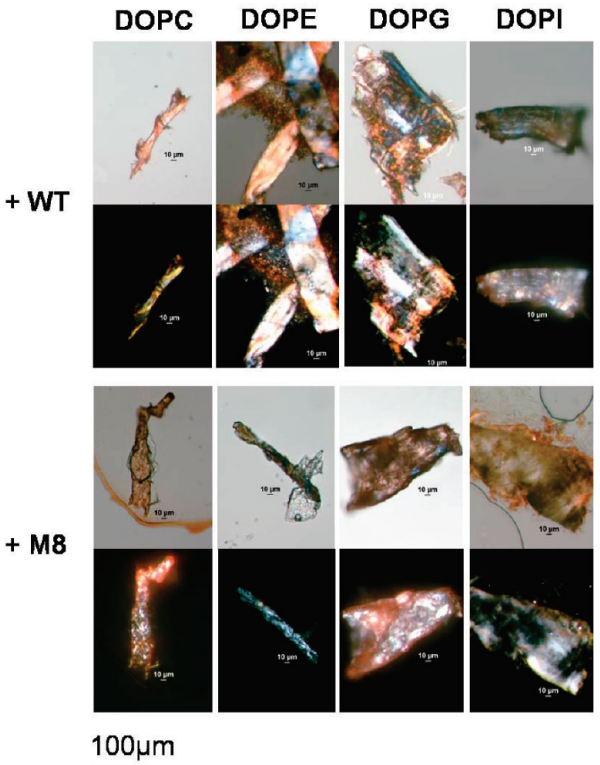


Figure 8. Congo red staining images of films formed at the air−water interface in bright field (top) and birefringence in cross-polarized light (bottom) of WT and M8 in interaction with DOPC, DOPE, DOPG, and DOPI. Films were formed at 0.75 μM in PBS, at 25 °C after 3 h. Pressures are reported in Figure 6.

indicate that the β-sheet is mainly in the plane. After adding protein, the PMIRRAS spectra displayed a large amide I band between 1600 and 1700 cm^{-1} and an amide II band at around 1535 cm^{-1} (Figure 7). For anionic phospholipids, the injection of WT or M8 in the subphase induces an increase of the surface pressure, and simultaneously the amide I and amide II bands are observed. In the case of a zwitterionic lipid (DOPC, DOPE) the detection of the amide I and II bands appears with a delay (more than 60 min) (data not shown). After 3 h, at the equilibrium, for both proteins and all phospholipids studied, the profiles of the PMIRRAS spectra are similar with a maximum of amide I at 1622 cm^{-1} and small band at 1690 cm^{-1}, characteristic of an antiparallel β-sheet structure.[45,47] The thickness that can be probed by PMIRRAS at the air−water interface is around 200 nm, which is more than the phospholipid monolayer alone. Then, the observation of PMIRRAS spectra Figure 7 reveals that WT and M8 are in the proximity of the zwitterionic phospholipid monolayer, whereas they did not induce an increase of the surface pressure. There were no observable significant differences in the secondary structure of the WT and the M8 in the interaction with phospholipid monolayers at the air−water interface.

The presence of intermolecular β-strands reveals the formation of amyloid interacting with the lipid monolayer. According to the PMIRRAS "surface selection rule" and considering the spectra features, both proteins are organized in antiparallel β-sheets in which the peptide chain was lightly tilted, i.e., the sheets were rather parallel to the interface plan.[47] Due to the higher thickness of the film with M8, we could expect an increase of the PMIRRAS spectra intensity for M8 interacting with lipid monolayers. However, we observed similar intensities for WT or M8 (see Figure 7). The slight variation observed on the amide I profiles of the various mixtures (amyloid/phospholipid monolayer) and the similar intensity observed can be explained by a variation of the angle of β-sheets with the plane of the interface that differ in the case of M8, compared to WT,[47] but also by the

dx.doi.org/10.1021/la103788r |Langmuir 2011, 27, 4797–4807

difference in the homogeneity of the films. So the PMIRRAS spectra were an average between the various domains presenting different densities of proteins interacting with lipids, at the air−water interface. The fact that the apparition of the proteins at the interface was concomitant with the decrease of both υC=O intensity and in CH_2-CH_3 band intensity of hydrocarbon chain of lipids (see Figure S3) indicates that the lipid films were disturbed either by penetrating into the buffer or by changing orientation.

To confirm that the aggregates formed at the air−water interface in interaction with lipids have amyloid-like properties, we transferred the surface layers onto coverslips by direct contact as described above. The samples were then stained with Congo red dye and then were examined under microscope for staining and birefringence (Figure 8). All samples observed were stained very similarly to the protein films alone (Figure 2A), and were quite "tissue-like" or fibrous. Like at the air−water interface, in interaction with phospholipid monolayers, both types of transferred protein aggregates were stained in red, and displayed birefringence leading to the conclusion of the formation of WT and M8 aggregates in contact with lipids with amyloid-like properties.

DISCUSSION

In a previous work, we demonstrated the capacity for a harmless amyloid to be transformed into a toxic amyloid species (reducing considerably the growth of the yeast cell) by changing a few residues of the PFD of HET-s amyloid (HET-$s_{(218-289)}$).[35] However one major question is still asked: What makes an amyloid toxic? Several hypotheses can be proposed. First, many authors suggest that the amyloid toxicity is due to the "intermediates", from oligomers to protofilaments.[3−7] These intermediates are thought to form pores, which would destabilize the membranes but also change the cellular homeostasis.[8,9] In this study, we performed in vitro experiments using various monolayers of phospholipids at the air−water interface as model membranes, and analyzed their interactions with HET-s peptides (WT and M8 toxic mutant) by PMIRRAS and ellipsometry.

At first, we examined the behavior of WT and M8 only at the air−water interface. Both proteins demonstrate a surface activity; the maximum lateral pressure obtained was around 18 mN/m. Three criteria were taken into account to evaluate amyloid properties of proteins: (1) fibrillous morphology, (2) organization in β-sheet structure, and (3) amyloid staining with Congo red dye and birefringence. At pH 7.4, at the air−water interface, we demonstrated that the film aggregation of the two proteins adopted a similar antiparallel β-sheet conformation by PMIRRAS. Both WT and M8 aggregates were stained in red by Congo red, and showed birefringence when observed by cross-polarized light. TEM images reveal the fibrillous morphology of both films formed at the air−water interface. Our results point out that the air−water interface modifies both the kinetics of fibrillation and the secondary structure of the nontoxic amyloid (WT). Surprisingly, the process of amyloidogenesis of WT differs at the air−water interface compared to that in bulk solution. First, the air−water interface promotes the formation of an "amyloid-like film" with a new organization (antiparallel β-sheets), whereas in bulk solution the WT amyloid fibers were characterized by solid-state NMR (ssNMR) as a parallel β-sheet assembling.[51] The thickness of this amyloid film formed at the air−water interface (33 Å ± 3 Å) is also different from the size obtained for an individual WT fibril formed in solution (diameter about 5 nm; length up to a few micrometers[36]). A large polymorphism must be present in the subphase; however, at the air−water interface, we formed a stable, quite homogeneous film of proteins presenting fiber morphology with antiparallel β-sheet organization and amyloid-like properties. Yamazaki et al.[52] demonstrated by molecular dynamics experiments that the hydrophobic cooperativity plays an essential role in the formation of WT amyloid fibrils. A water channel was identified along the fibril axis playing an important role in the structural stability of fibrils.[52] The hydrophobic effect is the primary thermodynamic driving force in protein folding, while electrostatics provide mostly for specificity.[53] Then, we can conclude that the presence of the hydrophobic interface modifies the organization of the WT; the hydrophobic side chains can be exposed to the hydrophobic air, leading to an antiparallel β-sheet formation, as revealed by PMIRRAS. Second, the air−water interface increases the kinetics of the self-assembly of WT. PMIRRAS spectra recorded just following the injection of proteins (0.75 μM) immediately indicated an antiparallel β-sheet organization of WT. In solution, WT undergoes a molecular transition from random coils to a mainly parallel β-sheet organization. Indeed, at a far higher concentration (50 μM), in the same buffer, this structural transition followed by ATR-FTIR happens after a lag phase of about 40 min.[44] So, this demonstrated the acceleration role of the air−water interface in β-sheet formation. The differences of conformation and kinetics at the interface and in the bulk solution are evident for WT. Indeed, various proteins forming amyloid fibers in bulk solution are surface active and form stable Langmuir films differently structured at the air−water interface. This has been observed for amyloid-β films formed of either antiparallel β-sheets[31−34] or α-helices,[30] hIAPP and α-synuclein films also in α-helices,[29,54] or the LSFD peptide assembling in an antiparallel β-sheet monolayer.[31] For the toxic M8 mutant, the behavior at the air−water interface is quite comparable to the behavior in bulk solution. As in bulk, the process of film assembling is also fast, no lag phase was observed, and the same antiparallel signature was determined by ATR-FTIR.[36]

We aimed to understand the effect of each protein toward yeast plasma membrane components, in particular glycerophospholipids. The major phospholipids found in the membrane of *S. cerevisiae*, include PC, PE, PI, PS, and PG.[38,39,55] According to this fact and to the potential different interactions between the proteins and the polar head of phospholipids, we chose to analyze the lipid−amyloid interaction by using DOPI, DOPS, DOPG, DOPC, and DOPE in the Langmuir monolayer model. We report here the first study of the HET-s peptide interacting with membrane models. Our work demonstrates clearly the strong perturbation of anionic phospholipid monolayers by aggregation of the toxic amyloid (M8), compared to a nontoxic amyloid (WT). However, this difference cannot be explained by the primary sequences, as physicochemical properties are very similar for WT and M8 (see Supporting Information Table 1S). Large aggregates are observed on ellipsometric images of M8 interacting with DOPG, DOPI, and DOPS, which indicate that M8 probably not destabilize the monolayers by pore formation but by massive insertion in specific yeast membrane components. Very recently it has been shown that α-synuclein could exert its toxicity in yeast, causing trafficking defects by specific interaction with phosphatidic acid-rich membranes.[56] The adsorption of the nontoxic WT form is also observed; however, the effect is less drastic, with no segregation. The thickness of the layer present at

dx.doi.org/10.1021/la103788r |*Langmuir* 2011, 27, 4797–4807

the air−lipid interface is 3 or 5 time bigger with M8 compared to WT. This in vitro behavior is in agreement with the in vivo experiments, which demonstrate that M8 interferes strongly with vesicular trafficking in yeast.[37] The data further illuminate that the charge of the lipid in our M8 specific interaction appears essential for initiating fibril formation. The electrostatic interaction is the driving force of protein−lipid interactions as demonstrated previously for various amyloids.[57] Such a behavior was also observed for IAPP in interaction with DOPC and DOPG layers[58] and hIAPP interacting with POPC and POPG monolayers using AFM.[29] Jha et al.[58] also demonstrated that with or without the air−water interface, anionic liposomes (DOPC/DOPG mixture) enhanced amyloid formation while DOPC did not. An antiparallel β-sheets conformation was detected for both amyloids (WT or M8) interacting with membranes, but the orientations of β-sheets under the phopholipid monolayer are different for WT and M8. In fact, the intensity ratio between amide I and amide II bands is sensitive to the orientation of β-sheet but as demonstrated by Banc et al.[47] it is rather the general shape of the amides domain (1700−1500 cm^{-1}), which is indicative of the orientation of this secondary structure. In our case, depending of the lipid used, the shapes of the domains for the WT and M8 types are systematically different. Moreover, the kinetics of film assembling of WT or M8 under phospholipid monolayers is different. Generally, the formation of amyloid-like films was observed earlier for M8 than for WT. So the effect of M8 is quite strong in comparison to the effect of Aβ(1−40) with a condensed phospholipid monolayer as demonstrated by Maltseva et al.[34] It does not only displace the lipids laterally as described for Aβ42 by Koppaka and Axelsen,[59] but a large aggregation is also observed. The layer damages are obviously evident through ellipsometric images; however, due to the limit of the instrument spatial resolution (1−2 μm), we could not deduce more clearly the molecular mechanism of membrane disruption.

In summary, we first demonstrate that the air−water interface, as model of hydrophobic−hydrophilic surface, promotes and modifies the self-assembling of HET-s$_{(218-289)}$. A different amyloid was instantaneously formed with a new secondary structure. An antiparallel β-sheet structuration was observed at the air−water interface instead of the parallel β-sheet commonly observed in solution. The toxic mutant (M8) behaves in a similar manner at the air−water interface or in bulk: fast self-assembling and antiparallel β-sheet organization. Second, we demonstrate for the first time that the main driving force for this fungus amyloid and membrane interaction is based on electrostatic interactions with negatively charged phospholipids. Interestingly, the toxic mutant (M8) clearly induces perturbations of negatively charged phospholipid monolayers, leading to a massive aggregation, whereas the nontoxic (WT) exhibits a slight effect on the membrane models. This study allows us to propose that the toxicity of the M8 mutant can be due to its high capability to interact with membranes, compared to the behavior of the WT, which is nontoxic in yeast.

■ ASSOCIATED CONTENT

Ⓢ Supporting Information. Physicochemical parameters of WT and M8 proteins, sequence of HET-s$_{(218-289)}$ (WT) and M8 toxic mutant, and ATR-FTIR spectra of WT and M8 amyloid fibers produced in bulk solution. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author
*E-mail: s.lecomte@cbmn.u-bordeaux.fr. Fax: (33) 5 40 00 22 00.

■ ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Dr. Reiko Oda for kindly allowing us access to her polarized microscope at IECB, Pessac. H.P.T. received a fellowship from the French Ministry of Research, and K.B. received a fellowship from the Conseil Régional d'Aquitaine. This work was supported by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (Interface Chimie Biologie Physique: Soutien à la prise de risque).

■ ABBREVIATIONS USED:

PFD, prion-forming domain; CR, Congo red; PMIRRAS, polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy

■ REFERENCES

(1) Chiti, F.; Dobson, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333–366.
(2) Nagai, Y.; Inui, T.; Popiel, H. A.; Fujikake, N.; Hasegawa, K.; Urade, Y.; Goto, Y.; Naiki, H.; Toda, T. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 332–340.
(3) Kayed, R.; Head, E.; Thompson, J. L.; McIntire, T. M.; Milton, S. C.; Cotman, C. W.; Glabe, C. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **2003**, *300*, 486–489.
(4) Bucciantini, M.; Giannoni, E.; Chiti, F.; Baroni, F.; Formigli, L.; Zurdo, J.; Taddei, N.; Ramponi, G.; Dobson, C. M.; Stefani, M. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* **2002**, *416*, 507–511.
(5) Xue, W. F.; Hellewell, A. L.; Gosal, W. S.; Homans, S. W.; Hewitt, E. W.; Radford, S. E. Fibril fragmentation enhances amyloid cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 34272–34282.
(6) Petkova, A. T.; Leapman, R. D.; Guo, Z.; Yau, W. M.; Mattson, M. P.; Tycko, R. Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's β-amyloid fibrils. *Science* **2005**, *307*, 262–265.
(7) Kayed, R.; Pensalfini, A.; Margol, L.; Sokolov, Y.; Sarsoza, F.; Head, E.; Hall, J.; Glabe, C. Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4230–4237.
(8) Quist, A.; Doudevski, I.; Lin, H.; Azimova, R.; Ng, D.; Frangione, B.; Kagan, B.; Ghiso, J.; Lal, R. Amyloid ion channels: A common structural link for protein-misfolding disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 10427–10432.
(9) Lashuel, H. A.; Hartley, D.; Petre, B. M.; Walz, T.; Lansbury, P. T. Neurodegenerative disease: Amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* **2002**, *418*, 291.
(10) Hebda, J.; Miranker, A. The interplay of catalysis and toxicity by amyloid intermediates on lipid bilayers: Insights from type II diabetes. *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, *38*, 125–52.
(11) Aisenbrey, C.; Borowik, T.; Byström, R.; Bokvist, M.; Lindström, F.; Misiak, H.; Sani, M.-A.; Gröbner, G. How is protein aggregation in amyloidogenic diseases modulated by biological membranes?. *Eur. Biophys. J.* **2008**, *37*, 247–255.
(12) Hertel, C.; Terzi, E.; Hauser, N.; Jakob-Rotne, R.; Seelig, J.; Kemp, J. A. Inhibition of the electrostatic interaction between beta-amyloid peptide and membranes prevents β-amyloid-induced toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 9412–9416.
(13) Engel, M. F.; Yigittop, H.; Elgersma, R. C.; Rijkers, D. T.; Liskamp, R. M.; de Kruijff, B.; Höppener, J. W.; Killian, J. A. Islet amyloid polypeptide inserts into phospholipid monolayers as monomer. *J. Mol. Biol.* **2006**, *356*, 783–789.

(14) Baron, G. S. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant requires insertion of PrP-res (PrPSc) into contiguous membranes. *EMBO J.* **2002**, *21*, 1031–1040.

(15) Mason, R. P.; Jacob, R. F.; Walter, M. F.; Mason, P. E.; Avdulov, N. A.; Chochina, S. V.; Igbavboa, U.; Wood, W. G. Distribution and fluidizing action of soluble and aggregated amyloid β-peptide in rat synaptic plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18801–18807.

(16) Engel, M. F. M.; Khemtémourian, L.; Kleijer, C. C.; Meeldijk, H. J. D.; Jacobs, J.; Verkleij, A. J.; de Kruijff, B.; Killian, J. A.; Höppener, J. W. M. Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 6033–6038.

(17) Kayed, R.; Sokolov, Y.; Edmond, B.; McIntire, M.-T.; Milton, S. C.; Hall, J. E.; Glabe, C. G. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 46363–46366.

(18) Ambroggio, E. E.; Kim, D. H.; Separovic, F.; Barrow, C. J.; Barnham, K. J.; Bagatolli, L. A.; Fidelio, G. D. Surface behavior and lipid interaction of Alzheimer β-amyloid peptide1−42: A membrane-disrupting peptide. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 2706–2713.

(19) Choo-Smith, L. P.; Garzon-Rodriguez, W.; Glabe, C. G.; Surewicz, W. K. Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of Aβ-(1−40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22987–22990.

(20) Necula, M.; Chirita, C. N.; Kuret, J. Rapid anionic micelle-mediated α-synuclein fibrillization in vitro. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46674–46680.

(21) Martins, I. C.; Kuperstein, I.; Wilkinson, H.; Maes, E.; Vanbraban, M.; Jonckheere, W.; Van Gelder, P.; Hartmann, D.; D'Hooge, R.; De Strooper, B.; Schymkowitz, J.; Rousseau, F. Lipids revert inert Aβ amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J.* **2008**, *27*, 224–233.

(22) Kakio, A.; Yano, Y.; Takai, D.; Kuroda, Y.; Matsumoto, O.; Kozutsumi, Y.; Matsuzaki, K. Interaction between amyloid Aβ-protein aggregates and membranes. *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 612–621.

(23) Jean, L.; Lee, C. F.; Lee, C.; Shaw, M.; Vaux, D. J. Competing discrete interfacial effects are critical for amyloidogenesis. *FASEB J.* **2010**, *24*, 309–317.

(24) Zhu, M.; Souillac, P. O.; Ionescu-Zanetti, C.; Carter, S. A.; Fink, A. L. Surface-catalyzed amyloid fibril formation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 50914–50922.

(25) Takur, G.; Micic, M.; Leblanc, R. M. Surface chemistry of Alzeimer's disease: A Langmuir monolayer approach. *Colloids Surf., B* **2009**, *74*, 436–456.

(26) Dorosz, J.; Volinsky, R.; Bazar, E.; Kolusheva, S.; Jelinek, R. Phospholipid-induced fibrillation of a prion amyloidogenic determinant at the air/water interface. *Langmuir* **2009**, *25*, 12501–12506.

(27) Nayak, A.; Dutta, A. K.; Belfort, G. Surface-enhanced nucleation of insulin amyloid fibrillation. *Biophys. Biochim. Res. Commun.* **2008**, *369*, 303–307.

(28) Linse, S.; Cabaleiro-Lago, C.; Xue, W.-F.; Lynch, I.; Lindman, S.; Thulin, E.; Radford, S. E.; Dawson, K. A. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 8691–8696.

(29) Lopes, D. H. J.; Meister, A.; Gohlke, A.; Hauser, A.; Blume, A.; Winter, R. Mechanism of islet amyloid polypeptide fibrillation at lipid interfaces studied by infrared reflection absorption spectroscopy. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 3132–3141.

(30) Jiang, D.; Dinh, K. L.; Ruthenburg, T. C.; Zhang, Y.; Su, L.; Land, D. P.; Zhou, F. A kinetic model for β-amyloid adsorption at the air/solution interface and its implication to the β-amyloid aggregation process. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (10), 3160–3168.

(31) Lepère, M.; Muenter, A. H.; Chevallard, C.; Gueboun, P.; Brezesinski, G. Comparative IR and X-ray studies of natural and model amyloid peptides at the air/water interface. *Colloids Surf., A* **2007**, *303*, 73–78.

(32) Maltseva, E.; Brezesinski, G. Adsorption of amyloid beta (1−40) peptide to phosphatidylethanolamine monolayers. *ChemPhysChem.* **2004**, *5*, 1185–1190.

(33) Schladitz, C.; Vieira, E. P.; Hermel, H.; Möhwald, H. Amyloid β-sheet formation at the air−water interface. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 3305–3310.

(34) Maltseva, E.; Kerth, A.; Blume, A.; Möhwald, H.; Brezesinski, G. Adsorption of amyloid beta (1−40) peptide at phospholipid monolayers. *ChemBioChem.* **2005**, *6* (10), 1817–1824.

(35) Couthouis, J.; Rébora, K.; Immel, F.; Berthelot, K.; Castroviejo, M.; Cullin, C. Screening for toxic amyloid in yeast exemplifies the role of alternative pathway responsible for cytotoxicity. *PLoS One* **2009**, *4*, e4539.

(36) Berthelot, K.; Immel, F.; Géan, J.; Lecomte, S.; Oda, R.; Kauffmann, B.; Cullin, C. Driving amyloid toxicity in a yeast model by structural changes: A molecular approach. *FASEB J.* **2009**, *23*, 2254–2263.

(37) Couthouis, J.; Marchal, C.; D'Angelo, F.; Berthelot, K.; Cullin, C. The toxicity of an "artificial" amyloid is related to how it interacts with membranes. *Prion* **2010**, *4* (4), 283–291.

(38) Van der Rest, M. E.; Kamminga, A. H.; Nakano, A.; Anraku, Y.; Poolman, B.; Konings, W. N. The plasma membrane of saccharomyces cerevisiae: Structure, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 304–322.

(39) Carman, G. C.; Henry, S. A. Phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and interrelationship with other metabolic processes. *Prog. Lipid Res.* **1999**, *38*, 361–399.

(40) Azzam, R. M. A.; Bashara, N. M. *Ellipsometry and Polarized Light*; North-Holland Physics Publishing: New York, 1977.

(41) Ducharme, D.; Max, J. J.; Salesse, C.; Leblanc, R. M. Ellipsometric study of the physical state of phosphatidylcholines at the air−water interface. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 1925–1932.

(42) Saccani, J.; Castano, S.; Beaurain, F.; Laguerre, M.; Desbat, B. Stabilization of phospholipid multilayers at the air−water interface by compression beyond the collapse: A BAM, PM-IRRAS and molecular dynamics study. *Langmuir* **2004**, *20*, 9190–9197.

(43) Blaudez, D.; Turlet, J. M.; Dufourcq, J.; Bard, D.; Buffeteau, T.; Desbat, B. Investigation at air−water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *J.Chem. Soc., Faraday Trans.* **1996**, *92*, 525–530.

(44) Berthelot, K.; Lecomte, S.; Géan, J.; Immel, F.; Cullin, C. A yeast toxic mutant of HET-s(218−289) prion displays alternative intermediates of amyloidogenesis. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 1239–1246.

(45) Goormaghtigh, E.; Cabiaux, V.; Ruysschaert, J. M. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared. In *Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes*; Hilderson, H. J., Ralson, G. B., Eds.; Plenum Press: New York, 1994; Vol. 23, pp 405−450.

(46) Ronzon, F.; Desbat, B.; Chauvet, J. P.; Roux, B. Behavior of a GPI-anchored protein in phospholipid monolayers at the air−water interface. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1560*, 1–13.

(47) Banc, A.; Desbat, B.; Renard, D.; Popineau, Y.; Mangavel, C.; Navailles, L. Structure and orientation changes of ω- and γ-gliadins at the air−water interface: A PM-IRRAS spectroscopy and Brewster angle microscopy study. *Langmuir* **2007**, *23*, 13066–13075.

(48) Stottrup, B. L.; Stevens, D. S.; Keller, S. L. Miscibility of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol in monolayers, and application to bilayer systems. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 269–276.

(49) Bertie, J. E.; Lan, Z. D. Infrared intensities of liquids 20. The intensity of the OH band of liquid water revisited, and the best current values of the optical constants of $H_2O(1)$ at 25°C between 15,000 and 1 cm^{-1}. *Appl. Spectrosc.* **1996**, *43*, 1047–1057.

(50) Cornut, I.; Desbat, B.; Turlet, J. M.; Dufourcq, J. *In situ* study by polarization modulated Fourier transform infrared spectroscopy of the structure and orientation of lipids and amphipatic peptides at air−water interface. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 305–312.

(51) Wasmer, C.; Lange, A.; Van Melckebeke, H.; Siemer, A. B.; Riek, B.; Meier, H. Amyloid fibrils of the HET-s(218−289) prion form a β soleinoid with a triangle hydrophobic core. *Science* **2008**, *319*, 523–1526.

(52) Yamazaki, T.; Blinov, N.; Wishart, D.; Kovalenko, A. Hydration effects on the HET-s prion and amyloid-β fibrillous aggregates, studied

with three-dimensional molecular theory of solvation. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 4540–4548.

(53) Hills, R. D.; Brooks, C. L., III. Hydrophobic cooperativity as a mechanism for amyloid nucleation. *J. Mol. Biol.* **2007**, *368*, 894–901.

(54) Wang, C.; Shah, N.; Thakur, G.; Zhou, F.; Leblanc, R. M. α-Synuclein in α-helical conformation at air−water interface: Implication of conformation and orientation changes during its accumulation/aggregation. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6702–6704.

(55) Zinser, E.; Sperka-Gottlieb, C. D. M.; Fasch, E.-V.; Kohlwein, S. D.; Paltauf, F.; Daum, G. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 2026–2034.

(56) Soper, J. H.; Kehm, V.; Burd, C. G.; Bankaitis, V. A.; Lee, V. M.-Y. Aggregation of α-synuclein in *S. cerevisiae* is associated with defects in endosomal trafficking and phospholipid biosynthesis. *J. Mol. Neurosci.* **2011**, *43*, 391–405.

(57) Relini, A.; Cavalleri, O.; Rolandia, R.; Gliozzi, A. The two-fold aspect of the interplay of amyloidogenic proteins with lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *158*, 1–9.

(58) Jha, S.; Sellin, D.; Seidel, R.; Winter, R. Amyloidogenic propensities and conformational properties of ProIAPP and IAPP in the presence of lipid bilayer membranes. *J. Mol. Biol.* **2009**, *389*, 907–920.

(59) Koppaka, V.; Axelsen, P. H. Accelerated accumulation of amyloid β proteins on oxidatively damaged lipid membranes. *Biochemistry* **2000**, *39*, 10011–10016.

II.3. **Effet de la concentration**

Dans la partie précédente, à pression initiale de 25 mN/m pour la monocouche de phospholipides, les protéines amyloïdes (WT et M8) s'insèrent seulement dans les monocouches phospholipidiques négativement chargées. Cela met en évidence le rôle important des interactions électrostatiques dans l'interaction des protéines WT et M8 (chargées toutes deux positivement +1) avec les monocouches phospholipidiques.

Nous avons ensuite étudié l'influence de la concentration en protéines vis-à-vis des interactions avec les phospholipides en choisissant une concentration en monomère de 0,075 µM soit dix fois moins que dans les expériences précédentes. Notons que les protéines sont injectées à l'état de monomère (pH 2). La pression initiale des monocouches est autour de 25 mN/m, les protéines WT et M8 s'insèrent très légèrement dans les monocouches négativement chargées produisant une augmentation de pression de surface de 0,5 à 2 mN/m. Cette valeur est inférieure à celle obtenue pour une concentration en protéines de 0,75 µM (de 4 à 5 mN/m). Pour les phospholipides neutres (DOPC, DOPE) il n'y a pas d'augmentation de pression de surface.

Les images ellipsométriques enregistrées lors de l'interaction de WT et M8 (à 0,075 µM) avec les monocouches DOPC, DOPE, DOPG, DOPS, DOPI (**Figure II - 1**) ont confirmé l'affinité plus importante de ces protéines avec les phospholipides négativement chargés.

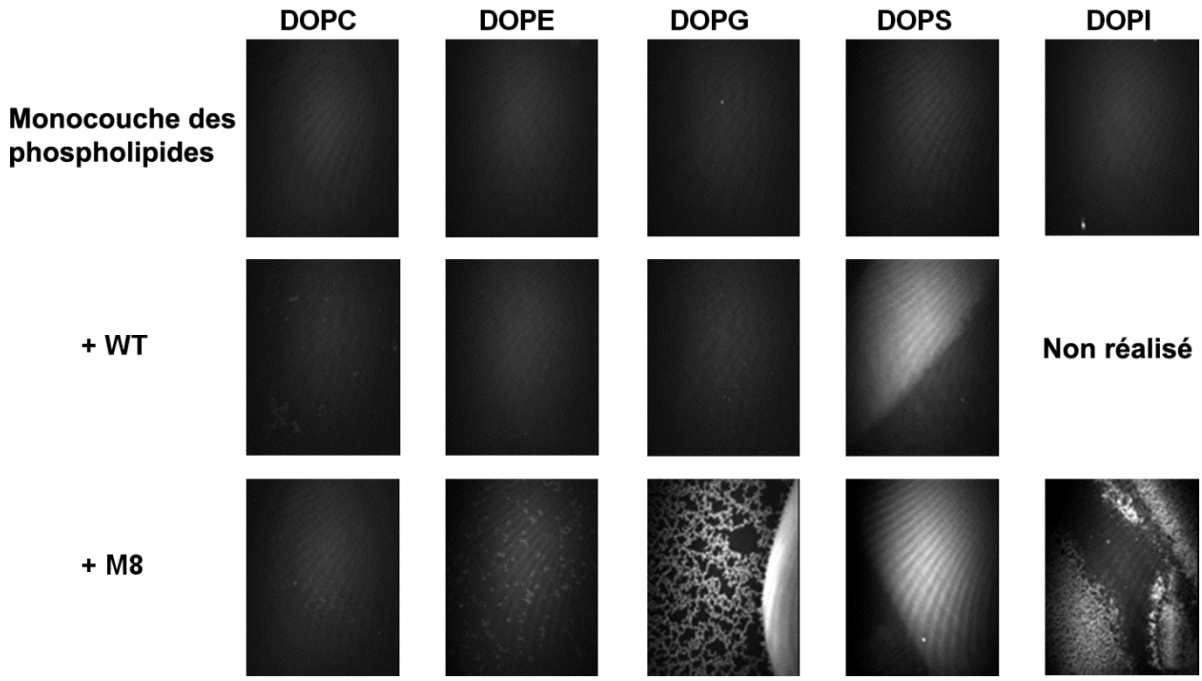


Figure II - 1: Images ellipsométriques des monocouches de DOPC, DOPE, DOPG, DOPS, DOPI avant et après injection de WT ou M8 dans la sousphase de tampon phosphate à pH 7,4. La pression initiale des monocouches est d'environ 25 mN/m. La concentration des protéines est de 0,075 µM. Les images sont enregistrées 2 ou 3 heures après injection. Les dimensions des images sont 450 x 670 µm.

Avant l'injection des protéines, les phospholipides à pression de surface de 25 mN/m forment des monocouches homogènes dont l'épaisseur est estimée à 16 - 18 Å en prenant 1,45 comme valeur de l'indice de réfraction des couches (**Tableau II - 1**). Après l'injection des protéines, quelques changements dans l'homogénéité des couches à la surface sont observés : les plus importants pour les phospholipides chargés négativement DOPI, DOPS et surtout pour DOPG. En détail pour M8, il y a toujours la formation d'agrégats comme pour la concentration de 0,75 µM mais à part pour DOPG les épaisseurs des couches formées sont plus faibles. Une nette diminution d'épaisseur d'environ 40 à 60 % (par rapport aux expériences à 0,75 µM de protéine) est observée. Cela indique une diminution de la quantité de protéines adsorbées et/ou insérées sur/dans les monocouches. Pour le WT, la diminution de concentration n'engendre pas un très grand changement de morphologie des monocouches lipidiques. Ces observations correspondent bien aux faibles changements d'épaisseurs des couches (**Tableau II - 1**) sauf dans le cas de la monocouche de DOPE où l'épaisseur de la couche formée est la moitié de celle formée pour la concentration de 0,75 µM. A concentration de 0,075 µM, lors de l'interaction de WT avec la monocouche de DOPS, les agrégats formés ont une épaisseur environ 2 fois l'épaisseur de la monocouche initiale. En interaction avec les monocouches de DOPC, DOPI ou DOPG, l'augmentation d'épaisseur est plus faible.

Tableau II - 1: Angles ellipsométriques et épaisseur maximale des couches à la surface avant et après injection des protéines dans la sousphase d'un tampon PBS à pH 7,4. La pression initiale des monocouches est d'environ 25 mN/m. La concentration des protéines est de 0,075 µM.

Angle ellipsometrique (δΔ, Ψ) et épaisseur des couches (Å) *,†						
Monocouche lipidique			**Monocouche lipidique en interaction avec**			
			WT		**M8**	
	|δΔ|= |Δ-Δ°| Ψ	**Epaisseur (Å)**	**|δΔ| Ψ**	**Epaisseur (Å)**	**|δΔ| Ψ**	**Epaisseur (Å)**
DOPC	5,3±0,8° 2,35±0,12°	17±2	6,6±0,8° 2,38±0,12°	22±2	7,8±0,8° 2,35±0,12°	26±2
DOPE	5,7±0,8° 2,38±0,12	18±2	6,7±0,8° 2,38±0,12°	22±2	5,5±0,8° 2,38±0,12°	22±2
DOPG	5,1±0,8° 2,35±0,12°	16±1	6,6±0,8° 2,35±0,12°	22±2	22,9±0,8° 2,35±0,12°	76±7
DOPI	5,5±0,8° 2,37±0,12°	18±2	-	-	13,4±0,8° 2,37±0,12°	45±4
DOPS	4,8±0,8° 2,35±0,12°	16±2	10,9±0,8° 2,35±0,12°	36±3	12,1±0,8° 2,38±0,12°	40±4

*L'épaisseur est déterminée en utilisant une valeur moyenne de 1.45 pour l'indice de réfraction.
†Les résultats sont les valeurs moyennes d'épaisseur pour différents points de l'échantillon et sont présentés comme moyen ± SD (standard deviation).

En diminuant la concentration en protéine à 0,075 µM, la protéine M8 toxique perturbe toujours fortement les monocouches chargées négativement. Nous avons décidé d'examiner l'interaction de la protéine M8 à une concentration de 0.0125 µM avec la monocouche de DOPG dans les mêmes conditions expérimentales. L'expérience n'a montré en ellipsométrie aucun effet sur la monocouche DOPG (**Figure 2**). Ce résultat indique qu'il faut une quantité de protéine M8 suffisante pour pouvoir provoquer les changements de morphologie observables par l'ellipsométrie.

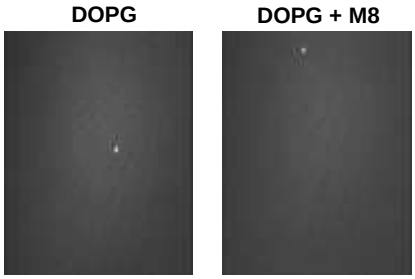


Figure II - 2: Images ellipsométriques de la monocouche de DOPG avant et après injection du M8 à 0,0125 µM. La sousphase est un tampon PBS à pH 7,4. La pression initiale de la monocouche de DOPG est de ~25 mN/m. Les expériences sont réalisées à une température de 25 ± 1 °C. Les dimensions des images sont 450 x 670 µm.

La structure secondaire des protéines WT et M8 lors d'interaction avec les monocouches phospholipidiques est déterminée par analyse des spectres PMIRRAS (**Figure II - 3**, droite), le détail de l'enregistrement des spectres est décrit dans la partie Matériels et méthodes de la publication. Les spectres PMIRRAS des phospholipides purs présentent une bande d'absorption vers 1730 cm^{-1} attribuée à la vibration d'élongation C=O de la fonction ester des phospholipides. La présence d'une large bande négative vers 1660 cm^{-1} est associée à la vibration de déformation $\delta(OH_2)$ de l'eau interfaciale (Blaudez et al. 1996; Bertie and Lan 1996).

A l'équilibre, pour les deux protéines, les spectres PMIRRAS montrent un maximum d'absorption à 1618 - 1620 cm^{-1} avec une bande faible plus ou moins observable vers 1690 cm^{-1} (**Figure II - 3**) Ce profil est caractéristique d'une structure secondaire de feuillets β antiparallèle (Banc et al. 2007). La structure secondaire des deux protéines en interaction avec les monocouches phospholipidiques à l'interface air-eau est similaire quelque soit la concentration en monomère injectée (0,75 µM ou 0,075 µM). D'après les règles de sélection de la spectroscopie PMIRRAS (Banc et al. 2007) et en considérant le profil des spectres, les deux protéines s'organisent principalement en feuillets β antiparallèles et ces feuillets s'orientent plutôt parallèlement à la surface.

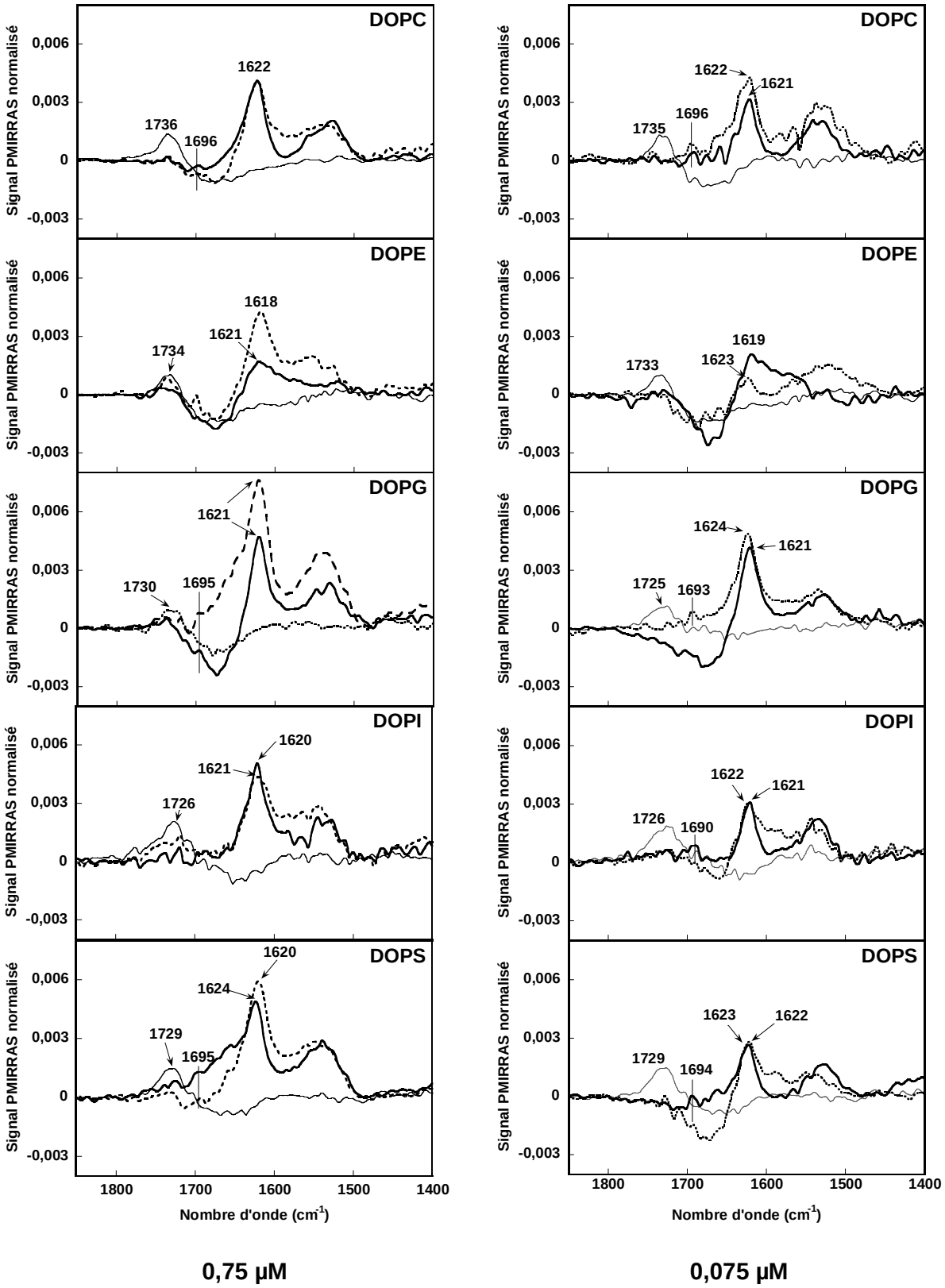


Figure II - 3: Spectres PMIRRAS de couches à l'interface air-eau lors d'interaction des monocouches de phospholipides (—) avec la protéine WT (▬) ou la protéine M8 (….). La sousphase est un tampon PBS à pH 7,4, la concentration en protéine est de 0,75 µM (gauche) et 0,075 µM (droite). La pression initiale des monocouches phospholipidiques est de ~25 mN/m. Les expériences sont réalisées à la température de 25 ± 1 °C.

La diminution de concentration de protéines induit seulement une diminution d'intensité des bandes amides I et amide II observées (**Figure II - 3**) ce qui est cohérent avec la diminution d'épaisseur des couches à l'interface air-eau observée en ellipsométrie dans le cas du M8 (courbe pointillée, **Figure II - 3**). Pour le WT, cette diminution n'est pas corrélée avec une diminution d'épaisseur. La concentration de protéines injectées dans la sousphase est 10 fois plus faible, alors que l'intensité des spectres PMIRRAS ne diminue que légèrement, il existe probablement une quantité maximum de protéines qui peut interagir avec les monocouches au-delà de laquelle la quantité de protéine adsorbée et/ou insérée ne varie pas de façon suffisante pour être détectée avec nos techniques d'analyse. Autre raison envisageable : il y a une différence d'indice de réfraction de couches formées dans les deux cas de 0,75 µM et 0,075 µM.

Pour des monocouches de phospholipides à l'interface air-eau, quand les chaînes lipidiques sont perpendiculaires à la surface, les moments de transition des vibrations des carbonyles (~1730 cm^{-1}) sont plutôt parallèles à la surface, et des bandes positives sont observées sur les spectres des monocouches seules (**Figure II - 3**, 0,75 µM et 0,075 µM, ligne fine, grise) (Banc et al. 2007). Sur les spectres d'interaction des deux protéines avec les monocouches de phospholipides, une annulation et dans quelques cas une diminution de l'intensité de cette bande peut être attribuée à un changement d'orientation moyennée des moments de transitions des C=O esters. Cela signifie une perturbation au niveau des têtes polaires des monocouches de phospholipides par l'interaction avec des protéines WT et M8.

Afin de déterminer la perturbation des protéines sur les chaînes hydrocarbonées des molécules lipidiques, nous avons examiné la zone spectrale de 2800 à 3000 cm^{-1} (**Figure II - 4**).

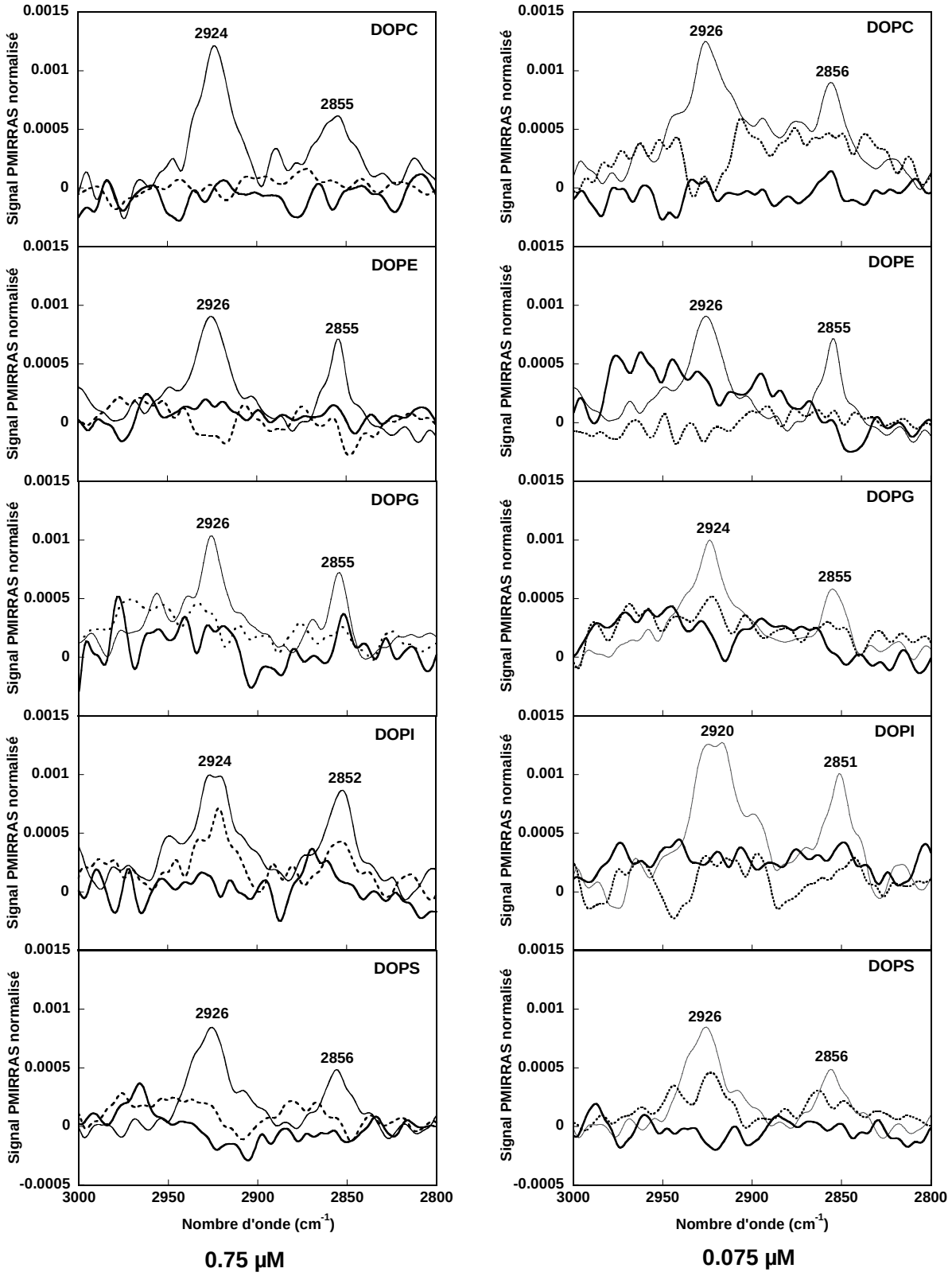


Figure II - 4 : Spectres PMIRRAS de couches à l'interface air-eau lors d'interaction des monocouches de phospholipides (—) avec la protéine WT (—) ou la protéine M8 (….). La sousphase est un tampon PBS à pH 7,4, la concentration en protéine est de 0,75 µM et de 0,075 µM. La pression initiale des monocouches phospholipidiques est de ~25 mN/m. Les expériences sont réalisées à une température de 25 ± 1 °C.

Avant les injections de protéines, les spectres PMIRRAS des monocouches lipidiques à l'interface air-eau présentent les bandes d'absorption vers 2924 cm^{-1} et 2855 cm^{-1} attribuées aux vibrations antisymétriques (2924 cm^{-1}) et symétriques (2855 cm^{-1}) des groupes CH_2 des chaînes lipidiques. Les fréquences élevées de ces absorptions signifient que les chaînes hydrocarbonées des phospholipides sont très fluides avec beaucoup de formes gauches en accord avec la nature des chaînes oléoyl-. Quelque soit le phospholipide, les deux protéines à forte ou faible concentration induisent une diminution importante d'intensité des vibrations CH_2 (**Figure II - 4**, DOPI-M8, 0,75 µM) voire une annulation des signaux PMIRRAS (**Figure II - 4**, 0,75 µM – gauche, 0,075 µM – droite). Ces résultats démontrent que les chaînes hydrocarbonées des monocouches de phospholipides sont très fortement perturbées par l'interaction avec les protéines WT et M8.

L'effet similaire de concentration des protéines sur l'interaction protéine-membrane a aussi été reporté par Haque et al. pour le peptide α-synucléine en interactions de α-synucléine avec une bicouche supportée de DOPA/DOPC/NBD-PC (1-palmitoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino] hexanoyl] -sn-glycero-3-phosphocholine) (rapport molaire 30/69/1) (Haque et al. 2010).

Nos résultats confirment la dépendance de l'interaction des protéines amyloïdes avec les membranes en rapport protéine/lipide.

Conclusion

- Les études de l'interaction protéine-phospholipide à la concentration de 0,075 µM en protéines confirment l'organisation principalement en feuillets β des deux protéines amyloïdes (WT et M8) lors d'interaction avec des monocouches lipidiques à l'interface air-eau comme dans le cas de concentration en protéines de 0,75 µM.
- Les résultats obtenus en ellipsométrie en diminuant la concentration de protéine confirment l'importance des interactions électrostatiques (sauf dans le cas de WT-DOPG).
- Nos travaux confirment ainsi la spécificité de l'interaction du mutant toxique M8 pour les lipides chargés négativement.

II.4. Influence du pH sur l'agrégation des protéines WT et M8 et leur interaction avec les monocouches de phospholipides

En sortie de la colonne de purification (dans une solution de HCl à pH2), les protéines (WT et M8) sont à l'état monomère et avec une structure secondaire principalement

désordonnée (Berthelot et al. 2010). L'auto-assemblage de WT (HET-s (218-289)) à ce pH est très lent (plusieurs jours) et conduit à la formation de fibres beaucoup moins infectieuses de morphologie différente de celles formées à pH 7 (Sabate et al. 2007). C'est l'augmentation du pH au pH physiologique (7,4) qui induit et accélère fortement le processus d'auto-assemblage des deux protéines WT et M8. Dans les études à l'interface air-eau sur un tampon pH à 7,4, nous avons observé la formation presque instantanée des feuillets β de WT et M8 à l'interface juste après leur injection dans la sousphase. Afin de diminuer les processus d'auto-assemblage des protéines, nous avons choisi de nous placer à pH 2 et de réaliser les mêmes expériences qu'à pH 7,4.

II.4.1. **Comportement de WT et M8 à l'interface d'une solution HCl à pH 2**

La pression de surface n'augmente que légèrement quand les protéines (WT et M8) sont injectées dans une sousphase acide (HCl 10 mM, pH 2) (voir Figure 3A de l'article (Ta et al. 2011), page 74). Les images ellipsométriques des couches de protéines formées à l'interface (injection à 0,75 µM) sont toujours homogènes (**Figure II - 5**) comme celles obtenues avec la sousphase du tampon phosphate (PBS) pH 7,4.

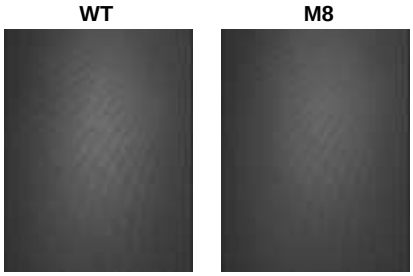


Figure II - 5: Images ellipsométriques des protéines WT et M8 à l'interface air-eau avec la sousphase HCl à pH 2. La concentration en protéines est de 0,75 µM. Les expériences sont réalisées à 25 ± 1°C. Les dimensions des images sont 450 x 670 µm.

Les épaisseurs des couches formées par le WT et M8 sont de l'ordre de 21 ± 2 Å (pour un indice de réfraction moyen de 1,45) ($\delta\Delta$ = 6,4 ± 0,8, $\delta\Psi$ = 2,46 ± 0,12). Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues dans le cas où la sousphase est du PBS à pH 7,4 (de 33 ± 3 Å). Cette différence est probablement due à une différence de quantité de protéines adsorbées et agrégées à l'interface.

Les spectres PMIRRAS des deux protéines à l'interface air-sousphase acide montrent une intense et fine bande principale à 1621 - 1625 cm^{-1} et une bande moins intense vers 1690 cm^{-1} (**Figure II - 6**, courbes noires). La forme spectrale de la bande amide I est caractéristique des feuillets β antiparallèles bien structurés. De plus d'après les règles de sélection de la spectroscopie PMIRRAS, leurs profils spectraux correspondent à des feuillets dont le plan s'oriente plutôt parallèlement à l'interface (Banc et al. 2007).

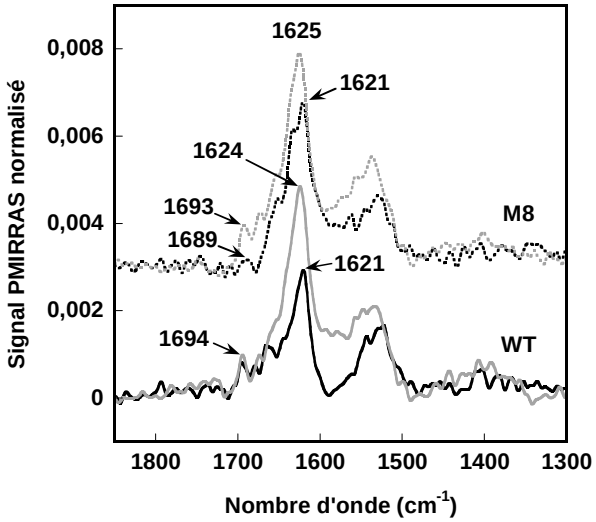


Figure II - 6: Spectres PMIRRAS des films protéiques formés par le WT (ligne gras) ou le M8 (ligne pointillée) à la surface d'un tampon PBS à pH 7,4 (gris) ou d'une solution HCl 10 mM (noir). La concentration des protéines injectées est de 0,75 µM. Les expériences sont réalisées à 25 ± 1°C. Les spectres PMIRRAS de M8 sont décalés 0,003 suivant l'axe d'absorbance pour une meilleur visibilité.

L'intensité des spectres PMIRRAS des films formés par les protéines WT et M8 à l'interface HCl-air est inférieure à celle des spectres PMIRRAS avec la sousphase en PBS. Ces résultats sont cohérents avec les valeurs plus faibles d'épaisseur des films déterminées par ellipsométrie.

II.4.2. **Interactions de WT et M8 avec la monocouche de DOPG ou DOPI à l'interface d'une solution HCl à pH2**

Selon Sabaté et al., des agrégats de la protéine HET-s (WT) formés dans HCl à pH 2 sont différents de ceux formés dans le tampon à pH 7,4 (Sabate et al. 2007). Nos résultats sur les protéines WT et M8 à l'interface air-eau montrent qu'elles ne se comportent pas de la même façon quand la sousphase est à pH 7,4 ou à pH 2. Notre étude précédente, à pH 7,4, indique que les deux protéines WT mais surtout M8 présentent une forte affinité pour les monocouches de phospholipides négativement chargés (DOPS, DOPG, DOPI). Nous avons donc étudié l'effet de ces protéines sur des monocouches de phospholipides chargés négativement, déposées à une pression initiale de 25 mN/m à la surface d'une solution HCl à pH 2.

Insertion des protéines WT et M8 dans la monocouche de DOPG ou DOPI à l'interface d'une solution HCl à pH 2

L'augmentation de pression de surface observée indique la forte insertion de WT et de M8 dans les monocouches de DOPG et DOPI à pH 2, l'insertion étant plus importante dans le cas de DOPI (**Tableau II - 2**).

Tableau II - 2: Augmentation de pression de surface des couches DOPG et DOPI déposées à l'interface air-eau après injection de WT ou M8 (soit dans la sousphase HCl 10 mM à pH 2 soit dans la sousphase PBS à pH 7,4). La pression initiale des monocouches lipidiques est de ~25 mN/m. La concentration des protéines est de 0,75 µM. Les expériences sont réalisées à 25 ± 1°C.

	Augmentation de la pression de surface Δπ (mN/m)			
	pH 2		**pH 7,4**	
	WT	M8	WT	M8
DOPG	5,2±0,5	3,8±0,5	5,5±0,5	4,2±0,5
DOPI	11,4±0,6	9,6±0,5	4,8±0,5	4,1±0,5

Lors de l'interaction de WT et M8 avec la monocouche de DOPI à l'interface air-sousphase aqueuse acide (pH2) la pression de surface a fortement augmenté (~10 mN/m) par rapport à une sous phase à pH 7,4 (~4 mN/m). Cela peut signifier que les **monomères** (ceux qui sont supposés être à l'état des protéines amyloïdes WT et M8 dans HCl à pH 2) ou néanmoins des **intermédiaires/agrégats** formés dans le milieu acide à pH 2 en présence de la monocouche de DOPI s'insèrent plus fortement que des intermédiaires/agrégats formés à pH 7,4 dans la monocouche de DOPI à 25 mN/m. Il est à noter que ces expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois et que leurs répétitions s'avèrent nécessaires au regard de la grande différence observée. Dans le cas de la monocouche de DOPG, l'augmentation de la pression de surface est similaire dans les deux conditions de pH (~4 à 5 mN/m).

Interaction des protéines WT et M8 avec la monocouche de DOPG ou DOPI à l'interface d'une solution HCl à pH 2 – étudiée par l'ellipsométrie

Les expériences en ellipsométrie révèlent que les interactions entre les protéines WT et M8 avec les monocouches de DOPG et DOPI à l'interface air-eau sont différentes en fonction du pH. A concentration équivalente en monomère de protéines, à l'interface de la solution HCl à pH 2, il n'y a pas de variation observable de la morphologie des monocouches de phospholipides, ni pour DOPG ni pour DOPI (**Figure II - 7**).

La plus forte insertion de WT et M8 dans les monocouches de DOPI et DOPG à l'interface air-eau à pH 2 qu'à pH 7,4 n'est pas reliée à des changements en morphologie des couches formées. Cela montre que les effets des protéines amyloïdes sur les modèles membranaires ne dépendent pas directement de la capacité de ces protéines à s'insérer dans ces membranes.

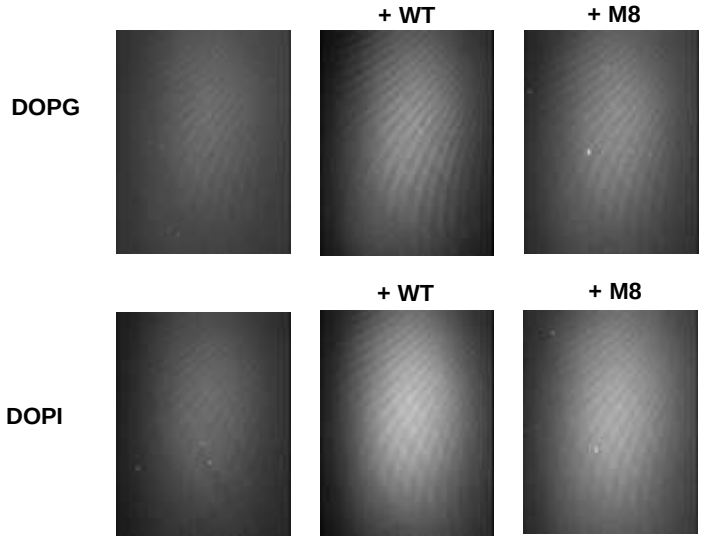


Figure II - 7: Images ellipsométriques des monocouches de DOPG et DOPI à l'interface air-eau avant et après l'injection de WT et M8 dans la sousphase de HCl 10 mM. La pression initiale des monocouches est ~ de 25 mN/m. Concentration des protéines est de 0,75 µM. Les expériences sont réalisées à 25 ± 1 °C. Les dimensions des images sont 450 x 670 µm.

Les épaisseurs calculées des couches formées à l'interface air-milieu acide lors de l'interaction entre le WT et M8 avec les monocouches de DOPG et DOPI sont reportées dans le **Tableau II - 3**. L'augmentation des valeurs d'épaisseur dans ces interactions en combinaison avec l'homogénéité des images ellipsométriques obtenues montrent que les protéines WT et M8 s'adsorbent et/ou s'insèrent sur/dans les monocouches de DOPG et DOPI. Les variations d'épaisseurs observées sont très faibles en comparaison des résultats obtenus à pH 7,4.

Tableau II - 3: Angles ellipsométriques et épaisseur des couches à la surface avant et après injection des protéines. La sousphase est une solution de HCl à pH 2. La pression initiale des monocouches lipidiques est de 25 mN/m. Les expériences sont réalisées à 25 ± 1 °C.

Angle ellipsométrique (δΔ, Ψ) et épaisseur des couches (Å) *						
Monocouche lipidique			**Monocouche lipidique en interaction avec**			
			WT		**M8**	
	|δΔ|= |Δ-Δ°| Ψ	**Epaisseur (Å)**	**|δΔ| Ψ**	**Epaisseur (Å)**	**|δΔ| Ψ**	**Epaisseur (Å)**
DOPG	5,0±0,8° 2,44±0,12°	17±2	7,8±0,8° 2,46±0,12°	26±2	9,6±0,8° 2,41±0,12°	32±3
DOPI	6,2±0,8° 2,45±0,12°	21±2	9,3±0,8° 2,45±0,12°	31±3	9,9±0,8° 2,45±0,12°	32±3

*L'épaisseur est déterminée en utilisant une valeur de 1,45 pour l'indice de réfraction. Les résultats sont les valeurs moyennes d'épaisseur pour différents points de l'échantillon et sont présentés comme moyen ± SD (standard deviation).

Dans ces interactions, les protéines WT et M8 sous forme monomères ou intermédiaires/agrégats (formées dans le milieu acide à pH 2) s'insèrent et/ou s'adsorbent dans les monocouches de DOPI ou de DOPG à pression initiale de 25 mN/m et provoquent

une augmentation de l'épaisseur de couches à l'interface. Cependant, aucun changement significatif de l'homogénéité des monocouches de phospholipides n'est observé alors qu'à pH 7,4, à même concentration en protéine de M8, les monocouches sont fortement perturbées. Ce phénomène peut être expliqué ainsi : les monomères ou agrégats formés à pH 2 sont capables de s'insérer et/ou s'adsorber sur/dans les monocouches de phospholipides mais sans interagir et/ou sans modifier fortement l'intégrité des monocouches.

Structure secondaire des protéines WT et M8 en interaction avec des monocouches de DOPI ou DOPG à la surface d'une solution de HCl à pH 2 - étudiée par spectroscopie PM-IRRAS

Lors d'interaction avec des monocouches de DOPG ou de DOPI à la surface d'une solution pH 2, les deux protéines WT et M8 montrent une bande d'absorption principale vers 1618-1622 cm^{-1} dans la zone de l'amide I de 1600 à 1700 cm^{-1} (**Figure II - 8 A, B**). Cette fréquence d'absorption correspond à une organisation essentiellement en feuillets β antiparallèles.

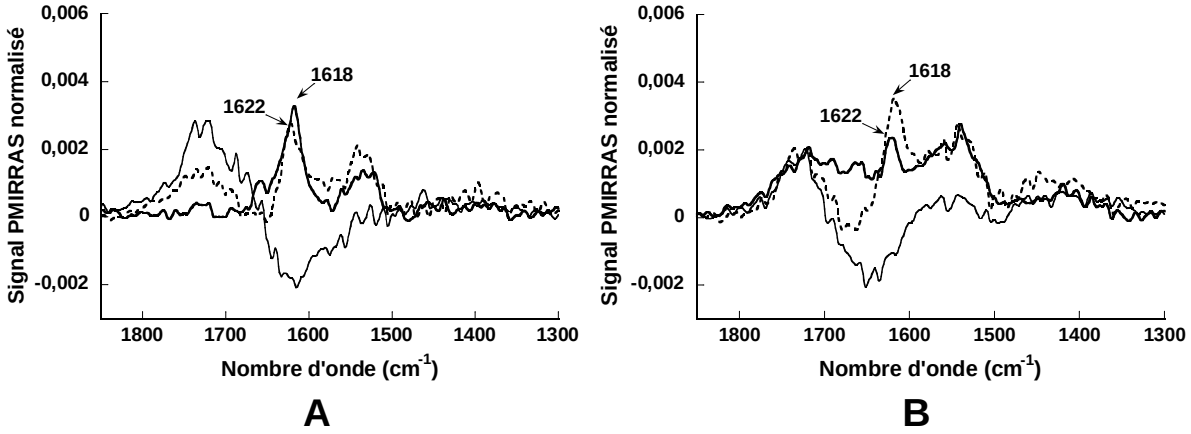


Figure II - 8: Spectres PMIRRAS (de 1300 à 1850 cm^{-1}) des couches formées à l'interface air-eau lors d'interaction des protéines WT (ligne en gras, continue) et M8 (ligne pointillée) avec des monocouches de DOPG (A) et de DOPI (B). La pression initiale des monocouches lipidiques est de 25 mN/m. La sousphase est une solution de HCl à pH 2. Les expériences sont réalisées à 25 ± 1 °C.

A pH 2, en interaction avec la monocouche de DOPG, les profils spectraux de WT et M8 indiquent une orientation des feuillets β plutôt parallèles à la surface (Banc et al. 2007). Un profil similaire est observé pour la protéine M8 en interaction avec une monocouche de DOPI. En interaction avec une monocouche de DOPI, le profil spectral du WT peut être attribué à des feuillets antiparallèles avec les chaînes peptidiques parallèles à la surface mais les liaisons hydrogènes forment un angle d'environ 30° à la surface (Banc et al. 2007).

La bande d'absorption vers 1730 cm^{-1} sur les spectres de DOPG (**Figure II - 8 A,** ligne fine) et de DOPI (**Figure II - 8 B,** ligne fine) est attribuée à la vibration des C=O esters des phospholipides DOPG et DOPI. Pour des monocouches de phospholipides à l'interface

air-eau, quand les chaînes lipidiques sont perpendiculaires à la surface, les moments de transition des vibrations carbonyles sont plutôt parallèles à la surface. Par conséquence, des bandes positives sont observées sur les spectres des monocouches de DOPI et DOPG seules (**Figure II - 8, A et B**, ligne fine) (Banc et al. 2007). Sur les spectres d'interaction de deux protéines avec des monocouches de DOPG, une diminution de l'intensité de cette bande est observée ce qui peut être attribuée à un changement d'orientation moyenne des moments de transitions des C=O esters. Cela signifie une perturbation des monocouches de DOPG due à l'adsorption et l'insertion des protéines WT et M8. Cette perturbation est également observée sur les vibrations antisymétriques (2923 cm^{-1}) et symétriques de CH_2 (2853 cm^{-1}) des chaînes hydrocarbonées des molécules de DOPG (**Figure II - 9 A**). Avant l'injection des protéines WT ou M8, les deux bandes de vibrations sont bien observées. Après l'interaction avec WT ou M8, on observe une annulation de l'intensité de ces bandes indiquant une forte perturbation des chaînes lipidiques. Ce phénomène peut être attribué à des moments de transition moyennés des CH_2 perpendiculaires à la surface.

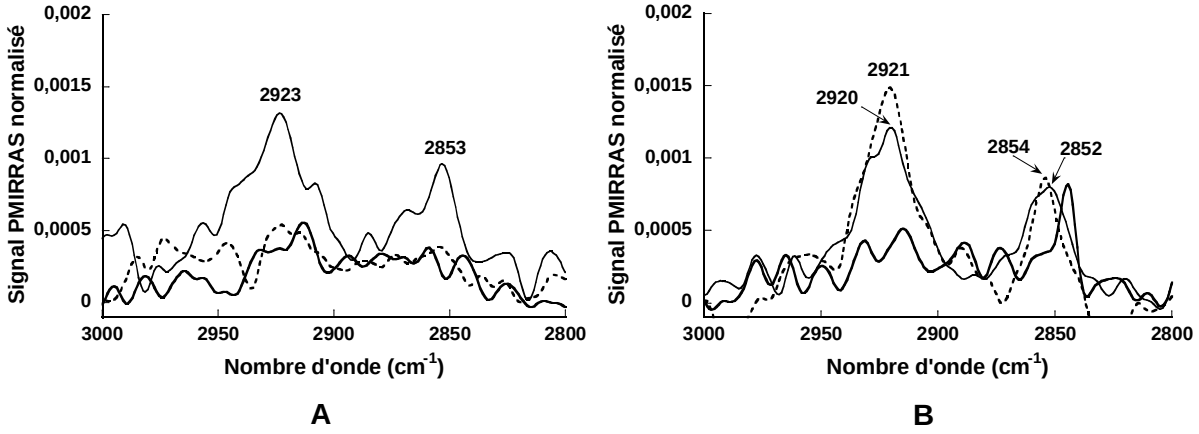


Figure II - 9: Spectres PMIRRAS (de 2800 à 3000 cm^{-1}) des couches formées à l'interface air-eau lors d'interaction des protéines WT (ligne en gras, continue) ou M8 (ligne pointillée) avec des monocouches de DOPG (A) et de DOPI (B). La pression initiale des monocouches lipidiques est de ~25 mN/m. La sousphase est une solution de HCl à pH 2. Les expériences sont réalisées à 25 ± 1 °C.

Lors de l'interaction des monocouches de DOPI avec WT ou M8, il n'y a pas de changements observables au niveau des vibrations des C=O esters des lipides (**Figure II - 9 B**). Par contre, dans la zone spectrale des vibrations antisymétriques (2920 cm^{-1}) et symétriques des CH_2 (2852 cm^{-1}) des chaînes hydrocarbonées des molécules de DOPI, des changements spectraux sont observés après l'injection des protéines WT ou M8. Dans le cas de DOPI – WT, une annulation d'intensité des spectres est observée (**Figure II - 9 B**). Dans le cas de DOPI – M8, le profil spectral ne permet pas de déterminer s'il y a une perturbation au niveau des chaînes hydrocarbonées des monocouches de phospholipides.

Conclusion :

Les protéines amyloïdes WT et M8 s'auto-assemblent à pH 7,4. Notre objectif en réalisant les expériences à pH 2 était d'essayer de discriminer l'auto-assemblage des protéines et l'interaction avec les membranes monocouches car le pH 2 ralentit le processus d'auto-assemblage des protéines WT et M8. Dans ces conditions, à l'aide de l'ellipsométrie, nous avons démontré que les effets des protéines surtout le M8 toxique sont fortement diminués. Nous pouvons envisager qu'à pH 2, les groupes phosphates des phospholipides (DOPG, DOPI) sont partiellement protonés conduisant à une diminution de force de répulsion entre les têtes polaires ce qui augmente compacité de ces monocouches à l'interface air-eau (Garidel and Blume 2005). Pourtant l'insertion des protéines dans ces monocouches ne diminuent pas par rapport à pH 7,4. Ces résultats semblent favoriser l'hypothèse qu'à l'interface air-eau les monomères ou les intermédiaires/agrégats formés à pH 2 interagissent faiblement avec les monocouches de DOPG et DOPI.

La spectroscopie PM-IRRAS démontre qu'à pH 2 ou à pH 7,4, à l'interface air-eau, les deux protéines WT et M8 s'organisent similairement dans des structures riches en feuillets β antiparallèles et perturbent les monocouches phospholipidiques au niveau des chaînes CH_2. Il faut cependant noter que l'interface air-eau peut modifier la structure secondaire des protéines.

A retenir :

- Les effets des protéines WT et M8 sur les monocouches lipidiques observés à pH 7,4 à l'interface air-eau sont liés vraisemblablement à la formation des intermédiaires spécifiques.

III. Interactions des protéines de toxicité différente avec les monocouches de DOPG et d'asolectine

La question sur le mécanisme de toxicité des protéines amyloïdes reste toujours à élucider. Cette toxicité peut-être liée à l'interaction avec les membranes plasmiques ou avec les autres composants cellulaires.

Des études précédentes sur la toxicité des protéines WT et M8 ont montré qu'en solution le M8 toxique forme des fibres principalement en feuillets β antiparallèles alors que le WT non-toxique s'auto-organise en fibres essentiellement de structure β parallèle comme

observée par spectrométrie ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection – Fourier Transform Infrared spectroscopy) (Berthelot et al. 2010).

La structure secondaire des oligomères de Aβ (1-42) a été reportée riche en feuillets β antiparallèles et différente de la structure riche en feuillets β parallèles des fibres matures de cette protéine (Cerf et al. 2009). Ce phénomène peut être lié à la forte toxicité des oligomères de Aβ (1-42) (Cerf et al. 2009). Ces observations suggèrent que les effets des protéines amyloïdes peuvent être dépendants de la capacité des protéines à former des structures en feuillets β parallèles ou antiparallèles.

Une étude plus large sur la relation entre la structure et la toxicité des mutants de la protéine WT a été réalisée. 38 mutations directes ont été obtenues en gardant la séquence principale de WT et en changent un ou plusieurs résidus mutés dans la séquence de M8 par Dr. Berthelot (Berthelot et al. 2011). La toxicité de ces mutants est testée in vivo et leur structure secondaire est déterminée par spectroscopie ATR-FTIR. Se basant sur la décomposition de la bande amide I observée en ATR-FTIR, les mutants sont ensuite classés dans trois classes de structures secondaires de fibres formées: feuillets β parallèles/randoms coils, feuillets β antiparallèles/randoms coils, randoms coils/β turns. Une relation claire entre la toxicité in vivo et la structure secondaire des protéines a pu être établie (voir Table 5 dans (Berthelot et al. 2011).

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons démontré que l'effet perturbant du M8 toxique est plus fort que le WT non-toxique sur les monocouches de phospholipidiques, surtout celles chargées négativement. Nous avons donc choisi d'étudier les effets de deux protéines de chaque classe sur les modèles membranaires : les monocouches de DOPG et d'asolectine. Nous avons choisi l'asolectine afin de s'approcher de la composition des membranes naturelles. C'est un extrait naturel de lipides du soja, il est constitué approximativement de 29% de phosphatidyl choline (PC), 30% de phosphatidyl ethanolamine (PE), 26% de phosphatidyl inositol (PI), 14% d'acide phosphatidic (PA), et de 1% de phosphatidylserine (PS) (Steunou et al. 2010). L'asolectine possède ainsi environ 41% de phospholipides chargés négativement.

Les protéines étudiées sont les suivantes : WT et WT.Y1, M8 et WT.Y1Y2V2, WT et WT.MQDR (**Figure II - 10**).

```
WT :        KIDAIVGRNSAKDIRTEERARVQLGNVVTAAALHGGIRISDQTTNSVETVVGKGESRVLIGNEYGGKGFWDN
M8 :        M-------Y----------------T------Q-----------Y------LV-D-------K--------R--
WT.Y1:      --------Y------------- ----------------------------------------------------
WT.Y1Y2V2 : --------Y------------- ---------------------Y------V---------------------
WT.K2 :     ------------------------------------------------------------ K----------
WT.MQDR :   M-------------------------------Q--------------------D---------------R--
```

Figure II - 10: Séquences peptidiques des protéines étudiées (extrait de (Berthelot et al. 2011)).

Un résumé de leurs structures secondaires et leur toxicité sont présentés dans le **Tableau II - 4**.

Tableau II - 4: Toxicité et groupement de la structure secondaire des protéines étudiées (extrait de (Berthelot et al. 2011).

Protéine	Charge* à pH 7,4	Toxicité in vivo	Groupe de structure secondaire
WT	~1	-	Feuillets β parallèles/randoms coils
WT.Y1	~1	-	
M8	~1	+++	Feuillets β antiparallèles/randoms coils
WT.Y1Y2V2	~1	++	
WT.K2	~2	-	Randoms coils/β turns
WT.MQDR	~2	-	

*Charge calculée d'après http://vitalonic.narod.ru/biochem/index_en.html

Leurs adsorptions et/ou insertions sur/dans les membranes modèles sont étudiées par l'ellipsométrie couplée à la mesure de pression de surface. La structure secondaire des protéines impliquées dans ces interactions est identifiée par la spectroscopie PMIRRAS. Dans un premier temps, nous avons étudié le comportement des six protéines à l'interface air-eau.

III.1. **Auto-assemblage des protéines à l'interface air-eau**

III.1.1. **Affinité des protéines pour l'interface**

L'affinité pour l'interface des protéines est déterminée en mesurant leur adsorption à l'interface air-eau en absence de monocouches lipidiques. Les expériences sont faites dans les mêmes conditions utilisées pour déterminer l'affinité de surface de deux protéines WT et M8 (Ta et al. 2011). Les protéines sont injectées dans la sousphase (tampon PBS, pH 7,4) à une concentration de 0,75 µM. La pression de surface est mesurée par le tensiomètre et tracée en fonction de temps d'adsorption (**Figure II - 11**).

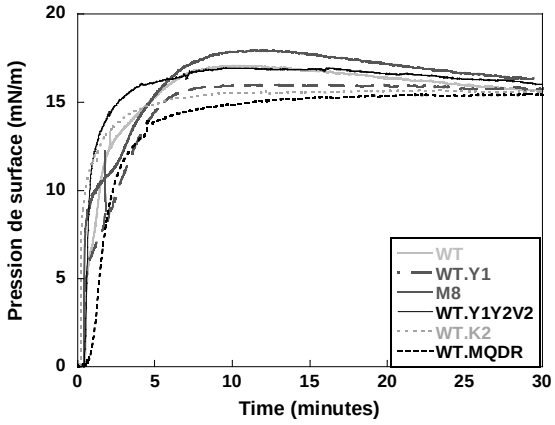


Figure II - 11: Cinétique de pression de surface des processus d'auto-assemblage des protéines à l'interface air-eau. La sousphase est un tampon PBS à pH 7,4. La concentration en monomère des protéines est de 0,75 µM. Toutes les expériences ont été réalisées à 25 ± 1 °C.

Les courbes obtenues ne présentent pas de phase de latence. En moins de 10 minutes, toutes les protéines atteintent leur pression maximale. Les valeurs élevées de pression de surface obtenues à l'équilibre montrent que toutes les protéines ont une grande affinité pour l'interface air-eau. (Notons que la pression de surface mesurées pour Aβ 1-40 est de 13,7 mN/m (Ji et al. 2002).

Nous avons également suivie par ellipsométrie l'adsorption de ces protéines à l'interface air-eau. Instantanément après l'injection, les protéines s'auto-assemblent dans des couches homogènes à la surface du tampon. L'évolution de l'épaisseur des couches est suivie par la variation des angles ellipsométriques. A l'équilibre, toutes les protéines forment une couche homogène à l'interface (**Figure II - 12**).

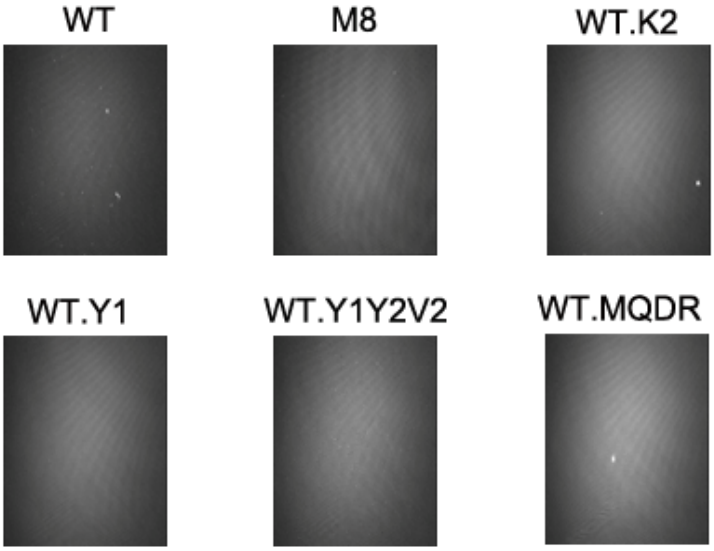


Figure II - 12: Images ellipsométriques des protéines s'auto-assemblent à l'interface air-eau à l'équilibre. Les dimensions des images sont 450 x 670 µm. La sousphase est un tampon PBS à pH 7,4. La concentration en monomère des protéines est de 0,75 µM. Tous les expériences ont été réalisées à 25 ± 1 °C.

L'épaisseur estimée des films présents à l'interface (calculé pour un indice de réfraction de 1,45) est reportée dans le **Tableau II - 5**. A l'équilibre, les protéines forment de façon similaire des couches d'épaisseur d'environ 33 - 40 Å.

Tableau II - 5: Epaisseur des couches formées à l'interface air-eau par l'auto-assemblage des protéines étudiées. La sousphase est un tampon PBS à pH 7,4. La concentration en monomère des protéines est de 0,75 µM. Tous les expériences ont été réalisées à 25 ± 1 °C.

	|δΔ|= |Δ-Δ°| ; Ψ	**Epaisseur (Å)**	**Pression maximale (mN/m)**
WT	9,4±0,8 ; 2,37±0,12	33±3	17,1±0,4
WT.Y1	11,51±0,8° ; 2,251±0,12°	39±4	16,2±0,4
M8	9,5±0,8 ; 2,37±0,12	33±3	18,0±0,4
WT.Y1Y2V2	10,62±0,8° ; 2,251±0,12°	36±4	16,5±0,4
WT.K2	11,4±0,8° ; 2,251±0,12°	39±4	15,3±0,4
WT.MQDR	11,45±0,8° ; 2,251±0,12°	38±4	14,8±0,4

*L'épaisseur est déterminée en utilisant une valeur de 1,45 pour l'indice de réfraction. Les résultats sont présentés comme moyen ± SD.

III.1.2. **Structure secondaire des protéines à l'interface air-eau**

Parallèlement, des expériences similaires ont été réalisées pour déterminer la structure secondaire des auto-assemblages protéiques à l'interface air-eau. Les spectres PM-IRRAS (normalisés par le spectre du tampon) enregistrés entre 3 et 10 minutes après l'injection des protéines sous forme monomérique sont présentés sur la **Figure II - 13**. Il n'y a pas de changements observables sur les spectres même au bout de 3-4 heures. Dans la région amide I de 1600 – 1700 cm^{-1}, les spectres présentent une bande intense vers 1627 cm^{-1} et une faible bande vers 1690 cm^{-1} qui sont caractéristiques d'une structure en feuillets β antiparallèles. Ces deux bandes positives et leurs profils indiquent une orientation des feuillets plutôt parallèles à la surface (Banc et al. 2007).

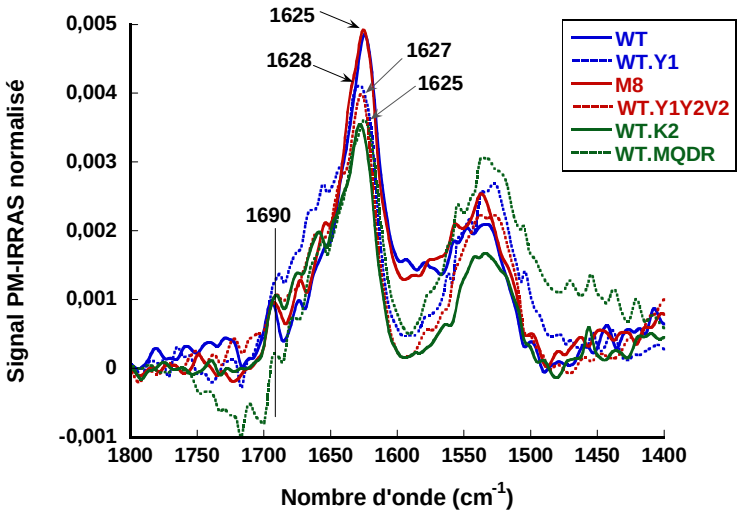


Figure II - 13: Spectres PMIRRAS des films protéiques formés à l'interface air-eau. La sousphase est un tampon PBS à pH 7,4. La concentration en monomère des protéines est de 0,75 µM. Toutes les expériences ont été réalisées à 25 ± 1 °C.

Ces résultats (obtenus par ellipsométrie et par PM-IRRAS) montrent qu'à l'interface air-eau les six protéines se comportent de façon similaire.

III.2. Interactions des protéines avec les monocouches de DOPG et d'asolectine à l'interface air-eau

III.2.1. Insertion

Pour mesurer la capacité de ces protéines à s'insérer dans les monocouches phospholipidiques à l'interface air-eau et à interagir avec ces couches, nous avons utilisé des monocouches de DOPG et d'asolectine. Les monocouches sont déposées à la surface du tampon PBS à la pression de surface d'environ 25 mN/m. Les protéines sont injectées dans la sousphase (PBS, pH 7,4) et trois paramètres sont observés : l'augmentation de pression de surface (mesurée par tensiométrie), le changement de morphologie et d'épaisseur de la couche à la surface (observée par ellipsométrie) et ainsi que la structure secondaire des protéines interagissant avec les monocouches (PM-IRRAS).

L'augmentation de pression de surface lors de l'interaction des protéines avec les monocouches lipidiques est présentée dans le **Tableau II - 6** :

Tableau II - 6: Augmentation de pression de surface lors d'interaction des protéines avec les monocouches lipidiques. La pression initiale des monocouches lipidiques est de ~25 mN/m/. La sousphase est un tampon PBS à pH 7,4. Les protéines sont injectées à l'état monomère à une concentration de 0,75 µM. Les expériences ont été réalisées à 25 ± 1 °C

Protéine	Monocouche de	
	Asolectine	DOPG
WT	2,0±0,5	5,5±0,5
WT.Y1	1,8±0,5	4,2±0,6
M8	3,0±0,5	4,2±0,5
WT.Y1Y2V2	3,0±1,0	5,9±0,5
WT.K2	1,7±0,5	4,7±0,5
WT.MQDR	0,8±0,5	2,3±0,5

Ces résultats montrent que toutes les protéines s'insèrent dans les monocouches lipidiques chargées négativement d'asolectine et de DOPG. L'insertion est cependant plus forte dans les monocouches de DOPG. A pH 7,4, toutes les protéines sont chargées positivement (**Tableau II - 4**), le DOPG est chargé -1 et l'asolectine est formé d'environ 40% de phospholipide anionique, et ~60% zwitterioniques. Ainsi l'insertion plus importante dans les monocouches de DOPG met en évidence l'importance de l'interaction électrostatique pour les interactions de ces protéines avec les monocouches lipidiques.

La capacité des protéines WT et M8 à s'insérer dans une monocouche d'asolectine est également déterminée. Les expériences sont réalisées comme décrites dans l'article (Ta et al. 2011). Les valeurs des pressions maximales d'insertion ou MIP (Maximum Insertion Pressure) obtenues ne sont pas très différentes pour les deux protéines (~27 mN/m pour WT et ~28 mN/m pour M8). Ces valeurs sont intermédiaires de celles obtenues pour les

monocouches de phospholipides neutres (DOPC, DOPE) (~24 - 25 mN/m) et celles obtenues pour les monocouches de phospholipides chargés négativement (DOPG, DOPI, DOPS) (28-29 mN/m) (Ta et al. 2011), ce qui est cohérent avec la composition de mélange de phospholipides d'asolectine (en considérant ainsi la forte affinité de ces deux protéines pour les lipides chargés).

III.2.2. **Morphologie des couches formées**

Avant l'injection des protéines, les monocouches d'asolectine et de DOPG sont homogènes (**Figure II - 14**) avec une épaisseur environ 20 Å (asolectine) et 16 Å (DOPG) (**Tableau II - 7**). Lors de l'interaction avec les protéines des changements de luminosité et/ou de morphologie des couches sont observés. Les comportements sont très différents pour les mutants toxiques (M8 et WT.Y1Y2V2) comparés à l'effet des protéines non toxiques (WT, WT.Y1, WT.K2, WT.MQDR) aussi bien sur les monocouches de DOPG que d'asolectine.

Pour les protéines WT, WT.Y1, WT.K2, WT.MQDR seules des changements de luminosité sont observés même au bout de 2 - 3 heures. Ces changements correspondent à des augmentations d'épaisseur des couches (**Tableau II - 7**).

Tableau II - 7: Angles ellipsométriques et épaisseur des couches (estimées pour un indice de réfraction de 1,45)

Protéine	**Angle ellipsometric (δΔ, Ψ) et épaisseur des couches (Å)** *							
	Asolectine				**DOPG**			
	Sans protéines		**+ protéines**		**Sans protéines**		**+ protéines**	
	|δΔ|= |Δ-Δ°| Ψ	**e (Å)**	**|δΔ| Ψ**	**e (Å)**	**|δΔ| Ψ**	**e (Å)**	**|δΔ| Ψ**	**e (Å)**
WT	5,5±0,8° 2,45±0,12°	17±2	6,7±0,8° 2,45±0,12°	21±2	4,5±0,8° 2,40±0,12°	15±2	6,0±0,8° 2,40±0,12°	20±2
WT.Y1	6,1±0,8° 2,25±0,12°	20±2	10,4±0,8° 2,25±0,12°	35±3	4,6±0,8° 2,25±0,12°	15±1	14,5±0,8° 2,25±0,12°	48±5
M8	6,0±0,8° 2,50±0,12°	18±2	16,0±0,8° 2,50±0,12°	50±5	4,5±0,8° 2,40±0,12°	15±2	21,0±0,8° 2,41±0,12°	70±6
WT.Y1Y2V2	6,1±0,8° 2,25±0,12°	20±2	18,7±0,8° 2,19±0,12°	63±6	5,04±0,8° 2,25±0,12°	17±1	34,8±0,8° 2,25±0,12°	120±11
WT.MQDR	5,9±0,8° 2,25±0,12°	20±2	8,2±0,8° 2,25±0,12°	26±3	4,8±0,8° 2,25±0,12°	16±1	8,9±0,8° 2,25±0,12°	29±3
WT.K2	6,3±0,8° 2,25±0,12°	21±2	9,0±0,8° 2,25±0,12°	30±3	4,8 ±0,8° 2,25±0,12°	16±1	11,1±0,8° 2,25±0,12°	38±4

*L'épaisseur (e) est déterminée en utilisant une valeur de 1,45 pour l'indice de réfraction. Les résultats sont présentés comme une moyenne ± SD.

En interaction avec la monocouche d'asolectine, l'épaisseur de ces couches augmente d'un facteur de 1,7 fois au maximum. En interaction avec la monocouche de DOPG, le rapport maximum est de ~3 fois.

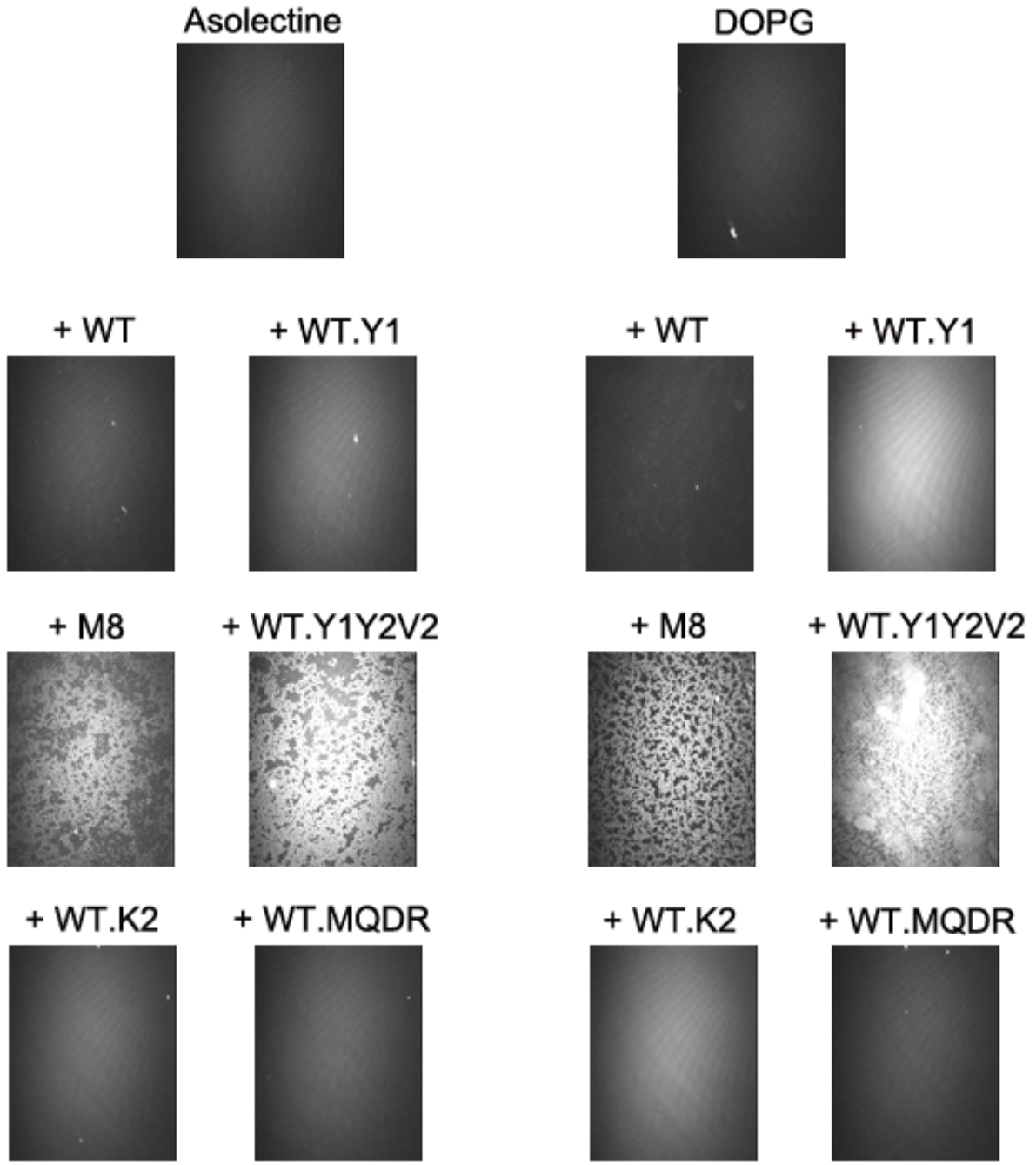


Figure II - 14: Images ellipsométriques de monocouches d'asolectine et de DOPG avant et après l'injection des protéines dans la sousphase PBS (pH 7,4, 25 ± 1 °C) à concentration en monomères de 0,75 µM. La pression initiale des monocouches de lipides est de 25 mN/m. Les dimensions des images sont 450 x 670 µm.

Pour les protéines M8 et WT.Y1Y2V2, on observe non seulement une très forte augmentation d'épaisseur des couches mais aussi des changements importants de morphologie des couches présentes à l'interface air-eau (**Figure II - 14**). Dans ces interactions, les agrégats formés ont des épaisseurs importantes. En interaction avec la monocouche d'asolectine, les épaisseurs ont augmenté d'un facteur de ~3 par rapport à la monocouche initiale et en interaction avec la monocouche de DOPG, ce facteur est de 5 à 7 fois. Des agrégats plus importants sont formés en interaction de WT.Y1Y2V2 avec les

monocouches d'asolectine et de DOPG. Il pourrait exister des interactions spécifiques entre WT.Y1Y2V2 et les monocouches lipidiques.

Notons que les augmentations d'épaisseur des couches dans les interactions avec DOPG sont toujours plus grandes que celles d'asolectine correspondantes. Cela indique une adsorption et/ou une insertion plus forte des protéines avec DOPG et ainsi confirme l'importance des interactions électrostatiques. Si on corrèle les effets causés par les protéines aux monocouches lipidiques avec la toxicité in vivo (**Tableau II - 4**) de ces protéines, on observe effectivement une cohérence entre la toxicité et l'effet de déstabilisation des monocouches lipidiques comme des modèles membranaires.

Ces résultats indiquent que dans l'interaction avec des monocouches chargées négativement de DOPG ou d'asolectine, les protéines toxiques perturbent ces monocouches beaucoup plus fortement que les protéines non-toxiques en formant des agrégats d'épaisseur très importante. De plus, l'importance de la contribution électrostatique dans ces interactions est toujours confirmée.

III.2.3. **Structures secondaires des protéines**

La structure secondaire des protéines en interaction avec les monocouches lipidiques d'asolectine et de DOPG a été déterminée par l'analyse des spectres PM-IRRAS (**Figure II - 15 et Figure II - 16**). Ces spectres sont obtenus par rapport aux spectres du tampon (PBS, pH 7,4). Les bandes d'absorption vers 1731 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation C=O esters des têtes polaires des lipides d'asolectine et de DOPG.

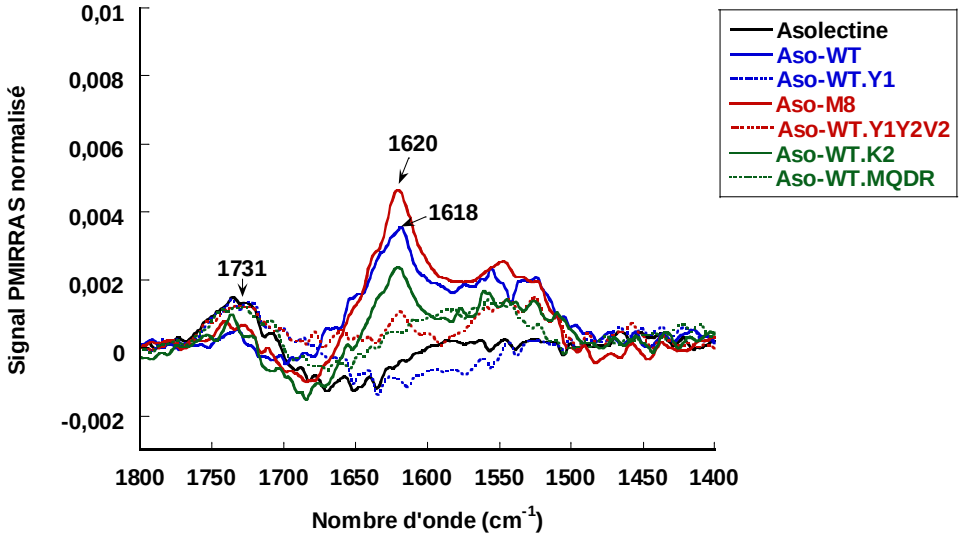


Figure II - 15: Spectres PMIRRAS enregistrés lors des interactions des protéines WT, WT.Y1, M8, WT.Y1Y2V2, WT.K2, WT.MQDR avec la monocouche d'asolectine à l'interface air-eau. La sousphase est un tampon PBS à pH 7,4. La concentration en monomère des protéines est de 0,75 µM. Toutes les expériences ont été réalisées à 25 ± 1 °C.

Dans le cas de la monocouche d'asolectine (**Figure II - 15**), dans la zone spectrale d'amide I (1600 - 1700 cm^{-1}), les protéines WT (courbe bleu continue), M8 (courbe rouge continue), WT.Y1Y2V2 (courbe rouge pointillée) et WT.K2 (courbe verte continue) présentent une bande d'absorption intense vers 1618 - 1621 cm^{-1}. Un nombre d'onde d'absorption aussi bas (1618 - 1621 cm^{-1}) correspond à des structures principalement en feuillets β antiparallèles. D'après les règles de sélection des spectres PMIRRAS (Banc et al. 2007), lors d'interaction des protéines WT et M8 avec la monocouche d'asolectine (**Figure II - 15**, courbe bleu continue et courbe rouge continue), les feuillets β formés s'orientent plutôt parallèlement à l'interface. Pour les interactions Asolectine-WT.K2 et Asolectine-WT.Y1Y2V2 (**Figure II - 15**, courbe verte continue et courbe rouge pointillée), des feuillets β sont orientés avec les chaînes peptidiques parallèles à l'interface alors que les liaisons hydrogène forment un angle ~15 - 30° avec l'interface. Pour l'interaction Asolectine-WT.Y1, le spectre de la protéine n'est pas clairement observable par PMIRRAS alors que l'ellipsométrie indique une augmentation significative de l'épaisseur des couches par rapport à la monocouche d'asolectine seule (35 Å par rapport à 20 Å). Les structures doivent adopter une orientation spécifique pour laquelle les deux absorptions amide I et amide II sont annulées. En effet, comme cela a déjà été démontré il existe un angle pour lesquels les deux bandes sont très faibles en PMIRRAS (Banc et al. 2007). Pour une structure de feuillets, cette orientation correspond à un angle de ~45° entre les chaînes peptidiques et l'interface et un angle ~15°C des liaisons hydrogène et l'interface. Dans le cas de l'interaction Asolectine-WT.MQDR, l'intensité faible du spectre PMIRRAS est cohérente avec la faible variation de morphologie observée en ellipsométrie. Le profil du spectre ne permet pas de déterminer la structure de cette protéine en interaction avec la monocouche d'asolectine.

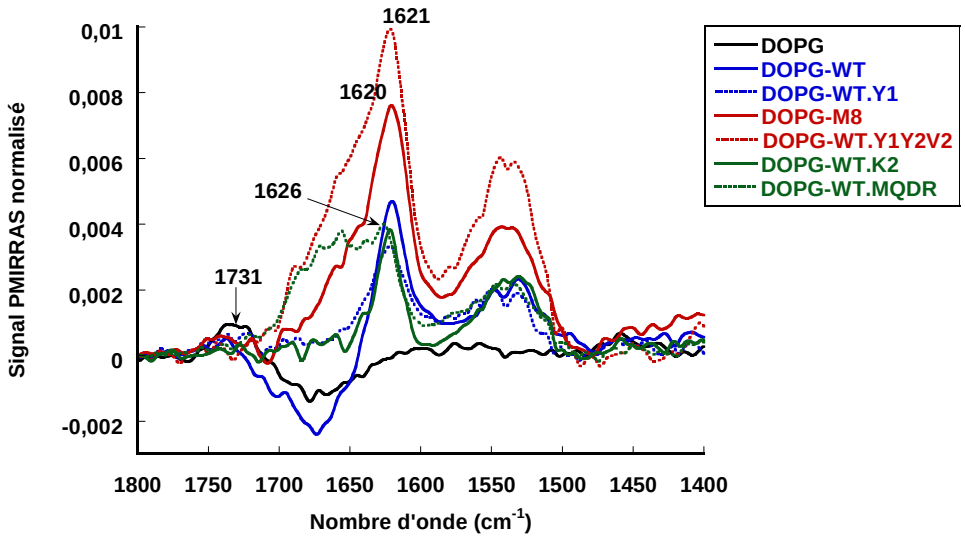


Figure II - 16: Spectres PMIRRAS enregistrés lors des interactions des protéines WT, WT.Y1, M8, WT.Y1Y2V2, WT.K2, WT.MQDR avec la monocouche de DOPG à l'interface air-eau. La sousphase est un tampon PBS à pH 7,4. La concentration en monomère des protéines est de 0,75 µM. Toutes les expériences ont été réalisées à 25 ± 1 °C.

Pour les expériences avec la monocouche de DOPG, tous les spectres des protéines présentent une bande intense vers 1620 - 1626 cm^{-1} (**Figure II – 16**). Une bande plus faible vers 1680 - 1690 cm^{-1} est observable dans le cas de DOPG-M8 et DOPG-WT.Y1Y2V2 (**Figure II - 16**). Les profils spectraux des protéines dans ces interactions sont caractéristiques d'une structure essentiellement en feuillets β antiparallèles sauf dans le cas de DOPG-WT.MQDR où des contributions importantes des structures turns et random coils sont observées. D'après les règles de sélection de PMIRRAS (Banc et al. 2007), des feuillets β antiparallèles formés dans ces interactions sont orientés plutôt parallèlement à l'interface.

La structuration en feuillets β antiparallèles à l'interface air-eau est également reportée pour d'autres amyloïdes : pour l'hIAPP en interaction avec des monocouches de POPG (Lopes et al. 2007), pour le prion PrP 106-126 en interaction avec des monocouches de DMPG ou PS (Dorosz et al. 2009).

Afin de déterminer les effets des protéines sur les monocouches d'asolectine et de DOPG, nous examinons la zone spectrale des vibrations antisymétriques (~2924 cm^{-1}) et symétriques (~2854 cm^{-1}) des CH_2 des chaînes hydrocarbonées des lipides (**Figure II - 17 et II - 18**).

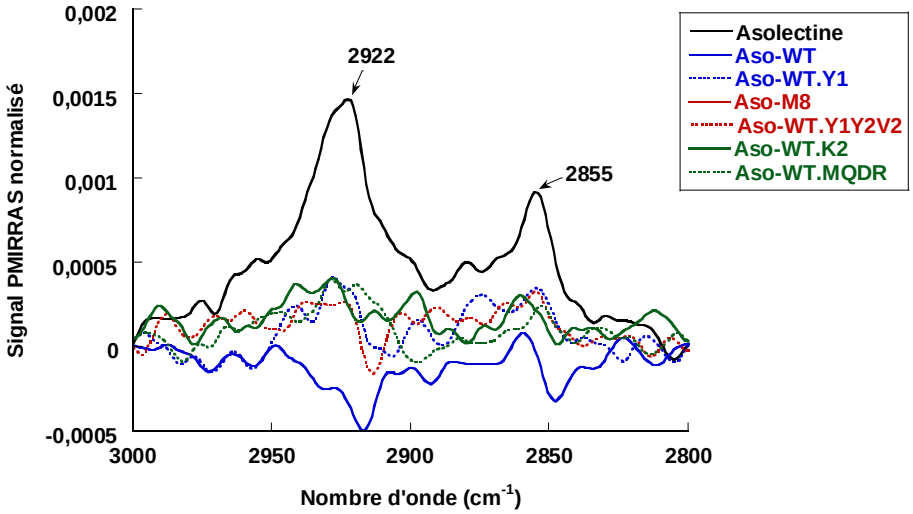


Figure II - 17: Spectres PMIRRAS (2800-3000 cm^{-1}) enregistrés lors des interactions des protéines WT, WT.Y1, M8, WT.Y1Y2V2, WT.K2, WT.MQDR avec la monocouche d'asolectine à l'interface air-eau. La sousphase est un tampon PBS à pH 7,4. La concentration en monomère des protéines est de 0,75 µM. La pression initiale des monocouches lipidiques est de ~25 mN/m. Toutes les expériences ont été réalisées à 25 ± 1 °C.

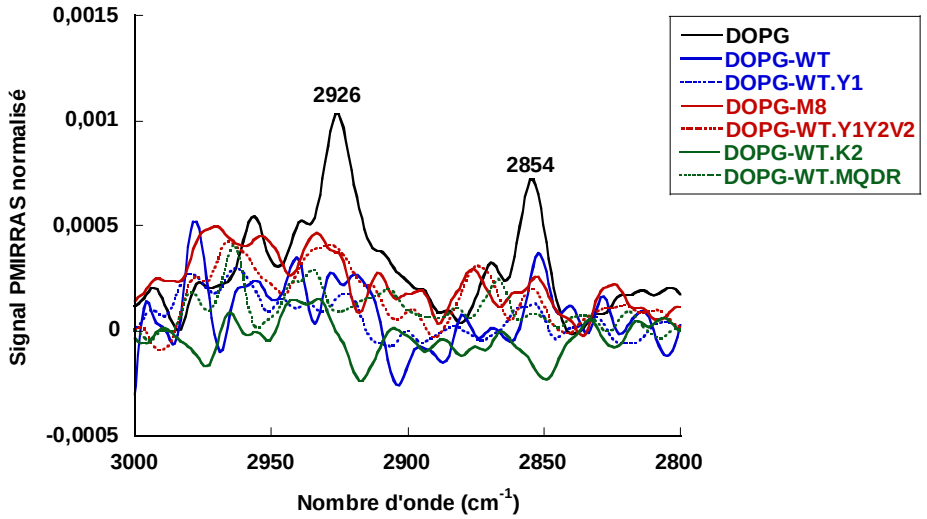


Figure II - 18: Spectres PMIRRAS (2800 - 3000 cm^{-1}) enregistrés lors des interactions des protéines WT, WT.Y1, M8, WT.Y1Y2V2, WT.K2, WT.MQDR avec la monocouche de DOPG à l'interface air-eau. La sousphase est un tampon PBS à pH 7,4. La concentration en monomère des protéines est de 0,75 µM. La pression initiale des monocouches lipidique est de ~25 mN/m. Toutes les expériences ont été réalisées à 25 ± 1 °C.

Après l'interaction avec les protéines, les bandes de vibration symétriques (~2854 cm^{-1}) et antisymétriques (~2924 cm^{-1}) des CH_2 des chaînes lipidiques ne sont plus observables (**Figure II - 17 et II - 18**). Cela montre que les monocouches d'asolectine et de DOPG sont fortement perturbées par l'adsorption/l'insertion des protéines bien que dans certains cas, la morphologie de la monocouche lipidique ne semble pas être altérée (**Figure II – 14**).

III.2.4. **Nature des agrégats formés dans les interactions des protéines WT et M8 avec la monocouche d'asolectine**

Afin d'examinier si les agrégats formés lors des interactions de WT et M8 avec les monocouches d'asolectine à l'interface air-eau ont des propriétés amyloïdes, nous avons transféré les couches présentes à l'interface sur des lamelles en verre comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes de l'article de Ta et al. (Ta et al. 2011). Les échantillons sont teintés avec le rouge Congo et ensuite examinés sous le microscope en lumière polarisée afin d'observer une biréfringence (**Figure II - 19**).

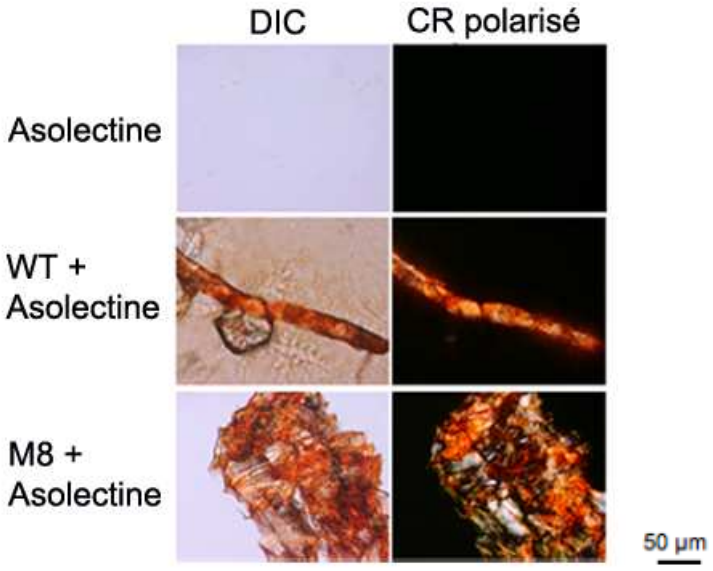


Figure II - 19: Images teintées par le rouge Congo des couches formées à l'interface dans l'interaction des monocouches d'asolectine avec le WT et le M8 à 0,75 µM. La pression initiale de surface des monocouches d'asolectine est de 25 mN/m. Le sousphase est un tampon PBS à pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 25 ± 2°C.

La monocouche d'asolectine seule ne présente aucun objet. Tous les échantillons ont un aspect fibreux, sont teintés rouge et présentent une biréfringence sous la lumière polarisée. Ces propriétés en combinaison avec les résultats obtenus précédemment (structuration en feuillets β) nous permettent de conclure que les agrégats de WT ou M8 formés en interaction avec la monocouche d'asolectine à l'interface air-eau sont probablement de type amyloïde.

III.3. **Conclusions**

A l'aide de l'ellipsométrie, nous avons démontré que les protéines toxiques (M8, WT.Y1Y2V2) perturbent fortement les monocouches de lipides (Asolectine, DOPG) contrairement aux protéines non toxiques.

La spectroscopie PM-IRRAS indique qu'à l'interface air-eau, toutes les protéines perturbent les monocouches d'asolectine et de DOPG au niveau des chaînes CH_2 des lipides.

Enfin, nos résultats confirment l'importance des forces électrostatiques dans les interactions de ces protéines amyloïdes avec les monocouches lipidiques.

Une partie de ces résultats est présentée dans l'article « *In vivo* and *in vitro* analyses of toxic mutants of HET-s: FTIR antiparallel signature correlates with amyloid toxicity » de Berthelot et al. (Berthelot et al. 2011), joint à la fin de ce chapitre.

IV. Conclusions générales et discussions

Les points importants à retenir :

- La contribution électrostatique est importante dans l'interaction des protéines avec les monocouches lipidiques. C'est la première fois que cette propriété est démontrée pour la protéine HET-s (218-289).
- Les mutants toxiques (M8, WT.Y1Y2V2) modifient fortement et spécifiquement des monocouches de lipides chargées négativement. Cet effet est dépendant de la concentration en protéine dans le cas de M8.
- Le pH de la sousphase est important dans l'auto-assemblage des protéines amyloïdes WT et M8 et dans l'interaction de ces protéines avec les monocouches membranaires.
- A l'interface air-eau du tampon PBS pH 7,4, les protéines WT et M8 s'auto-assemblent en des agrégats de types amyloïdes. Les agrégats formés dans l'interaction de ces protéines avec les monocouches lipidiques sont de types amyloïdes.

Lors de l'auto-assemblage à l'interface air-eau ou en interaction avec des monocouches de différents lipides à l'interface air-eau, les protéines WT et M8 s'organisent dans des structures principales en feuillets β antiparallèles avec des bandes d'absorption vers 1618-1626 cm^{-1}. Ce comportement diffère de ce que l'on observe en solution notamment pour la protéine WT qui s'organise dans une structure riche en feuillets β parallèles (l'absorption maximales vers 1629-1632 cm^{-1}) (Berthelot et al. 2009; Wasmer et al. 2008). Pour vérifier que la fréquence que nous observons en PMIRRAS pour WT n'est pas due à un phénomène optique, nous avons réalisé des simulations des spectres PMIRRAS des feuillets β parallèles avec des maxima situés à 1630 et 1632 cm^{-1} à différentes orientations par rapport à l'interface. Les spectres calculés montrent que pour certaines orientations, le maximum de la bande d'absorption peut descendre vers 1627 cm^{-1} mais pas au-delà. De plus, le profil spectral (rapport AI/AII) des feuillets à l'orientation où l'absorption est vers 1627 cm^{-1} ne correspond pas au profil des spectres expérimentaux observés pour le WT. D'ailleurs, expérimentalement, nous observons toujours sur les spectres PMIRRAS du WT une bande d'absorption vers 1690 cm^{-1} caractéristique de feuillets β antiparallèles.

Nous en déduisons qu'à l'interface air/eau la protéine WT s'organise avec une structure en feuillets β antiparallèles, différente de la structure secondaire en feuillets β parallèles des fibres formées en solutions. La formation de cette structure antiparallèle pour WT est donc directement reliée à la spécificité de l'interface air-eau. L'importance des effets hydrophobes dans la fibrillation des protéines amyloïdes a été déjà montrée (Hills and Brooks

2007). Yamazaki et al. (2008) a de plus démontré par les calculs de dynamique moléculaire que l'hydratation interne suivant l'axe des fibres de WT est essentielle pour la stabilité de ces fibres (Yamazaki et al. 2008). Par conséquent, la présence de l'interface hydrophobe (air-eau) pourrait modifier l'organisation de WT en favorisant l'exposition des chaînes latérales hydrophobes à l'air ce qui entraîne la structuration en feuillets β antiparallèles. Donc, en présence de l'interface air-eau, l'interaction des protéines avec le modèle monocouche de lipides est probablement modifiée. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier l'interaction des protéines (WT et M8) avec un nouveau modèle membranaire, la bicouche.

Article " In vivo and in vitro analyses of toxic mutants of HET-s: FTIR antiparallel signature correlates with amyloid toxicity"

Berthelot, K., H. P. Ta, J. Gean, S. Lecomte, and C. Cullin, J. Mol. Biol. 412 (1):137-152 (page 112).

Bibliographie

Banc, A., B. Desbat, D. Renard, Y. Popineau, C. Mangavel, and L. Navailles. **2007**. Structure and orientation changes of omega- and gamma-gliadins at the air-water interface: a PM-IRRAS spectroscopy and Brewster angle microscopy study. *Langmuir* 23 (26):13066-13075.

Berthelot, K., F. Immel, J. Gean, S. Lecomte, R. Oda, B. Kauffmann, and C. Cullin. **2009**. Driving amyloid toxicity in a yeast model by structural changes: a molecular approach. *FASEB J.* 23 (7):2254-2263.

Berthelot, K., S. Lecomte, J. Gean, F. Immel, and C. Cullin. **2010**. A yeast toxic mutant of HET-s((218-289)) prion displays alternative intermediates of amyloidogenesis. *Biophys. J.* 99 (4):1239-1246.

Berthelot, K., H. P. Ta, J. Gean, S. Lecomte, and C. Cullin. **2011**. In vivo and in vitro analyses of toxic mutants of HET-s: FTIR antiparallel signature correlates with amyloid toxicity. *J. Mol. Biol.* 412 (1):137-152.

Bertie, J. E., and Z. Lan. **1996**. Infrared Intensities of Liquids XX: The Intensity of the OH Stretching Band of Liquid Water Revisited, and the Best Current Values of the Optical Constants of H20(I) at 25 °C between 15,000 and 1 cm^{-1}. *Appl. Spectrosc.* 50 (8):1047-1057.

Blaudez, D., J. M. Turlet, J. Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau, and B. Desbat. **1996**. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92:525-530.

Bucciantini, M., E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli, J. Zurdo, N. Taddei, G. Ramponi, C. M. Dobson, and M. Stefani. **2002**. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416 (6880):507-511.

Cerf, E., R. Sarroukh, S. Tamamizu-Kato, L. Breydo, S. Derclaye, Y. F. Dufrene, V. Narayanaswami, E. Goormaghtigh, J. M. Ruysschaert, and V. Raussens. **2009**. Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide. *Biochem. J.* 421 (3):415-423.

Couthouis, J., K. Rebora, F. Immel, K. Berthelot, M. Castroviejo, and C. Cullin. **2009**. Screening for toxic amyloid in yeast exemplifies the role of alternative pathway responsible for cytotoxicity. *PLoS One* 4 (3):e4539.

Dorosz, J., R. Volinsky, E. Bazar, S. Kolusheva, and R. Jelinek. **2009**. Phospholipid-induced fibrillation of a prion amyloidogenic determinant at the air/water interface. *Langmuir* 25 (21):12501-12506.

Garidel, P., and A. Blume. **2005**. 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG) monolayers: influence of temperature, pH, ionic strength and binding of alkaline earth cations. *Chem. Phys. Lipids* 138 (1-2):50-59.

Haque, F., A. P. Pandey, L. R. Cambrea, J. C. Rochet, and J. S. Hovis. **2010**. Adsorption of alpha-synuclein on lipid bilayers: modulating the structure and stability of protein assemblies. *J. Phys. Chem. B* 114 (11):4070-4081.

Hills, R. D., Jr., and C. L. Brooks, 3rd. **2007**. Hydrophobic cooperativity as a mechanism for amyloid nucleation. *J. Mol. Biol.* 368 (3):894-901.

Ji, S. R., Y. Wu, and S. F. Sui. **2002**. Cholesterol is an important factor affecting the membrane insertion of beta-amyloid peptide (A beta 1-40), which may potentially inhibit the fibril formation. *J. Biol. Chem.* 277 (8):6273-6279.

Kayed, R., Y. Sokolov, B. Edmonds, T. M. McIntire, S. C. Milton, J. E. Hall, and C. G. Glabe. **2004**. Permeabilization of Lipid Bilayers Is a Common Conformation-dependent Activity of Soluble Amyloid Oligomers in Protein Misfolding Diseases. *The Journal of Physical Chemistry* 279 (45):46363-46366.

Lopes, D. H. J., A. Meister, A. Gohlke, A. Hauser, A. Blume, and R. Winter. **2007**. Mechanism of Islet Amyloid Polypeptide Fibrillation at Lipid Interfaces Studied by Infrared Reflection Absorption Spectroscopy. *Biophysical Journal* 93 (9):3132-3141.

Sabate, R., U. Baxa, L. Benkemoun, N. Sanchez de Groot, B. Coulary-Salin, M. L. Maddelein, L. Malato, S. Ventura, A. C. Steven, and S. J. Saupe. **2007**. Prion and non-prion amyloids of the HET-s prion forming domain. *J. Mol. Biol.* 370 (4):768-783.

Steunou, S., J. F. Chich, H. Rezaei, and J. Vidic. **2010**. Biosensing of lipid-prion interactions: insights on charge effect, Cu(II)-ions binding and prion oligomerization. *Biosens. Bioelectron* 26 (4):1399-1406.

Ta, H. P., K. Berthelot, B. Coulary-Salin, B. Desbat, J. Gean, L. Servant, C. Cullin, and S. Lecomte. **2011**. Comparative studies of nontoxic and toxic amyloids interacting with membrane models at the air-water interface. *Langmuir* 27 (8):4797-4807.

Wasmer, C., A. Lange, H. V. Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, and B. H. Meier. **2008**. Amyloid Fibrils of the HET-s(218-289) Prion Form a β Solenoid with a Triangular Hydrophobic Core. *Science* 319 (5869):1523-1526.

Westermark, P., M. D. Benson, J. N. Buxbaum, A. S. Cohen, B. Frangione, S. Ikeda, C. L. Masters, G. Merlini, M. J. Saraiva, and J. D. Sipe. **2005**. Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 12 (1):1-4.

Yamazaki, T., N. Blinov, D. Wishart, and A. Kovalenko. **2008**. Hydration effects on the HET-s prion and amyloid-beta fibrillous aggregates, studied with three-dimensional molecular theory of solvation. *Biophys. J.* 95 (10):4540-4548.

doi:10.1016/j.jmb.2011.07.009 J. Mol. Biol. (2011) 412, 137–152

Contents lists available at www.sciencedirect.com

Journal of Molecular Biology

journal homepage: http://ees.elsevier.com.jmb

In Vivo and *In Vitro* Analyses of Toxic Mutants of HET-s: FTIR Antiparallel Signature Correlates with Amyloid Toxicity

Karine Berthelot[1], Ha Phuong Ta[2,3], Julie Géan[2], Sophie Lecomte[2] and Christophe Cullin[1]*

[1]*Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, Université Bordeaux 2 «Victor Segalen», 1 rue Camille Saint Saëns, 33077 Bordeaux, France*
[2]*Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjets, CNRS UMR 5248, Institut Polytechnique de Bordeaux, Université Bordeaux 1, 33607 Pessac, France*
[3]*Institut des Sciences Moléculaires, CNRS UMR 5255, 33405 Talence, France*

Received 25 March 2011; received in revised form 4 July 2011; accepted 6 July 2011
Available online 18 July 2011

Edited by S. Radford

Keywords:
HET-s;
aggregation;
FTIR;
folding;
toxicity

The folding and interactions of amyloid proteins are at the heart of the debate as to how these proteins may or may not become toxic to their host. Although little is known about this issue, the structure seems to be clearly involved with effects on molecular events. To understand how an amyloid may be toxic, we previously generated a yeast toxic amyloid (mutant 8) from the nontoxic HET-s$_{(218–289)}$ prion domain of *Podospora anserina.* Here, we performed a comprehensive structure–toxicity study by mutating individually each of the 10 mutations found in mutant 8. The study of the library of new mutants generated allowed us to establish a clear link between Fourier transform infrared antiparallel signature and amyloid toxicity. All of the mutants that form parallel β-sheets are not toxic. Double mutations may be sufficient to shift a parallel structure to antiparallel amyloids, which are toxic to yeast. Our findings also suggest that the toxicity of antiparallel structured mutants may be linked to interaction with membranes.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

More than 40 human diseases are characterized by abnormal aggregation and deposition of misfolded proteins (for a review, see Ref. 1). Many of these are neurodegenerative disorders, including mammalian prions, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. The hallmark of these conformational diseases is the presence of amyloid proteins, which share the common characteristic of β-sheet-rich fibrils, despite having clearly different amino acid sequences. Not all amyloids are detrimental to their host, and some could be functionally important. Examples of such amyloids are found in bacterial biofilms[2,3] or spider silk.[4] Some have also been reported to contribute to different functions, including cell adhesion in yeast and fungi[5,6] and eggshell protection of insects and invertebrates.[7,8] Functional amyloids are also present in humans; for example, the Pmel17 amyloid assists in the biosynthesis of melanin.[9] Other functions in humans, which are possibly dependent on amyloids, include activation of hemostatic factors,[10] exertion of antiangiogenic activity,[11] promotion of cell attachment during human immunodeficiency virus semen contamination,[12] and

*Corresponding author. E-mail address: christophe.cullin@ibgc.u-bordeaux2.fr.

Abbreviations used: ThT, thioflavin T; CR, Congo red; Aβ, amyloid beta; ATR, attenuated total reflectance; FTIR, Fourier transform infrared; WT, wild type; M8, mutant 8; GFP, green fluorescent protein; OD_{405}, optical density at 405 nm; PBS, phosphate-buffered saline.

0022-2836/$ - see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

antimicrobial activity.[13] Recently, over 30 human peptide hormones have been found stored as amyloid in pituitary secretory granules.[14] Amyloid formation may be therefore more widespread than previously thought. Indeed, there is increasing evidence that many (if not all) proteins, such as myoglobin[15] or bovine serum albumin,[16] can undergo structural transition into amyloid under the appropriate environmental conditions (e.g., temperature, pH, and membranes[17,18]).

Both deleterious and functional amyloid proteins share common structural properties. These include association in fibrils, fibers, or aggregates with a cross-β-sheet backbone and a classical 4. 7-Å X-ray diffraction pattern along the fibril direction, as well as another X-ray reflection at ~10–12 Å resolution perpendicular to the fibril direction. In addition, both kinds of amyloids may be recognized by structural antibodies raised against toxic intermediates.[19] Amyloids also demonstrate resistance to proteinases and can be stained with various dyes such as 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, thioflavin T (ThT), or Congo red (CR) visualized with birefringence. The β-sheet stacking of monomers during amyloid formation involves either parallel or antiparallel orientation. Structural studies using solid-state NMR have shown that the basic motif of amyloid fibrils is a β-strand–loop–β-strand conformation, often in a parallel β-sheet assembly.[20] The determination of the three-dimensional structures of short fibril-forming peptide segments of amyloid proteins [i.e., Sup35, insulin, amyloid beta (Aβ), tau, and amylin] by X-ray crystallography has confirmed the existence of cross-β-sheet motifs.[21,22] More recently, a study based on attenuated total reflectance–Fourier transform infrared (ATR–FTIR) spectroscopy showed that Aβ(1–42) oligomers adopt an antiparallel β-sheet structure,[23] which is distinctly absent from fibrils previously described as a parallel β-sheet structure.[24]

Despite extensive research into amyloid toxicity, the mechanisms that cause cytotoxicity are far from clear. Several studies have suggested the involvement of intermediate species such as oligomers,[19,25,26] annular or short/quiescent fibrils,[27–29] and membrane pores/channels;[30,31] others have shown toxicity to be associated with mature fibrils[32,33] and that the actual size of the cross-β-core could be a key factor.[34] It has also been suggested that the toxic species could interact inappropriately with a wide range of cellular components, particularly biological membrane.[35–37]

However, what makes an amyloid toxic remains unclear. Its toxicity may be related to the opportunity for interactions with membranes or other cellular components. Toxicity may also be strictly inherent in the sequence of the protein leading to one particular kind of toxic amyloid or toxic intermediate. Finally, the capacity of amyloid proteins to form parallel or antiparallel β-sheet structures may be another mechanism of toxicity. None of these possible mechanisms are mutually exclusive. In the present study, we focus on the structure of toxic amyloids. Our amyloid model is HET-$s_{(218–289)}$ [wild type (WT)] and is not toxic to yeast.[38] HET-s is a prion protein (289 amino acids in length) from the filamentous fungi *Podospora anserina* and is responsible for a process termed "heterogeneous incompatibility".[39] The prion-forming domain HET-$s_{(218–289)}$ forms amyloid fibers, the structure of which has been determined by solid-state NMR.[40] In a previous study, we used random mutagenesis to generate a collection of toxic mutants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae.* Mutant 8 (M8) is the most toxic mutant, presenting 10 mutations all along its amino acid sequence.[38] We established that the toxic M8 amyloid displayed different biochemical and structural features with a totally different organization.[41] M8 is assembled in mainly FTIR antiparallel amyloid nanofibers (thicker in diameter; ≈10 nm), whereas WT long fibers are organized into parallel β-sheets (about 5 nm in diameter). In addition, M8 shows visible oligomeric intermediates, which were not observed in WT.[42]

Here, we performed an extensive structure–toxicity study to characterize the mechanism of amyloid toxicity. A collection of 38 mutants was generated, recapitulating all the M8 mutations, and their cellular and molecular features were examined. Our results show that all of the mutants that form parallel β-sheet assembly as examined by FTIR are not toxic and establish a clear link among FTIR antiparallel signature, interaction with membranes, and amyloid toxicity.

Results

In vivo toxicity relies on disturbance of β1–β3 sheet interactions

We generated, by site-directed mutagenesis, 38 mutants derived from either nontoxic WT or toxic M8, which are presented in Fig. 1a. The nomenclature for each mutation in WT and in M8 is defined in Supplemental Fig. 1. Briefly, each mutant named WT.X means that the backbone corresponds to the WT sequence with only one mutation corresponding to the amino acid X in the M8 sequence. For expression in yeast, C-terminal green fluorescent protein (GFP) fusion plasmids of each mutant were used and the toxicity was evaluated by spotting assays. The growth phenotype was evaluated by comparison with the controls (Fig. 1b). Mutants with no toxicity are not shown as they behaved as the controls, but 15 mutants displayed varying levels of toxicity (Fig. 1b). Observation of the corresponding GFP patterns identified *in vivo* clusters of these

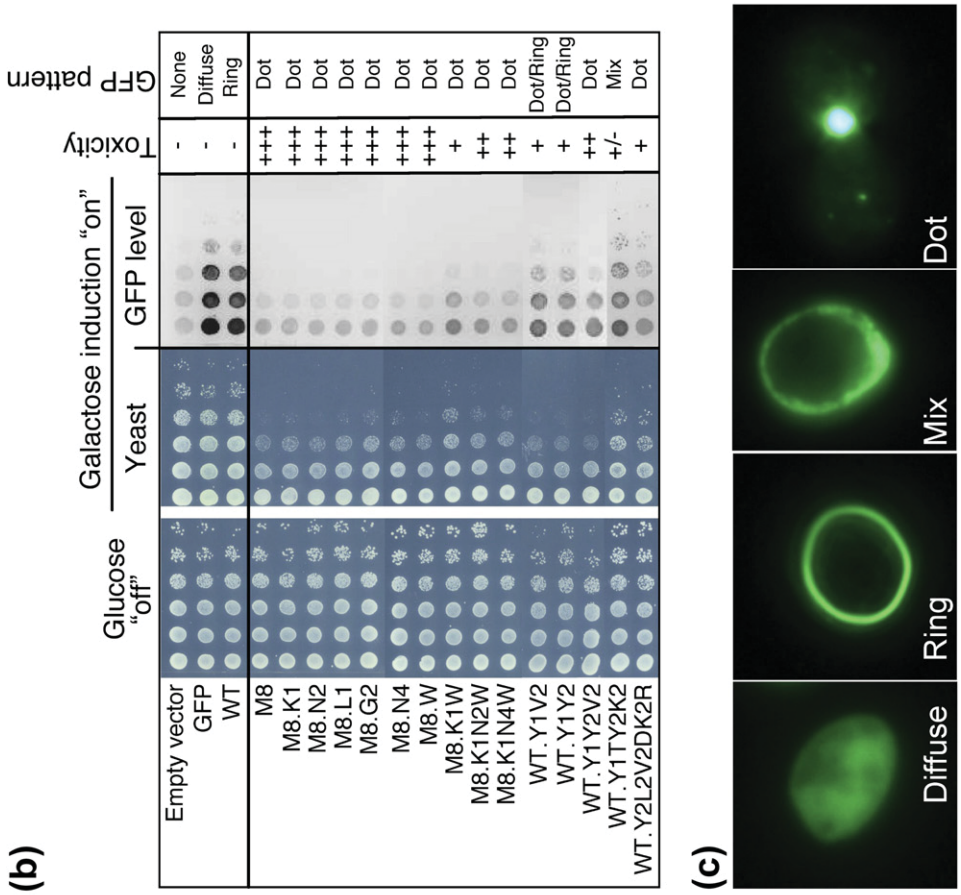


Fig. 1. *In vivo* toxicity of the different mutants of HET-s$_{(218-289)}$ (WT) expressed in the yeast *S. cerevisiae*. (a) Sequences of the toxic and nontoxic mutants analyzed in this study. (b) Toxicity in yeast spotting assays. Only the 15 toxic mutants are presented; all of the 24 other nontoxic mutants were identical with controls. Tenfold serial dilutions started with an equal number of cells that were derived from a pool of several independent fresh colonies. Spotting assays were made of 5-µl drops plated onto non-inducible dextrose or inducible galactose media. Results were repeated at least three times with a minimum of three independent yeast transformations. (c) Yeast cells were observed under a fluorescence microscope, and four basic patterns of GFP fluorescence were described for the 39 mutants.

mutants in the same group (Table 1). The common characteristics shared by these mutants included a low level of GFP expression and the presence of foci. The low level of GFP expression definitively rules out the possibility of toxicity being a result of a huge increase of a given amyloid protein. All of the proteins expressed in yeast fell into four GFP patterns. These were defined as diffuse fluorescence, long ring/annular structures, dots of various sizes, and intermediate/mixed structures (Fig. 1c). In contrast, nontoxic mutants showed higher levels of GFP expression with mainly ring structures of aggregation for the mutants derived from WT (identical with the WT control in Fig. 1b and c).

No single point mutations in WT triggered toxicity. This is consistent with the fact that the M8 protein is heavily mutated. All but four single mutants (M8.N1, M8.N3, M8.G1, and M8.V1) obtained by changing one amino acid from the M8 to the WT sequence remained toxic to the yeast cells. However, these four residues are not sufficient to promote any toxicity when expressed in a WT backbone (see corresponding WT.Y1, WT.Y2, WT.L2, and WT.G2).

Table 1. Summary of characteristics of all the studied proteins

	In vivo			*In vitro*			
Proteins	Toxicity	Aggregate type	GFP level	A_{405}[a]	ThT binding[a]	CR shift[b] (maximum peak)	Birefringence[b]
Parallel β-sheets/random coils							
WT	–	Ring	+++	+	–	+ (505)	+
WT.M	–	Ring	+	+	–	+ (505)	+
WT.Q	–	Ring	++	++	–	+ (505)	+
WT.D	–	Ring	+++	+	–	+ (505)	+
WT.R	–	Ring	+++	+	+	+ (505)	+
WT.T	–	Ring	+++	+	–	+ (505)	+
WT.Y2	–	Ring	++	–	–	+ (495)	+
WT.L2	–	Ring	+++	+++	–	+ (505)	+
WT.V2	–	Ring	++	+++	–	+ (505)	+
WT.Y1Y2	+	Ring/dot	+	+	+	+ (505)	+
WT.Y1	–	Ring	+	+	±	+ (505)	+
WT.MQ	–	Ring	+++	+	±	+ (500)	+
WT.TQ	–	Ring	+++	+	–	– (485)	+
WT.Y1T	–	Ring/dot/diffuse	++	+	–	+ (505)	+
WT.MY1TQ	–	Mix	–	–	+	+ (505)	+
Antiparallel β-sheets/random coils							
M8	+++	Dot	–	++	++	+ (520)	+
M8.N4	+++	Dot	–	+	++	+ (510)	+
M8.K1	++	Dot	–	+	+	+ (510)	+
M8.N2	+++	Dot	–	+	+	+ (500)	+
M8.V1	–	Dot	–	++	+	+ (520)	+
M8.G2	+++	Dot	–	++	+	+ (520)	+
M8.K1W	+	Dot	–	+++	+	+ (510)	+
M8.K1N2W	++	Dot	–	+++	+	+ (525)	+
M8.L1	+++	Dot	–	++	++	+ (510)	+
M8.W	+++	Dot	–	++	+	+ (510)	+
M8.K1N4W	++	Dot	–	+++	+	+ (520)	+
WT.Y2L2V2DK2R	+	Mix	±	+	+++	+ (505)	+
WT.Y1TY2K2	±	Dot	–	+	+	+ (505)	+
WT.Y1V2	+	Ring/dot	+	±	+	– (487)	+
WT.YIY2V2	++	Ring/dot	+	+++	+	+ (515)	+
Random coils/β-turns							
WT.MQDR	–	Diffuse/ring/dot	–	–	++	– (487)	+
WT.K2R	–	Ring	+++	–	+++	– (485)	+
M8.N1	–	Dot/diffuse	++	–	+++	– (487)	+
WT.DR	–	Ring	+++	–	+	+ (505)	+
M8.N3	–	Dot	+	–	±	– (485)	+
M8.N3G2	–	Dot/diffuse	+	–	+	– (485)	+
M8.K1N3	–	Dot/diffuse	+	–	++	– (485)	+
WT.K2	–	Ring	++	–	–	– (490)	+
M8.G1	–	Dot	+	–	–	– (485)	+

[a] A_{405} represents the turbidity of aggregates at $\lambda = 405$ nm, and ThT represents ThT fluorescence after binding to aggregates ($\lambda_{excitation} = 440$ nm and $\lambda_{emission} = 480$ nm). A_{405} and ThT results are fully presented in Fig. 3.

[b] After binding to CR, aggregates may demonstrate a red shift (+) with a maximum peak higher than CR alone at 485 nm (–). CR birefringence (+) of centrifuged aggregates after 72 h of incubation was observed by light microscopy with polarized light as presented in Fig. 4.

Because we found four residues that are crucial for M8 toxicity, we combined some of these mutations in a WT backbone. WT.Y1V2 and WT.Y1Y2 exhibit a clear toxicity when expressed in yeast cells. These three mutations are located in the β3-sheet and in the complementary β1-sheet (Fig. 1a). This led us to hypothesize that these three amino acids in combination are important for toxicity, but they are not sufficient on their own (N226Y, N262Y, and G269V). The fourth residue that is crucial for M8 toxicity (V1 in the WT sequence and L2 in the M8 sequence) has a paradoxical role. When all the other residues are mutated (M8 backbone), toxicity was abolished by the presence of a valine at this position. However, this mutation does not impair toxicity when Y1, Y2, and V2 are present in the WT backbone (WT.Y1Y2, WT.Y1V2, WT.Y1Y2V2, or WT.Y1TY2K2). This observation clearly demonstrates that Y1, Y2, and V2, although responsible for cellular toxicity as M8, do not recapitulate all the properties of M8. The toxicity induced by these mutations (Y1, Y2, and V2) appears to be gradual, with the triple mutant being more toxic than the double mutants. This gradual effect suggests a complementary role in the stabilization of the toxic species and is consistent with the neat dot profile GFP pattern for the triple mutant (as M8) and a mix of dot/ring profiles for the double mutants. This mix of two patterns is found for both toxic and nontoxic mutants and may represent a polymorphism of aggregation.

Toxic mutants display characteristic FTIR antiparallel structural signature

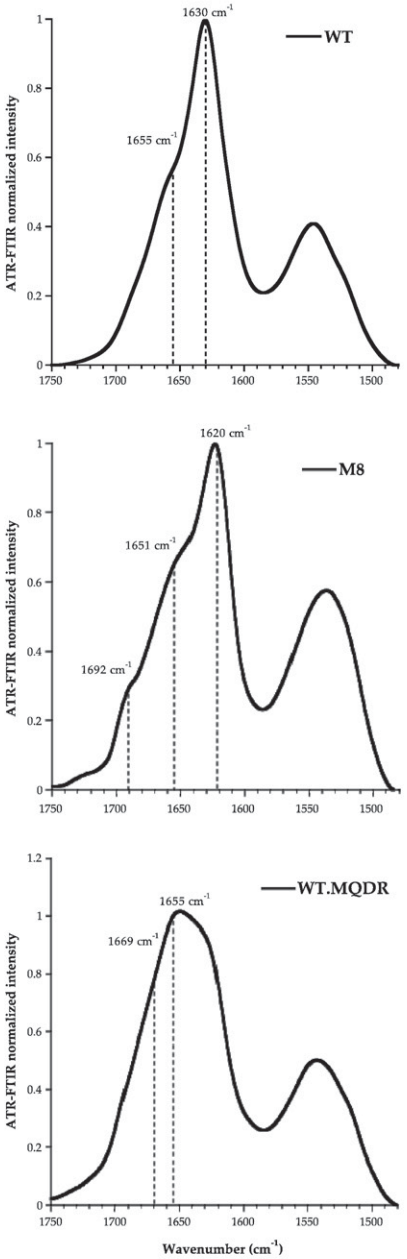
We carried out the purifications to homogeneity of the 39 proteins with a C-terminal histidine tag. Previously, we showed that WT and M8 were completely aggregated after 3 days at 37 °C without agitation.[42] After centrifugation of the aggregates formed with the 39 samples, the secondary structure of each protein was determined using ATR–FTIR. The ATR spectra showed two bands in the range 1450–1750 cm^{-1} (Table 2 and Supplemental Fig. 2). These were an amide I band between 1700 and 1600 cm^{-1} and an amide II band between 1600 and 1500 cm^{-1}. Analyses of the amide I band and deconvolutions were performed as described in Materials and Methods and Supplemental Table 1. The deconvolution procedure was based on two sets of parameters that we previously used for WT and M8,[41] and we applied whichever is the most appropriate to each mutant. Five bands were used to fit all the amide I profiles of the 39 proteins. As known, an amyloid antiparallel β-sheet organization presents two main components in the amide I band: one at low wavenumbers (between 1620 and 1630 cm^{-1}) and the other at higher wavenumbers (around 1680–1690 cm^{-1}) with an intensity ratio (I_{1690}/I_{1620}) from 1/8 to 1/10.[43,44] A parallel β-sheet organization also gives two bands, one at around 1630 cm^{-1}, as observed in WT, and one at 1651 cm^{-1}, which is difficult to distinguish due to the overlap with the random contribution.[45] Therefore, we assigned the amide I bands to four specific secondary elements, β-turns (1669 cm^{-1}), random-coil conformation (1655 cm^{-1}), parallel β-sheets (1630 cm^{-1}), and antiparallel β-sheets (1620/1692 cm^{-1}). The components of each band and the percentage of each structure are presented in Table 2, with standard errors not exceeding 1.5%. Most of our mutants were quite rich in β-sheets (either parallel or antiparallel), but one structural group of nine mutants was clearly different with mainly turns and random coils. We then clustered all of our proteins according to their spectra and their two main structural components (Supplemental Fig. 2). Three groups could be clearly defined: antiparallel β-sheets/random, parallel β-sheets/random, and β-turns/random (Table 2). As expected, WT belongs to the parallel β-sheet group, consistent with its NMR structure,[40] as presented in Fig. 2, and M8 was the archetype of the antiparallel β-sheet group, as previously reported.[41] Both groups, based on *in vitro* properties, exhibit different *in vivo* characteristics. Toxic mutants mainly form a dot structure and *in vitro* exhibit an antiparallel β-sheet signature. In contrast, mutants that belong to the parallel β-sheet group form a ring structure *in vivo* and are harmless (Table 1). The parallel organization of the WT amyloid cannot be changed by a single mutation except for the WT.K2 mutant. This mutant, which is nontoxic, changes an asparagine to a lysine in the β4-strand of the WT structure. In the WT structure, four lysines are present (Fig. 2c). K218 and K284 are in the N-terminal and C-terminal flexible parts, but K229 and K270 are part of the amyloid core and indeed neatly breaking the end of the β1a-sheet and the β3b-sheet (Fig. 2c). These latter two residues are engaged in short-distance pairs of countercharges that could form two salt bridges: K229–E265 and E234–K270 (Supplemental Fig. 1a). In the WT.K2 mutant (K replacing the red N279 in Fig. 2c), K2 is buried in the fiber structure and is obviously causing a break in the β4a-sheet. As a consequence, this mutant dramatically loses its organization and fails to form β-sheets.

When more than one amino acid is changed, the mutant protein can switch to the antiparallel group. The two minimal mutations required (WT.Y1V2) are localized in the β2- and β3-sheets. At this stage, one can conclude that one mutation in the β4-sheet is enough to break the organization of WT, but two mutations are required to obtain the alternative M8 assembly. The reciprocal situation (single mutations in the M8) is also of interest. Three point mutations, Y226N (N1), Y262N (N3), and V269G (G1), are sufficient to completely destabilize M8 antiparallel amyloid organization and abolish toxicity.

Table 2. ATR–FTIR analyses

Proteins	ATR–FTIR relative contributions (%)[a] β-Turns	Random coils	Parallel β-sheets	Antiparallel β-sheets
Parallel β-sheets/random coils				
WT.R	19.1	22.9	58.0	0.0
WT	**12.3**	**26.9**	**53.6**	**7.3**
WT.L2	16.7	32.3	47.3	3.7
WT.M	14.6	35.8	45.7	4.0
WT.T	20.1	30.0	44.9	5.0
WT.Y2	18.5	34.4	44.8	2.2
WT.Q	14.2	35.5	44.8	5.5
WT.D	19.0	31.2	43.6	6.2
WT.V2	13.6	35.0	43.0	8.4
WT.Y1Y2	20.6	24.8	41.7	12.9
WT.Y1	23.0	38.0	29.8	9.2
WT.MY1TQ	27.1	32.1	28.3	12.4
WT.TQ	25.2	36.6	26.0	12.1
WT.Y1T	23.1	37.6	25.5	13.8
WT.MQ	22.2	38.8	24.8	144.2
Antiparallel β-sheets/random coils				
M8.N4	13.7	33.2	8.6	44.5
M8.K1	10.7	35.1	10.7	43.4
M8.N2	12.8	35.1	9.1	43.1
M8.V1	16.3	33.8	7.2	42.7
M8.G2	13.3	36.4	8.3	42.0
M8.K1W	12.4	38.4	7.2	41.9
M8.K1N2W	13.2	37.3	10.6	39.0
M8.L1	14.6	36.6	11.8	37.0
M8	**13.5**	**33.6**	**16.4**	**36.5**
M8.W	15.4	37.7	10.9	35.9
M8.K1N4W	15.0	36.3	13.2	35.5
WT.Y1TY2K2	15.9	34.3	14.9	34.9
WT.Y2L2V2DK2R	21.4	22.6	21.4	34.6
WT.Y1V2	15.9	35.4	14.1	34.6
WT.YIY2V2	14.1	39.1	13.0	33.8
Random coils/β-turns				
WT.MQDR	**19.6**	**46.6**	**14.4**	**19.4**
WT.K2R	26.6	40.3	24.8	8.4
M8.N1	22.6	37.6	17.9	22.0
WT.DR	34.3	36.5	3.2	26.0
M8.N3	31.3	36.2	9.0	23.5
M8.N3G2	32.5	35.6	6.3	25.6
M8.K1N3	33.0	35.0	21.8	10.2
WT.K2	33.1	31.1	16.4	19.4
M8.G1	28.4	28.3	21.6	21.6

Representative type of spectra[b]



[a]Values are presented as decreasing percentages of parallel β-sheets, antiparallel β-sheets, and random coils, respectively, for each structural group.
[b]WT, M8, and WT.MQDR results representative of each group are presented in boldface and as spectra. Spectra of all proteins are clustered in Supplemental Fig. 2 and standard deviations do not exceed 1.5%.

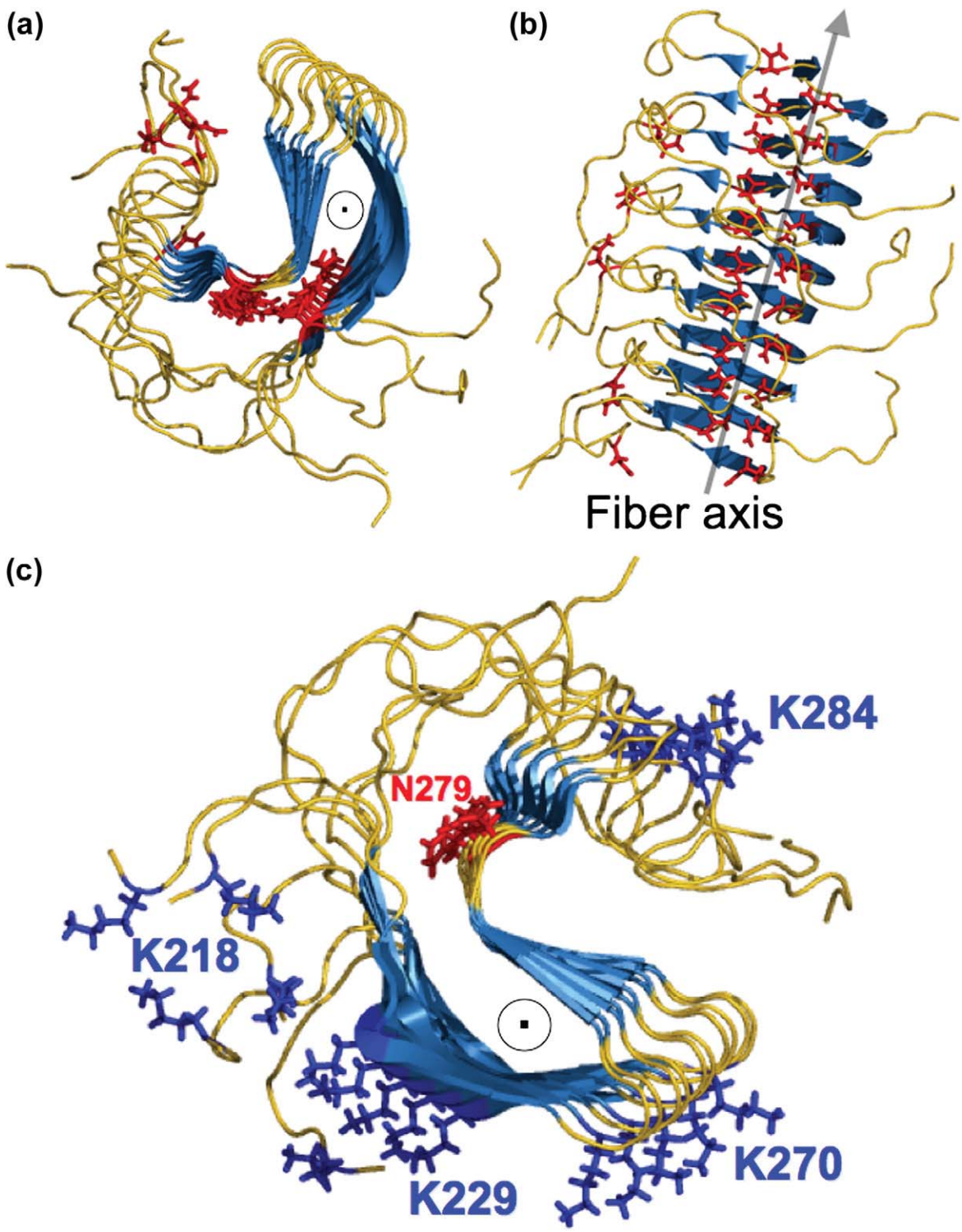


Fig. 2. Representation of HET-s$_{(218–289)}$ amyloid fiber from the pentamer three-dimensional solid-NMR structure (PDB 2RNM). (a) Top view presenting the in-register parallel β-sheets in blue, turns in gold, and asparagines in red. (b) Side view showing that the four asparagines may be involved in a polar zipper that may condition the folding of the fiber. The red ladder of asparagines in the fiber axis can be visualized by their carbon backbone in red. (c) Side view with the four lysines in blue. N279 (N4) mutated in WT.K2 is presented in red. Images were produced using MacPyMOL 2006 (PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC).

Apart from WT.Y1Y2, all of the toxic mutants including M8 were in the group that was rich in antiparallel β-sheets (Table 1). WT.Y1Y2 is the sole exception to the rule that links toxicity measured *in vivo* to the *in vitro* observation of an antiparallel organization. This mutant also exhibits a dot/ring profile (Fig. 1b), suggesting the dual presence of different structures. Two pathways of aggregation may be simultaneously envisaged *in vivo* if the amino acid sequence allows enough plasticity to generate two structures: one that is toxic (the dots) and the other, nontoxic (the rings). *In vitro*, the parallel structure would then be favored. With the variety of structures observed, we raised the question of the amyloid nature of these aggregates. We therefore further analyzed some other amyloid features of the 39 proteins.

Characterization of the aggregates

The first level of characterization is based on the formation of macroscopic aggregates. Turbidity was evaluated by measuring the OD_{405} (optical density at 405 nm) of the aggregates formed after 3 days at 37 °C (Fig. 3a). Toxic mutants show a higher propensity to form turbid suspension. In contrast, 10 mutants were really poor aggregators with an OD_{405} that was six times lower than the OD_{405} of the M8 solution. Interestingly, 9 out of 10 of these mutants were in the random and turn groups (Fig. 3a). We further analyzed the binding of ThT, an amyloid dye. WT-derived mutants interacted weakly with ThT (Fig. 3b). Amazingly, seven of the poor aggregators from the random and turn group displayed a peculiar high affinity to ThT [highlighted with an asterisk (*) in Fig. 3], which contrasted with their non-binding to CR, another amyloid dye (Table 1). WT and M8 had a characteristic red shift in their spectra upon binding to CR (Fig. 4a). This was stronger for M8 and also concomitant with high turbidity. Almost all of the poor aggregators from the random and turn groups did not display immediate binding to CR and red shift (Table 1). All of the other mutants were binding to CR but with varying intensity peaks (Table 1). After 78 h of incubation with CR, we observed some red aggregates for each sample, which all showed birefringence under cross-polarized microscopy (Fig. 4b and c). Even the random-coil mutants that do not immediately bind to CR formed birefringent red aggregates after 3 days, which potentially means an induced structuration by CR binding, as previously shown for M8.[42] Furthermore, rather than just the apple-green classical color, the birefringence of the different mutants (Fig. 4b and c) was visualized on a very broad palette of colors, previously described as "anomalous" colors.[46]

Toxic mutants interact with model membranes

We previously showed that M8 toxicity is related to vesicular trafficking, probably by a direct interaction with the membranes.[47] We then wondered what the behavior of the various types of proteins in the presence of model membranes was. We selected azolectin monolayers as their complex composition could be representative of yeast phospholipid membrane components (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, and sphingolipids[48]). The putative interaction with model lipid monolayers was assessed by ellipsometry (Fig. 5a). The experiments were performed with six proteins representative of the three structural groups defined by the FTIR experiments. Control ellipsometry images of proteins and azolectin alone at the interface are presented in Fig. 5a and b. Both WT and Y1 (corresponding to the nontoxic/parallel group) displayed a weak interaction with the lipid membrane (Fig. 5c). Variations of ellipsometric angles (Δ and Ψ) and thickness of the monolayers are reported in Table 3. WT.K2 and WT.MQDR (corresponding to nontoxic/rich in random coils and turns) showed almost no interaction. In contrast, the toxic amyloids represented by M8 and WT.Y1Y2V2 strongly interacted with the azolectin monolayers. This was also confirmed by the strong variations of ellipsometric angles induced by the variation of the thicknesses of the monolayer presented at the air/lipid interface. In summary, the toxic mutants forming antiparallel amyloids that we studied all interacted strongly with the lipid monolayer, whereas the four nontoxic mutant proteins were unable to disturb this monolayer.

Discussion

In previous studies, we used a yeast expression system to screen for mutant amyloids derived from the harmless amyloid domain of the HET-s prion protein from *P. anserina*. Despite intensive screening, only one artificially generated mutant (M8) showed a toxic phenotype strong enough to allow further characterization. This mutant possesses 10 mutations located all along the primary sequence. Further *in vitro* analysis allowed us to establish biophysical differences between WT and M8 peptides. In this work, we performed systematic directed mutagenesis and compared the *in vivo* and *in vitro* properties of WT-derived mutants with those of M8-derived mutants. We present here the results of this study that compares by various means the 38 mutants generated. The goals of this work were to determine the minimal amino acid substitution required for structural changes and, eventually, to correlate this structural change to any toxic capacity *in vivo*.

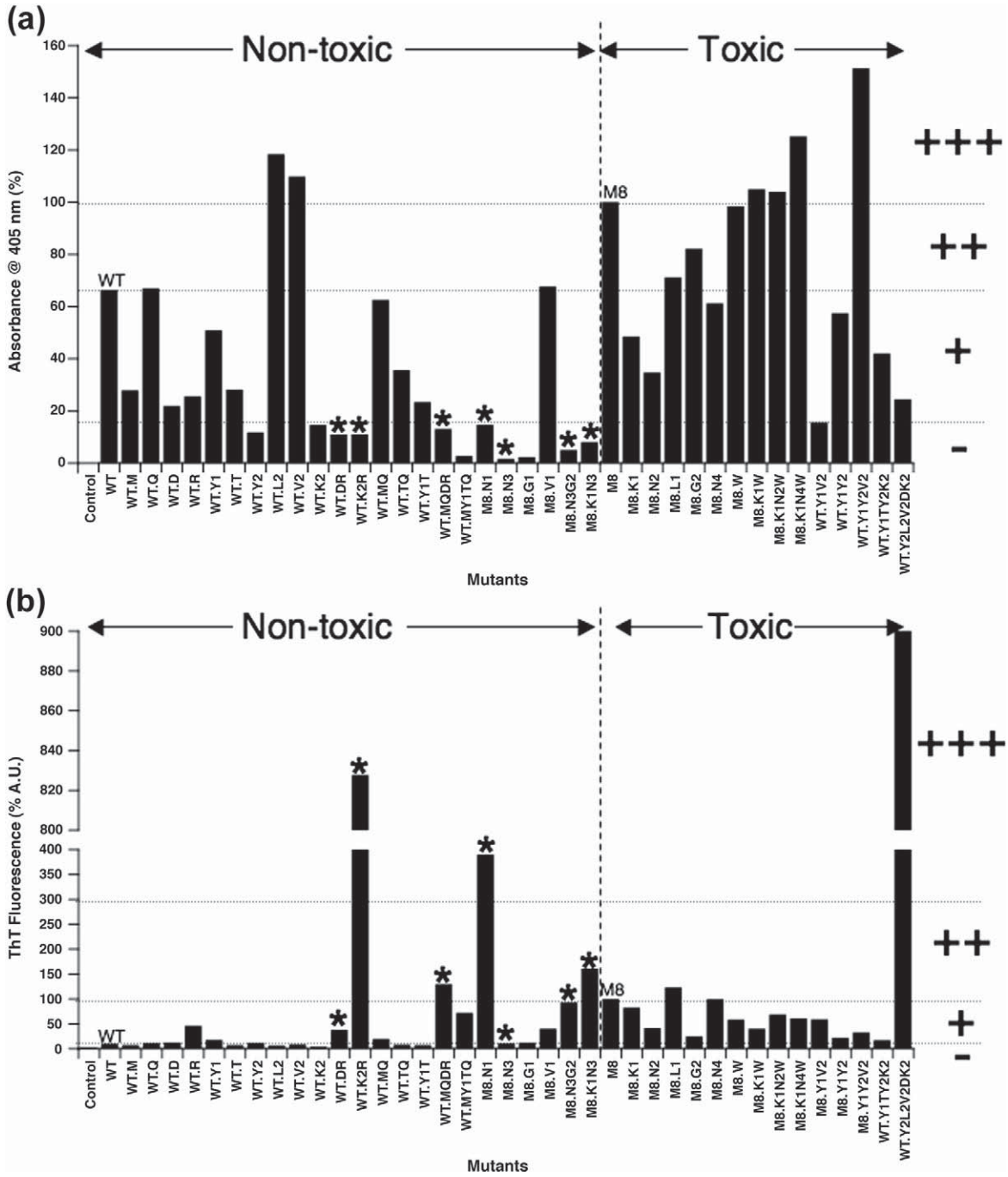


Fig. 3. Turbidity at 405 nm (a) and ThT binding properties (b) of the 38 mutants compared to those of WT. For these experiments, 20-μM proteins were allowed to polymerize at 37 °C for at least 3 days and kept at 4 °C. M8 was taken as the 100% reference. These results represent the sum of three independent measurements made in duplicate with various aggregated samples. As we previously showed, WT fibers formed at pH 7.4 are amyloids with a very weak ThT-binding ability compared to M8 (4). An asterisk (∗) indicates the seven proteins belonging to the main random/turn group (R/T in Supplemental Fig. 2), which can be qualified as poor aggregators but strong ThT binders.

Amyloid domain stability of WT

Apart from the substitution of N by K in WT.K2, no single mutation was sufficient on its own to destabilize the parallel/nontoxic amyloid assembly of the WT organization. The amyloid core of WT is organized into four main in-register parallel β-sheets.[40] As highlighted in Fig. 2a and b, N1, N2,

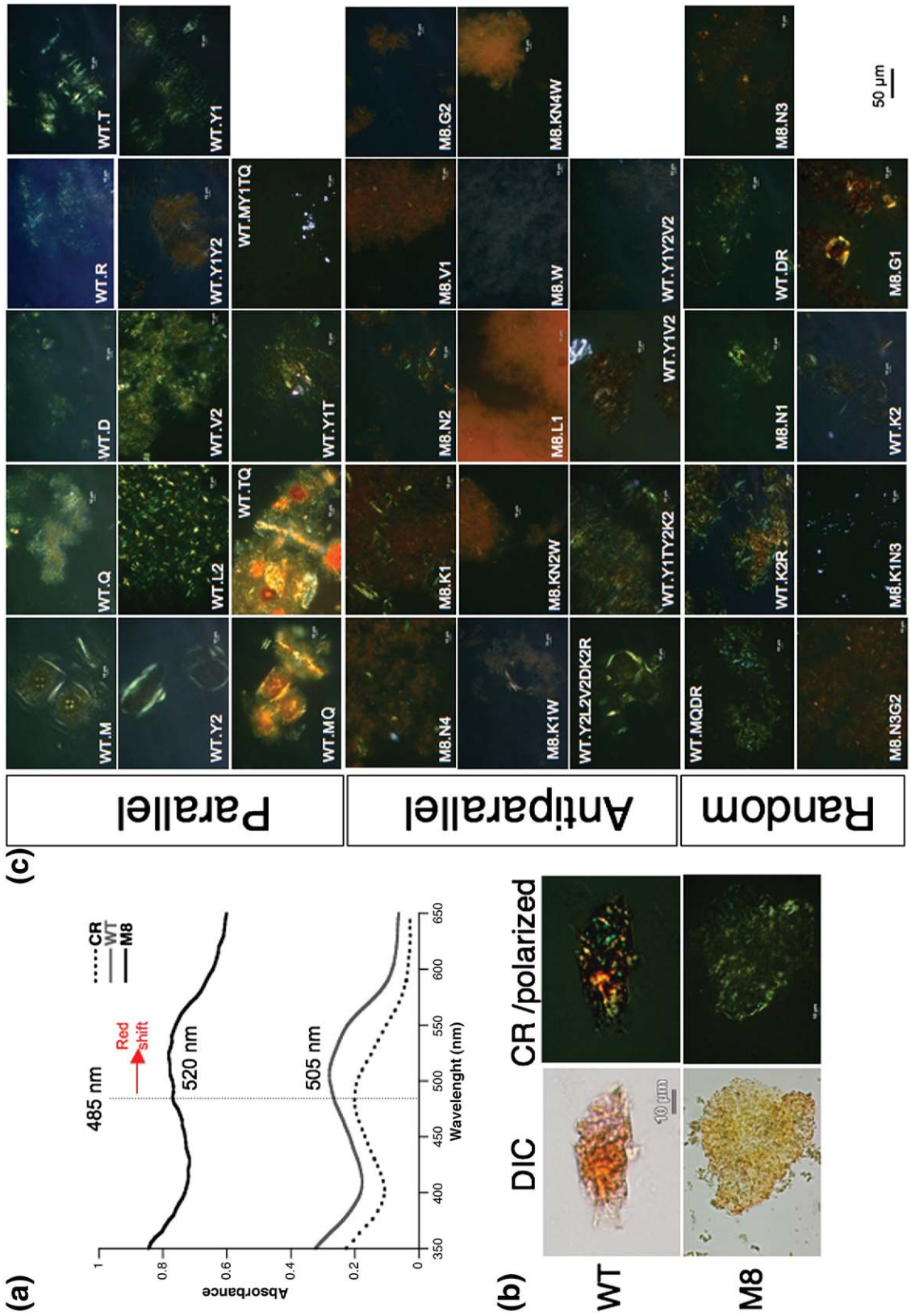


Fig. 4. CR binding capacity and birefringence observed for the 39 peptides. (a) Binding to CR followed by absorbance spectra. A classical red shift is usually observed with amyloids. Thirty-nine spectra of WT and mutants were collected but only WT and M8 are presented. Maximum absorbance peaks for each protein are reported in Table 1. (b) Red staining of aggregates and CR birefringence of centrifuged aggregates after 72 h, observed under light microscope (differential interference contrast) and with polarized light. (c) Birefringence only for the 37 other aggregates clustered by their main structural signature.

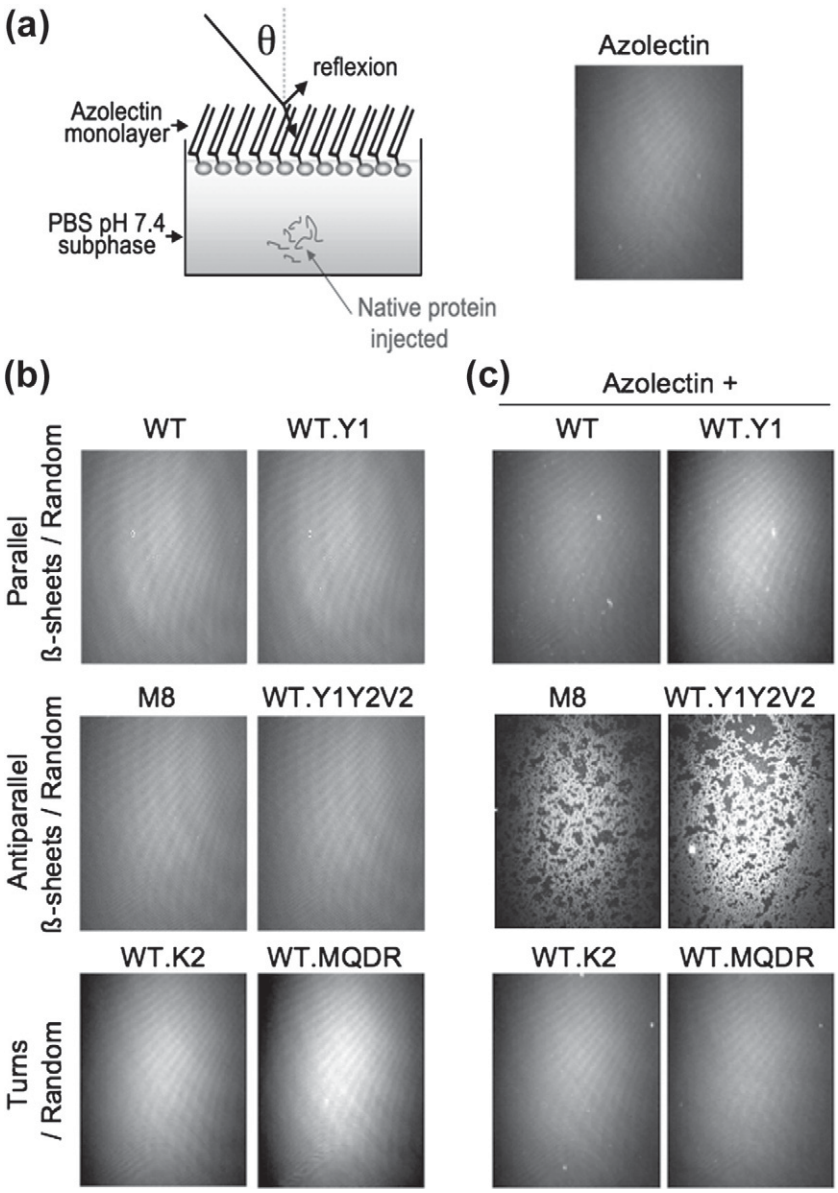


Fig. 5. Interaction of the different proteins representative of each structural group identified by FTIR in the presence of an azolectin Langmuir monolayer. (a) Principle of ellipsometric measurements on a lipid model monolayer. Ellipsometric image of the control monolayer of azolectin alone, before injection of proteins. (b) Proteins were injected at 0.75 μM in PBS, pH 7.4, subphase (control protein alone at the air/water interface). (c) Proteins were then injected at 0.75 μM under a stable azolectin monolayer, in PBS, pH 7.4, subphase (air/lipid interface). Ellipsometric images of stable interfaces are presented after 3 h.

N3, and N4 (in red) seem to be engaged in hydrogen bonds that are susceptible to forming a polar zipper along the axe, which could largely stabilize the fiber. Such amyloid polar zippers involving glutamines and asparagines have already been proposed by Perutz *et al.*[49,50] and are confirmed on the crystal structures of various peptides from prions and other amyloid proteins.[21,22,51] These four asparagines present in WT (N1, N2, N3, and N4) could interact through intra- and inter-hydrogen bonds with their lateral chains (see the Asn red ladder in Fig. 2b). However, interactions between N1 and N3 or those between N2 and N4 alone are not sufficient to explain the stability of WT amyloid. This is because single mutations of N1, N2, or N3 (which will destabilize in each case the asparagine ladders in β1–β3 or β2–β4) do not change the parallel organization of the aggregates. The double mutation in N1 and N3 (WT.Y1Y2) switches the WT structure to an FTIR antiparallel organization. In addition to a complete loss of the Asn ladder consisting of residues N226/N262, the two tyrosines (Y1 and Y2) may disrupt the β-solenoid structure and inhibit the parallel organization of the aggregates.

Differential dye-binding behaviors

The mode of CR and ThT binding to amyloid β-sheets is complex. This work is the first to compare at the same time so many different proteins with CR staining and ThT staining in parallel. The different specificities of ThT and CR binding to amyloids are a matter of debate.[52]

Table 3. Protein interaction with interfaces (air/water and water/lipid), ellipsometric angles, and thickness of the surface layers

	No lipid		Azolectin monolayer[a]	
	$\lvert d\Delta \rvert$ (°)/Ψ (°)[b]	Thickness (Å)[c]	$\lvert d\Delta \rvert$ (°)/Ψ (°)[b]	Thickness (Å)[c]
No protein	NA/NA	NA	5.9±0.8/2.25±0.12	18±2
WT	9.4±0.8/2.37±0.12	33±3	6.7±0.8/2.45±0.12	21±2
WT.Y1	10.6±0.8/2.25±0.12	33±3	10.2±0.8/2.25±0.12	30±2
M8	9.5±0.8/2.37±0.12	33±3	16.0±0.8/2.50±0.12	50±5
WT.Y1Y2V2	11.9±0.8/2.25±0.12	37±3	18.7±0.8/2.25±0.12	59±5
WT.K2	11.9±0.8/2.25±0.12	37±3	10.7±0.8/2.25±0.12	30±3
WT.MQDR	11.5±0.8/2.25±0.12	36±3	8.2±0.8/2.25±0.12	26±2

NA, not applicable.
[a] Azolectin monolayers were formed at a constant pressure of 25 mN m^{-1} and at 25 °C (Fig. 5a). Subphase was made of 1× PBS, pH 7.4. Proteins in HCl, pH 2.0, were injected into the subphase at 0.75 μM.
[b] Ellipsometry angles $\lvert \delta\Delta \rvert$ and Ψ; $\lvert \delta\Delta \rvert = \lvert \Delta - \Delta_0 \rvert$.
[c] Thickness was determined using a mean value of 1.45 for the refractive index. Corresponding ellipsometric images are presented in Fig. 5b (at the air/water interface) and Fig. 5c (with azolectin).

However, we have here clear evidence showing that ThT staining and CR staining differ greatly according to the type of amyloid. When used alone, these stains are therefore not sufficient to quantify and compare amyloid formation. They should be used in concert, as both dyes undeniably do not stain the same structural species. In our case, the FTIR signature (parallel or antiparallel) is not strictly correlated with the binding capacity, although the strongest ThT binding is never observed when amyloids of the parallel β-sheets group are tested. The maximum absorbance of CR may also indicate the presence of antiparallel β-sheet structures because peak values superior to 510 nm have only been reported for antiparallel amyloids. We previously demonstrated that, as usually expected for amyloid proteins, WT polymerization was inhibited by CR.[53] In contrast, M8 random-coil monomers immediately precipitated in an amyloid form in the presence of CR.[42] In the present study, eight mutants from the random/turn group were also able to aggregate in the presence of CR. Indeed, there is recent evidence that CR could also promote β-sheet formation of the Aβ peptide.[54,55] This suggests that the "random group" includes peptides that are prone to form amyloids under particular conditions, although they aggregated very poorly in our standard experiments. Nevertheless, our study shows that toxic amyloid proteins are good aggregators with efficient CR and ThT binding properties.

Is FTIR antiparallel signature correlated with cellular toxicity?

Our clustering is based on an FTIR signature. It is quite clear that these FTIR spectra are not sufficient to assert definitively the molecular organization of the aggregates. Anyway, this analysis allowed us to identify three groups of aggregates. All but one of our toxic mutants assembled into FTIR antiparallel β-sheets group. We have no explanation for this exception, but its presence indicates that this criterion is not an absolute requirement. Interestingly, FTIR spectra of Aβ(1–42) spherical toxic oligomers (40–170 kDa) and Aβ(1–40) oligomers also organize into antiparallel β-sheets, whereas nontoxic fibrils are clearly different.[23,56,57] Indeed, lysozyme may also form fibers toxic towards neuroblastoma cells, which are characterized by less stable non-twisting fibrils with a thicker diameter than nontoxic fibers, and an FTIR antiparallel signature (1620/1692 cm^{-1}).[34] From a pioneering study, the geometry of β-sheets was predicted to have a greater twist for antiparallel sheets.[58] Such structure packing should also favor fibril fragmentation. This would result in the formation of smaller aggregates that would be more deleterious to cell viability, similarly to fragmentized fibrils formed by mechanical treatment.[29] Anyway, this strong but not absolute correlation between FTIR antiparallel signature and cellular toxicity with different amyloid proteins raised the question of the antiparallel FTIR signature as a predictor of amyloid toxicity.

Materials and Methods

Strains, media, and toxicity tests

The yeast strain that was used was BY4742 (*MAT*α *his3*Δ*1 leu2*Δ*0 lys2*Δ*0 ura3*Δ*0 can1–100*). The bacteria used for cloning were *Escherichia coli* DH5α [F^- Φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F), U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (rK^-, mK^+), *pho*A *sup*E44 λ^- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1]. The bacteria used for expression were *E. coli* BL21 Gold (DE3) pLysS {B F^- *omp*T *hsd*S[rB^-, mB^-], *dcm* TetR *gal* λ (DE3) [pLysS CamR]endA Hte}. Yeasts were transformed as previously described,[59]

as were yeast culture conditions and spotting assays (serial 10-fold dilutions).[38] Yeast cells expressing C-terminal GFP fusions were observed under a DMRB microscope (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with a PL APO 63× objective. GFP expression in the yeast spotting assay was evaluated using an Invitrogen Safe Imager™ (Fisher Scientific, Illkirch, France) blue light transilluminator coupled with the VersaDoc Imaging system and Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Cloning and mutagenesis

For *in vivo* experiments, yeast-galactose-inducible plasmids containing the *het-s* prion-forming domain ($PFD_{218–289}$) of WT, M8Nter (WT.MY1TQ), M8Cter (WT.Y2L2V2DK2R), m8PZ (WT.Y1TY2K2), and M8 mutant fused in C-terminal to the GFP were from Couthouis *et al.*,[38] the control empty plasmid pYeHFN2U was from Cullin and Minvielle-Sebastia,[60] and the control GFP alone was from Couthouis *et al.*[38] For cloning in *E. coli* expression vector, WT-6His and M8-6His in pET24a (Novagen-Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK) were obtained from Berthelot *et al.*[41] M8Nter and M8Cter were cloned by exchanging respective WT and M8 sequences cut with BamHI/PvuI in pET24a. The BamHI site is present in the middle of the PFD sequence. Synthetic genes M8.G2, WT.MQDR, and WT.Y1TY2K2 (GenScript, Piscataway, NJ, USA) were digested at their NdeI/HindIII sites and directly cloned into the pET vector. For all of the mutagenesis of the remaining mutants in pET24a, a PCR mutagenesis was performed using oligonucleotides (Eurogentec France, Angers, France) listed in Table 4. Mutagenized PCR products were introduced into pCR2.1 from the Invitrogen TOPO cloning kit (Fisher Scientific) and subcloned into NdeI/HindIII, NdeI/BamHI, or BamHI/HindIII sites of the pET24a vector carrying a C-terminal 6-histidine tag. For cloning into the yeast expression vector pYeHFN2U, a gap repair strategy was preferred. Mutant constructions in pET were PCR amplified using specific oligonucleotides listed in Table 4. These were co-transformed in yeast with WT-GFP yeast vector after linearization by BamHI and a mung-bean nuclease treatment (Promega, Madison, WI, USA).

Prion-forming domain purifications and fiber polymerizations

C-terminal histidine-tagged HET-$s_{(218–289)}$ constructs were purified as previously described.[41] For renaturation, proteins were submitted to gel filtration on HiTrap Sephadex G-25 (GE Healthcare Europe GmbH, Orsay, France) at 4 °C, using 10 mM HCl, pH 2.0, as the eluent. Subsequently, the pH was brought up to 7.4 by adding 1× phosphate-buffered saline (PBS) (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France). Fiber polymerizations and aggregations were performed at 20 μM and were usually considered as complete after 3 days at 37 °C without agitation. They were then kept at 4 °C.

ATR–FTIR spectroscopy

Five microliters of each sample was deposited on a germanium ATR crystal (Specac, Orpington, UK) and left to evaporate in room air. ATR–FTIR spectra were recorded on a Nicolet Nexus 870 FTIR spectrometer equipped with a mercury cadmium telluride detector (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA), with a spectral resolution of 4 cm^{-1} and a one-level zero filling. One hundred interferograms, representing an acquisition time of 3.5 min, were co-added.

Table 4. List of oligonucleotides used for cloning and mutagenesis

Name[a]	Sequence[b]
Cloning in E. coli pET24a vector	
yNdeWT(+)	CTAAATTACCGGA**CATATG**AAGATCGACG
yNdeM8(+)	CTAAATTACCGGA**CATATG**ATGATCGACG
BamHI-WT(+)	**GGATCC**GTATCAGCGACCAGACAACCAACTCGG
BamHI(N3/Y2)(+)	**GGATCC**GTATCAGCGACCAGACAACCTACTCGG
BamHI(V1/L2)(+)	**GATCC**GTATCAGCGACCAGACAACCAACTCGGTAGAGACGGTTTTGGGG
BamHI(G1/V2)(+)	**GGATCC**GTATCAGCGACCAGACAACCAACTCGGTAGAGACGGTTGTGGTGaagg
BamHI-M8G1(+)	**GGATCC**GTATCAGCGACCAGACAACCTACTCGGTAGAGACGGTTTTGGGG
BamHI-M8S(+)	**GGATCC**GTATCAGCGACCAGACAACCTACTCGGTAGAGACGGTTTTGGTGAAGG
BamM8L2/V1(+)	**GGATCC**GTATCAGCGACCAGACAACCTACTCGGTAGAGACGGTTGTGG
M8Nde(M/Y)(+)	**CATATG**ATGATCGACGCGATTGTGGGAAGGTATTCCGCC
M8Nde(M/N1)(+)	**CATATG**ATGATCGACGCGATTGTGGGAAGGAATTCCGCC
WTNde(K/Y1)(+)	**CATATG**aagATCGACGCGATTGTGGGAAGGtatTCCGCC
WTNde(K/N1)(+)	**CATATG**aagATCGACGCGATTGTGGGAAGGaatTCCGCC
WTHindGFP(−)	CTTCACCTTT**AAGCTT**ATTATCCCAGAACCCC
M8HindGFP(−)	CTTCACCTTT**AAGCTT**ATTATCCCGGAACCCC
M8Hind(K2/N4)(−)	**AAGCTT**ATTATCCCGGAACCCCTTACCTCCGTACTCATTTCC
Cloning in yeast pGAL vector[c]	
pGalWT(+)	CACAAATACACACACTAAATTACCGGATCTATGATGATCGACGCG
pGalM8(+)	CACAAATACACACACTAAATTACCGGATCTATGAAGATCGACGCG
WTGFP(−)	CCAGTGAATAATTCTTCACCTTTAGACATATTATCCCGGAACCC
M8GFP(−)	CCAGTGAATAATTCTTCACCTTTAGACATATTATCCCAGAACCC

[a] Oligonucleotides are used with forward (+) and reverse (−) orientations.
[b] Sequences are expressed in 5′-to-3′ direction. Restriction sites are in boldface, and mutations are underlined.
[c] Yeast-galactose-inducible plasmids used in this study are from Refs. 41, 42, and 47.

For clarity, the maximum absorbance for the amide I band for all spectra shown has been normalized to the same value. The resulting spectra were analyzed with an algorithm based on a second-derivative function (OMNIC software, Thermo Fisher Scientific) and a self-deconvolution procedure (GRAMS software, Thermo Fisher Scientific) to determine the number and wave-number of individual bands within the spectral range 1485–1750 cm^{-1}. The amide I band of each spectrum could be fitted by five bands assigned to the vibration of amide I involved in four different secondary structures. Vibrational assignments of the infrared band components in the amide I region were made according to Goormaghtigh *et al.*[43] The deconvolution procedure was based on two sets of parameters that we previously used for WT and M8 presented in Supplemental Table 1, and we applied whichever is the most appropriate to each mutant. The groups "parallel" and "random" were fitted with the WT set, whereas the "antiparallel" group was fitted with the M8 set. The fit for all spectra was obtained with a mixed Lorentzian (70%)–Gaussian (30%) band profile and width at half-height included between 15% and 45%. The relative contributions of the different bands were determined from the fit results obtained for the amide I band. The amount of each secondary-structure element is given as a percentage (Table 2) and is arrived at by dividing the integral intensity of one amide I band component by the total intensity of all amide I band components. The standard error does not exceed 1.5%. For all spectra, fit results correspond to a local minimum at the end of the iteration procedure.

Turbidity and amyloid dye-binding properties

To compare the 39 different aggregates (200 μl in duplicate) at the same time, we used a POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France). Data were collected at 405 nm, and ThT (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used at a concentration of 10 μM with $\lambda_{excitation}$ at 440 nm and $\lambda_{emission}$ at 480 nm. A 20-μM solution of CR (C.I. 22120; Sigma) in PBS, pH 7.4, was prepared (extinction coefficient at 498 nm, $\sim 3.7 \times 10^4$ M^{-1} cm^{-1}) and filtered through a 0. 22-μm polyether sulfone filter. Absorbance spectra with CR (5 μl for 100-μl aggregates at 20 μM) were collected for all mutants; red shift and respective displacement peaks were extracted with the MARS Data Analysis Software 2.10 R3 (BMG Labtech). For microscopic observations of CR staining after 72 h, stained aggregates were centrifuged at 20,000*g* for 10 min and spread dried on microscope slides. CR binding and birefringence were examined with an ECLIPSE E600FN microscope (Nikon Instruments Europe, Amstelveen, The Netherlands) with a PlanFluor 40× objective and a DXM1200 digital camera (Nikon Instruments Europe) equipped with optimally aligned cross-polarizers.

Ellipsometry images and measurements

Adsorption experiments were performed at 25 ± 1 °C on a circular Teflon trough (20.4 cm^2). The surface pressure (π) was measured with a plate of Whatman filter paper held by a Nima Wilhelmy balance. The trough was filled with 8 ml of 1× PBS buffer (pH 7.4). The surface tension of the water was measured at 72.8 mN m^{-1}. The interaction of proteins with lipid films was performed in two steps. First, a homogeneous Langmuir monolayer of azolectin (Sigma) was formed by spreading an azolectin/chloroform/methanol solution (0.2 mg/ml; 80%/20% v/v) at the air/water interface to finally reach a constant surface pressure of 25 mN m^{-1}. Second, freshly desalted proteins in 10 mM HCl, pH 2.0, were injected at a concentration of 0.75 μM into the subphase and stirred. The surface pressure was continuously monitored. Images were obtained with an NFT IElli2000 ellipsometer (NFT, Göttingen, Germany) equipped with a double-frequency Nd–Yag laser (532 nm, 50 mW), a polarizer, an analyzer, and a CCD camera. The film morphology at the interface was observed by the CCD camera. An incidence angle of 54.58°, which gives the null conditions, was used. All images were corrected from the tilt angle observation. The spatial resolution was about 2 μm, and the image size was 450 × 670 μm, with a 10× magnification lens. Thickness was determined using a mean value of 1.45 for the refractive index.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.jmb.2011.07.009

Acknowledgements

Thanks to Alex Edelman for English proofreading and Dr. Fanny Boissier for assistance with and pieces of advice regarding Fig. 2. We are grateful to Dr Reiko Oda for kindly allowing us access to her polarized microscope and Dr. Michel Laguerre for valuable discussions. This work was supported by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (Programme Interdisciplinaire 2009—Interface Physique Chimie Biologie: Soutien à la prise de Risque). K.B. acknowledges the Conseil Régional d'Aquitaine and the Agence Nationale Pour l'Emploi for financial support.

References

1. Chiti, F. & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333–366.
2. Hammer, N. D., Schmidt, J. C. & Chapman, M. R. (2007). The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 12494–12499.
3. Romero, D., Aguilar, C., Losick, R. & Kolter, R. (2010). Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 2230–2234.
4. Kenney, J. M., Knight, D., Wise, M. J. & Vollrath, F. (2002). Amyloidogenic nature of spider silk. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4159–4163.
5. Kwan, A. H., Winefield, R. D., Sunde, M., Matthews, J. M., Haverkamp, R. G., Templeton, M. D. & Mackay, J. P. (2006). Structural basis for rodlet

assembly in fungal hydrophobins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 3621–3626.
6. Ramsook, C. B., Tan, C., Garcia, M. C., Fung, R., Soybelman, G., Henry, R. *et al.* (2010). Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences. *Eukaryot. Cell*, **9**, 393–404.
7. Iconomidou, V. A., Vriend, G. & Hamodrakas, S. J. (2000). Amyloids protect the silkmoth oocyte and embryo. *FEBS Lett.* **479**, 141–145.
8. Podrabsky, J. E., Carpenter, J. F. & Hand, S. C. (2001). Survival of water stress in annual fish embryos: dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers. *Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.* **280**, R123–R131.
9. McGlinchey, R. P., Shewmaker, F., McPhie, P., Monterroso, B., Thurber, K. & Wickner, R. B. (2009). The repeat domain of the melanosome fibril protein Pmel17 forms the amyloid core promoting melanin synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 13731–13736.
10. Kranenburg, O., Bouma, B., Kroon-Batenburg, L. M., Reijerkerk, A., Wu, Y. P., Voest, E. E. & Gebbink, M. F. (2002). Tissue-type plasminogen activator is a multi-ligand cross-beta structure receptor. *Curr. Biol.* **12**, 1833–1839.
11. Gebbink, M. F., Voest, E. E. & Reijerkerk, A. (2004). Do antiangiogenic protein fragments have amyloid properties? *Blood*, **104**, 1601–1605.
12. Münch, J., Rücker, E., Ständker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M. *et al.* (2007). Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell*, **131**, 1059–1071.
13. Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B. *et al.* (2010). The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One*, **5**, e9505.
14. Maji, S. K., Perrin, M. H., Sawaya, M. R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R. A. *et al.* (2009). Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science*, **325**, 328–332.
15. Fändrich, M., Fletcher, M. A. & Dobson, C. M. (2001). Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature*, **410**, 165–166.
16. Holm, N. K., Jespersen, S. K., Thomassen, L. V., Wolff, T. Y., Sehgal, P., Thomsen, L. A. *et al.* (2007). Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1774**, 1128–1138.
17. Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G. & Dobson, C. M. (1999). Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 3590–3594.
18. Zhao, H., Tuominen, E. K. & Kinnunen, P. K. (2004). Formation of amyloid fibers triggered by phosphatidylserine-containing membranes. *Biochemistry*, **43**, 10302–10307.
19. Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W. & Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, **300**, 486–489.
20. Maji, S. K., Wang, L., Greenwald, J. & Riek, R. (2009). Structure–activity relationship of amyloid fibrils. *FEBS Lett.* **583**, 2610–2617.
21. Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. Ø., Riekel, C., Grothe, R. & Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, **435**, 773–778.
22. Sawaya, M. R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M. I., Sievers, S. A., Apostol, M. I. *et al.* (2007). Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature*, **447**, 453–457.
23. Cerf, E., Sarroukh, R., Tamamizu-Kato, S., Breydo, L., Derclaye, S., Dufrêne, Y. F. *et al.* (2009). Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide. *Biochem. J.* **421**, 415–423.
24. Antzutkin, O. N., Balbach, J. J., Leapman, R. D., Rizzo, N. W., Reed, J. & Tycko, R. (2000). Multiple quantum solid-state NMR indicates a parallel, not antiparallel, organization of beta-sheets in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 13045–13050.
25. Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J. *et al.* (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, **416**, 507–511.
26. Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J. & Ashe, K. H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* **8**, 79–84.
27. Kayed, R., Pensalfini, A., Margol, L., Sokolov, Y., Sarsoza, F., Head, E. *et al.* (2009). Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J. Biol. Chem.* **284**, 4230–4237.
28. Petkova, A. T., Leapman, R. D., Guo, Z., Yau, W. M., Mattson, M. P. & Tycko, R. (2005). Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science*, **307**, 262–265.
29. Xue, W. F., Hellewell, A. L., Gosal, W. S., Homans, S. W., Hewitt, E. W. & Radford, S. E. (2009). Fibril fragmentation enhances amyloid cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **284**, 34272–34282.
30. Lashuel, H. A., Hartley, D., Petre, B. M., Walz, T. & Lansbury, P. T. (2002). Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*, **418**, 291.
31. Quist, A., Doudevski, I., Lin, H., Azimova, R., Ng, D., Frangione, B. *et al.* (2005). Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 10427–10432.
32. Gharibyan, A. L., Zamotin, V., Yanamandra, K., Moskaleva, O. S., Margulis, B. A., Kostanyan, I. A. & Morozova-Roche, L. A. (2007). Lysozyme amyloid oligomers and fibrils induce cellular death via different apoptotic/necrotic pathways. *J. Mol. Biol.* **365**, 1337–1349.
33. Meyer-Luehmann, M., Spires-Jones, T. L., Prada, C., Garcia-Alloza, M., de Calignon, A., Rozkalne, A. *et al.* (2008). Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, **451**, 720–724.
34. Mossuto, M. F., Dhulesia, A., Devlin, G., Frare, E., Kumita, J. R., de Laureto, P. P. *et al.* (2010). The non-core regions of human lysozyme amyloid fibrils give rise to cytotoxicity. *J. Mol. Biol.* **402**, 783–796.
35. Engel, M. F., Khemtémourian, L., Kleijer, C. C., Meeldijk, H. J., Jacobs, J., Verkleij, A. J. *et al.* (2008).

Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 6033–6038.
36. Kayed, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T. M., Milton, S. C., Hall, J. E. & Glabe, C. G. (2004). Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J. Biol. Chem.* **279**, 46363–46366.
37. Martins, I. C., Kuperstein, I., Wilkinson, H., Maes, E., Vanbrabant, M., Jonckheere, W. *et al.* (2008). Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J.* **27**, 224–233.
38. Couthouis, J., Rébora, K., Immel, F., Berthelot, K., Castroviejo, M. & Cullin, C. (2009). Screening for toxic amyloid in yeast exemplifies the role of alternative pathway responsible for cytotoxicity. *PLoS One*, **4**, e4539.
39. Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S. & Begueret, J. (1997). The protein product of the *het-s* heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 9773–9778.
40. Wasmer, C., Lange, A., Van Melckebeke, H., Siemer, A. B., Riek, R. & Meier, B. H. (2008). Amyloid fibrils of the HET-s(218–289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science*, **319**, 1523–1526.
41. Berthelot, K., Immel, F., Géan, J., Lecomte, S., Oda, R., Kauffmann, B. & Cullin, C. (2009). Driving amyloid toxicity in a yeast model by structural changes: a molecular approach. *FASEB J.* **23**, 2254–2263.
42. Berthelot, K., Lecomte, S., Géan, J., Immel, F. & Cullin, C. (2010). A yeast toxic mutant of HET-s(218–289) prion displays alternative intermediates of amyloidogenesis. *Biophys. J.* **99**, 1239–1246.
43. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. & Ruysschaert, J. M. (1994). Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds. *Subcell. Biochem.* **23**, 329–362.
44. Chirgadze, Y. N. & Nevskaya, N. A. (1976). Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the antiparallel-chain pleated sheet. *Biopolymers*, **15**, 607–625.
45. Chirgadze, Y. N. & Nevskaya, N. A. (1976). Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the parallel-chain pleated sheet. *Biopolymers*, **15**, 627–636.
46. Howie, A. J. & Brewer, D. B. (2009). Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms. *Micron*, **40**, 285–301.
47. Couthouis, J., Marchal, C., D'Angelo, F., Berthelot, K. & Cullin, C. (2010). The toxicity of an "artificial" amyloid is related to how it interacts with membranes. *Prion*, **4**, 283–291.
48. van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. & Konings, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **59**, 304–322.
49. Perutz, M. F., Pope, B. J., Owen, D., Wanker, E. E. & Scherzinger, E. (2002). Aggregation of proteins with expanded glutamine and alanine repeats of the glutamine-rich and asparagine-rich domains of Sup35 and of the amyloid beta-peptide of amyloid plaques. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 5596–5600.
50. Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M. & Finch, J. T. (1994). Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 5355–5358.
51. Wiltzius, J. J., Sievers, S. A., Sawaya, M. R., Cascio, D., Popov, D., Riekel, C. & Eisenberg, D. (2008). Atomic structure of the cross-beta spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein Sci.* **17**, 1467–1474.
52. Fernandez-Flores, A. (2010). A review of amyloid staining: methods and artifacts. *Biotech. Histochem.* doi:10.3109/10520291003784493.
53. Lorenzo, A. & Yankner, B. A. (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 12243–12247.
54. Lendel, C., Bolognesi, B., Wahlström, A., Dobson, C. M. & Gräslund, A. (2010). Detergent-like interaction of Congo red with the amyloid beta peptide. *Biochemistry*, **49**, 1358–1360.
55. Bose, P. P., Chatterjee, U., Xie, L., Johansson, J., Göthelid, E. & Arvidsson, P. I. (2010). Effects of Congo red on Abeta1–40 fibril formation process and morphology. *ACS Chem. Neurosci.* **1**, 315–324.
56. Habicht, G., Haupt, C., Friedrich, R. P., Hortschansky, P., Sachse, C., Meinhardt, J. *et al.* (2007). Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Abeta protofibrils. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 19232–19237.
57. Sarroukh, R., Cerf, E., Derclaye, S., Dufrêne, Y. F., Goormaghtigh, E., Ruysschaert, J. M. & Raussens, V. (2011). Transformation of amyloid β(1–40) oligomers into fibrils is characterized by a major change in secondary structure. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 1429–1438.
58. Chou, K. C., Pottle, M., Némethy, G., Ueda, Y. & Scheraga, H. A. (1982). Structure of beta-sheets. Origin of the right-handed twist and of the increased stability of antiparallel over parallel sheets. *J. Mol. Biol.* **162**, 89–112.
59. Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. & Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355–360.
60. Cullin, C. & Minvielle-Sebastia, L. (1994). Multipurpose vectors designed for the fast generation of N- or C-terminal epitope-tagged proteins. *Yeast*, **10**, 105–112.

Chapitre III.

Interactions des protéines amyloïdes WT et M8 avec différents modèles de bicouches lipidiques

Table des matières

Chapitre III : Interactions des protéines amyloïdes WT et M8 avec différents modèles de bicouches lipidiques 129

I. Introduction **131**

II. Interactions des protéines WT et M8 avec les liposomes **131**

III. Interaction des protéines WT et M8 avec les bicouches supportées de lipides - Etude par PWR **135**

III.1. Formation des bicouches supportées à la surface du cristal PWR 136

III.2. Adsorption des protéines WT et M8 sur les bicouches lipidiques 137

III.2.1. Interactions des protéines avec la bicouche de DOPC 138

III.2.2. Interactions des protéines avec la bicouche d'asolectine 141

III.2.3. Interactions des protéines avec la bicouche de eggPC/DOPG 147

IV. Structure secondaire des protéines amyloïdes WT et M8 en interaction avec les bicouches lipidiques - Etude par ATR-FTIR **148**

IV.1. Structure secondaire des protéines WT et M8 en interaction avec les liposomes d'asolectine 148

IV.2. Structure secondaire des protéines WT et M8 en interaction avec les bicouches lipidiques supportées 151

IV.3. Effets des protéines sur des bicouches lipidiques supportées 156

IV.4. Interactions des fibres matures des protéines WT et M8 avec des bicouches supportées 157

V. Conclusions du chapitre **158**

Bibliographie **160**

I. Introduction

Les résultats précédents ont montré que les protéines WT et M8 s'adsorbent et/ou s'insèrent sur/dans des monocouches de différents lipides. Particulièrement, la protéine toxique M8 a des interactions très fortes et spécifiques vis-à-vis des monocouches chargées négativement. D'ailleurs, nous avons pu établir qu'en effet, l'interface air-eau modifie la structure de la protéine WT.

Dans cette partie, nous voulons comparer les effets des protéines amyloïdes toxique (M8) et non toxique (WT) sur des membranes modèles de type bicouches, plus proches des membranes cellulaires afin de mieux comprendre la raison de la toxicité *in vivo* de la protéine M8.

Dans un premier temps, nous avons étudié par spectroscopie de fluorescence l'effet des protéines sur l'intégrité des membranes. L'accélération de l'agrégation des protéines WT et M8 induite par les liposomes lipidiques est visualisée par images optiques. Nous avons ensuite étudié, à l'aide de la spectroscopie PWR (Plasmon-Waveguide Resonance), l'adsorption des protéines sur des bicouches modèles et leurs effets sur les membranes. Enfin, nous avons déterminé la structure secondaire et l'orientation des protéines dans ces assemblages complexes avec les bicouches lipidiques par la spectroscopie ATR-FTIR polarisée.

II. Interactions des protéines WT et M8 avec les liposomes

La capacité des protéines WT et M8 à perméabiliser les membranes a été déterminée sur des systèmes modèles de membrane biologique : des liposomes encapsulant un marqueur fluorescent, la calcéine. Les liposomes utilisés sont des vésicules unilamellaires (LUV, Large Unilamellar Vesicles), d'environ 130-160 nm de diamètre. Plusieurs compositions lipidiques ont été étudiées afin d'évaluer l'influence de la charge : DOPG (100% anionique), asolectine (41% anioniques) et DOPC (zwitterionique). Les protocoles de formation des liposomes et de la méthode de détection par fluorescence sont décrits dans la partie Matériels et Méthodes (**Annexe I.1.1**, page 194 et **Annexe II.4**, page 213).

La **Figure III - 1** présente la perméabilisation des différentes membranes induite par les protéines WT et M8 au cours de leur fibrillation lors qu'elles sont ajoutées aux liposomes sous formes monomères à la concentration de 7,5 µM. Après 90 minutes d'incubation, la protéine M8 induit la perméabilisation de 80% des LUV de DOPG, ~50% des LUV d'asolectine et moins de 10% des LUV de DOPC. Le WT n'induit qu'environ 30% de perméabilisation des LUV de DOPG et d'asolectine, et similairement à M8 avec moins de 10% de perméabilisation des liposomes de DOPC. Ces résultats montrent une fois de plus que

la contribution électrostatique est importante dans les interactions des protéines WT et M8 avec les membranes modèles. De plus, la perturbation causée par la protéine toxique M8 sur les liposomes est toujours plus importante que celle induite par la protéine sauvage WT.

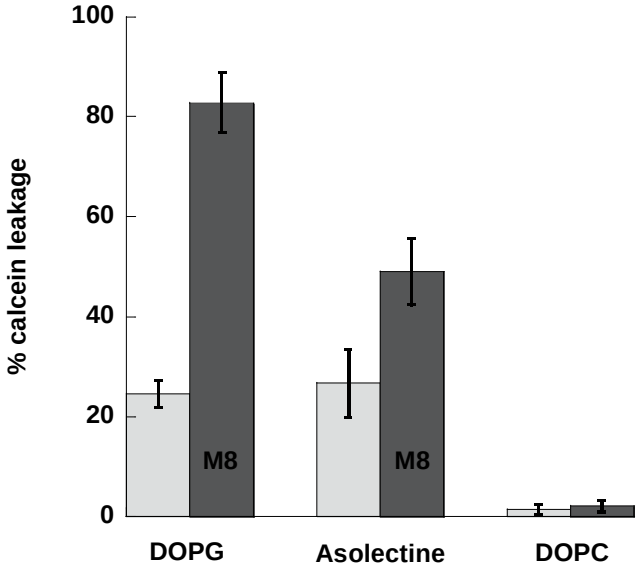


Figure III - 1: Pourcentage de calcéine libérée pour des liposomes de DOPG, d'asolectine et de DOPC induite par WT (gris) ou M8 (gris foncé) à 7,5 µM après 90 minutes d'incubation à 25°C. La concentration des lipides est de 30 µM. Les protéines à l'état de monomères (à pH 2) sont ajoutées aux LUV contenant de la calcéine dans un tampon Tris (TBS) à pH 7,4. Le 100% d'externalisation de la calcéine est déterminé par l'addition de 5 µL Triton à 1 µM dans les mélanges d'interaction.

En parallèle avec ces expériences, les protéines WT et M8 sont incubées avec des liposomes d'asolectine et de DOPG dans les cuves en quartz pour visualiser leurs agrégations. (les liposomes contiennent de la calcéine comme dans l'expérience de fluorescence). La **Figure III - 2** présente les résultats obtenus après 6 heures d'incubation.

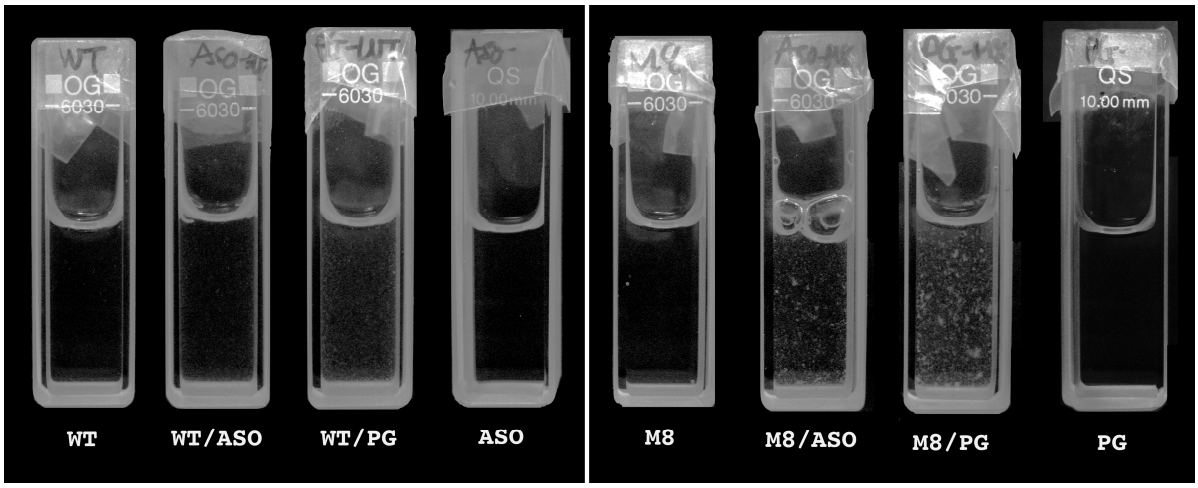


Figure III - 2: Photos des solutions des protéines WT et M8 en absence et en présence des liposomes d'asolectine et de DOPG après 6 heures d'incubation. La concentration des lipides est de 30 µM et des protéines est de 7,5 µM. Les expériences ont été effectuées dans un tampon TBS à pH 7,4 à 25 °C sous agitation de 300 rpm.

Ces résultats montrent que pour les deux protéines, l'agrégation est plus forte en présence de liposomes et qu'elle est également plus forte en interaction avec les liposomes de DOPG qu'avec les liposomes d'asolectine. Si l'on compare les deux protéines pour chaque type de lipide, la quantité d'agrégats formés dans le cas du M8 semble toujours plus grande que dans le cas de WT.

L'interaction des protéines WT et M8 avec les LUV d'asolectine en fonction du rapport protéine/lipide a également été étudiée. Différentes concentrations de protéines de 0,2 µM à 12,5 µM ont été testées. La concentration de lipides a été fixée à 30 µM. Les cinétiques de libération de la calcéine sont indiquées par l'augmentation de la fluorescence de la solution (**Figure III - 3**).

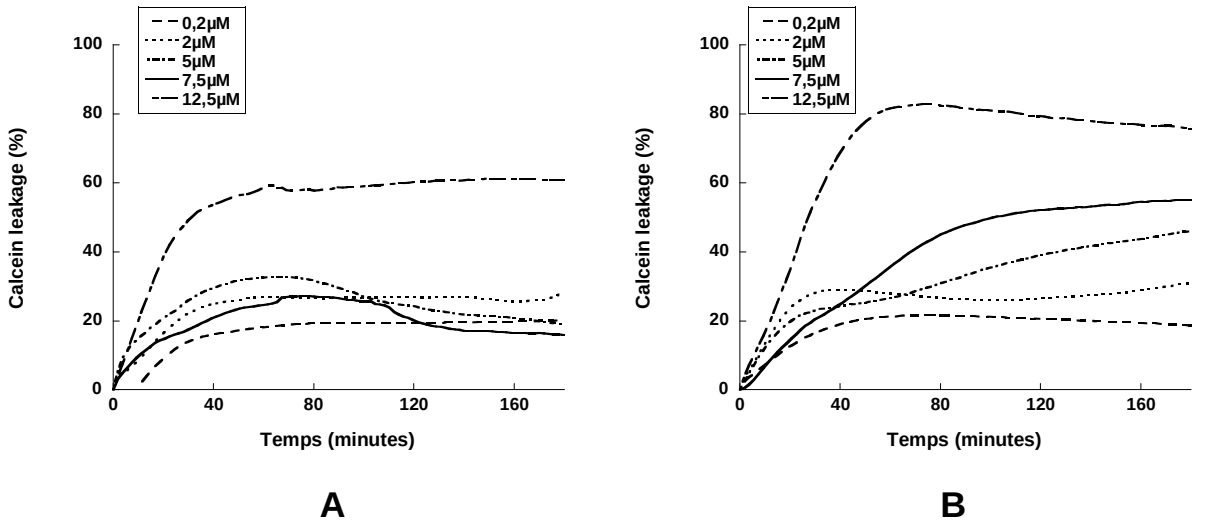


Figure III - 3: Cinétique de relargage de la calcéine dans la solution causé par WT (A) ou M8 (B) pour différentes concentrations de monomères injectées: 0,2 ; 2; 5; 7,5; 12,5 µM. Les protéines sont ajoutées dans les suspensions de liposomes d'asolectine à 30 µM dans un tampon TBS (pH = 7,4, 25 ± 1 °C) au temps zéro. Le 100% d'externalisation de la calcéine est déterminé par l'addition de 5 µL de Triton à 1 µM dans les mélanges d'interaction.

Ces résultats montrent que dans la gamme de concentration étudiée, la perméabilisation des liposomes d'asolectine est dépendante de la concentration en protéine introduite (WT et M8). A 0,2 µM, l'effet est comparable pour WT et M8 mais on observe un retard sur l'effet causé par WT en comparaison de celui causé par M8 (**Figure III - 3**, - - - -, WT et M8). M8 présente une plus forte affinité pour les liposomes. Pour une concentration à 2 µM, les effets des deux protéines sont similaires et on n'observe plus de retard dans l'effet du WT. A des concentrations plus fortes (≥ 5 µM), les effets du M8 sont toujours plus importants que ceux du WT à la même concentration. Le taux maximum de libération de la calcéine est de 80% pour M8 et 60% pour WT.

Nous avons également étudié l'interaction des fibres de WT et M8 avec des liposomes lipidiques afin de discriminer quelle(s) forme(s) d'agrégats interagit (interagissent) avec les

membranes. L'effet de perméabilisation des fibres n'est pas significatif (<10%) (par rapport au contrôle). Ces résultats sont en accord avec plusieurs études précédentes indiquant la faible toxicité des amyloïdes sous formes de fibres *in vivo* et *in vitro* (Stefani and Dobson 2003).

Comme la toxicité des oligomères est généralement acceptée (Stefani and Dobson 2003; Haass and Selkoe 2007) et que des agrégats formés par sonication des fibres amyloïdes de différents protéines comme Aβ, PrP … ont été montrés toxiques (Pastor et al. 2008), nous avons testé l'interaction avec les membranes de fragments soniqués de fibres matures de WT et M8. Ces fibres sont formées à 37 °C dans du PBS 1X à pH 7,4, à 20 µM au moins un mois avant l'expérience de sonication.

La **Figure III - 4** montre l'interaction des fragments (obtenus par sonication 30 minutes des fibres matures dans un bain à sonication) avec les LUV de DOPG. On observe un faible effet de perméabilisation dans le cas des fragments de fibres de WT par rapport à ceux de M8. Même à 10 µM – la concentration maximale testée, moins de 10% de liposomes sont perméabilisés par les fragments de WT après trois heures d'incubation à 25°C (**Figure III - 4 A**). Au contraire, l'effet des fragments de M8 est significatif. L'effet est dépendant de la concentration en monomère de protéines. A une concentration de 10 µM en M8, les fragments perméabilisent jusqu'à 70% de liposomes de DOPG (**Figure III - 4 B**).

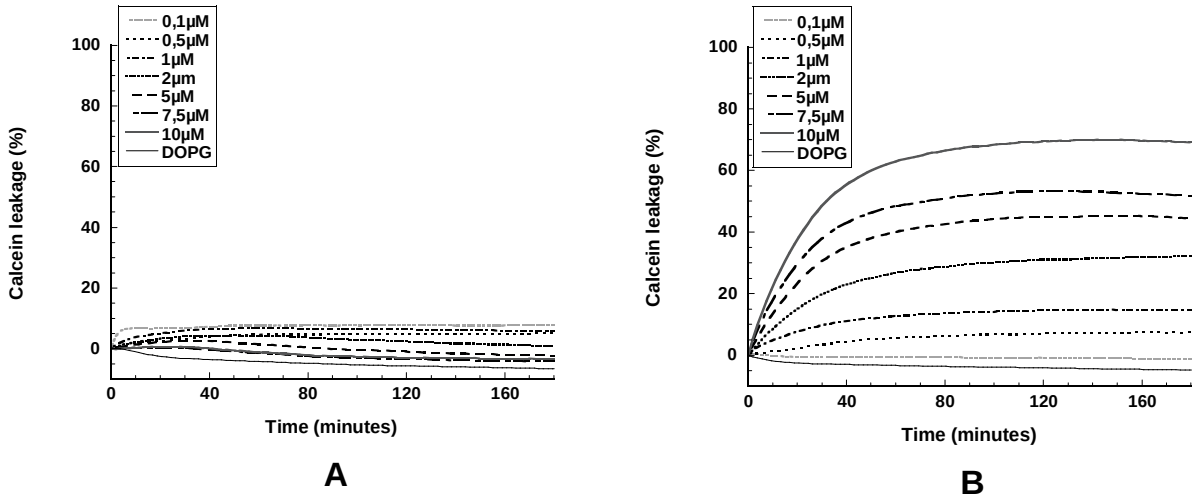


Figure III - 4: Perméabilisation des liposomes de DOPG par les fragments de sonication de fibres de WT (A) et M8 (B). La concentration de lipides calculée d'après phosphate est de 30 µM. Les expériences sont faites en « *triplicate* » dans les puits des plaques microtiters noirs à fond plat. Les expériences ont été effectuées dans un tampon TBS à pH 7,4 à 25 °C.

En combinaison avec le faible effet des fibres matures de M8, ces résultats montrent que la taille des agrégats joue un rôle prépondérant dans l'interaction de cette protéine toxique avec les membranes. Nous n'avons pas approfondi cet axe d'études car pour le moment nous n'avons pas pu contrôler l'homogénéité des fragments obtenus.

Les fibres matures des protéines WT et M8 ne perméabilisent pas les membranes. Un faible effet des fibres amyloïdes de l'hIAPP a également été montrée *in vitro* sur des liposomes de DOPC/DOPS (7/3, mol/mol), avec moins de 10% de perméabilisation (Engel et al. 2008). Idem, Volles et al. ont montré que les fibres de α-synucléine ont moins d'affinité et perméabilisent moins les liposomes de eggPG que des protofibres (Volles et al. 2001). *In vivo*, des fibres de Aβ 1-42 présentent ainsi une plus faible toxicité que des espèces globulaires aux cellules HeLa (Fukuda et al. 2010).

Nos résultats sur l'accélération de l'agrégation des protéines WT et M8 par des lipides sont en accords avec des études précédentes sur différentes protéines amyloïdes (Aβ 1-40 (Okada et al. 2007) ; PrP 106-126 (Dorosz et al. 2009) ; hIAPP (Domanov and Kinnunen 2008; Knight and Miranker 2004)…).

Dans l'interaction des protéines WT et M8 avec les LUV au cours de leur agrégation, l'interaction électrostatique est importante. Des effets similaires sur la perméabilisation des liposomes ont été observés par Volles et al. (Volles et al. 2001). Ils ont montré que des oligomères protofibres de l'α-synucléine s'associent aux liposomes chargés négativement de eggPG et induisent la perméabilisation des ces liposomes mais pas aux liposomes de POPC.

Nos résultats ont donc renforcé l'idée que la toxicité n'est pas due aux fibres amyloïdes mais liée aux oligomères formés lors du processus d'auto-assemblage des protéines amyloïdes.

Conclusion :

- Les protéines WT et M8 perméabilisent des liposomes chargés négativement de DOPG et d'asolectine. La capacité des protéines WT et M8 à perméabiliser les membranes bicouches dépend du rapport protéine/lipide.
- La protéine toxique M8 perméabilise les membranes chargées négativement beaucoup plus fortement que la protéine non-toxique WT.
- Les fibres amyloïdes matures de WT et M8 produisent une faible perméabilisation sur des liposomes.
- L'interaction avec les liposomes lipidiques accélèrent l'agrégation des protéines WT et M8.

III. Interaction des protéines WT et M8 avec les bicouches supportées de lipides - Etude par PWR

Nous avons démontré que les protéines WT et M8 sont capables de perméabiliser des membranes chargées négativement. Le mécanisme de cette perméabilisation reste cependant

inconnu. Quelles sont les effets causés aux membranes par ces protéines au cours de leur agrégation ?

La spectroscopie PWR (Plasmon-Waveguide Resonance) permet de suivre l'adsorption et l'agrégation des protéines sur des bicouches lipidiques. Elle est basée sur le couplage de la résonance de plasmon de surface de films métalliques minces avec l'onde dirigé d'une couche diélectrique adjacente (**Figure III - 5**).

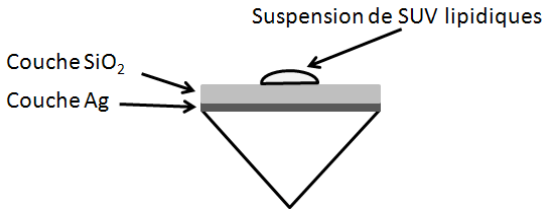


Figure III - 5: Cristal PWR

Le détail de la technique PWR est présenté dans l'**annexe II. 3** (page 211). En bref, un de ses plus grands avantages par rapport à la spectroscopie SPR (Surface Plasmon Resonance) est l'utilisation de deux polarisations de la lumière : perpendiculaire (*s*) et parallèle (*p*) au plan d'incidence, ce qui permet de suivre les changements anisotropes au niveau de la bicouche lors d'interaction sans avoir besoin de marqueur (Salamon et al. 1999). Cette méthode donne ainsi la possibilité de déterminer non seulement des changements en masse mais aussi en structure (**Annexe II.3,** page 213). De plus, la largeur plus fine des spectres PWR permet d'augmenter la résolution spectrale et ainsi la sensibilité de la technique en comparaison avec la spectroscopie SPR (Salamon et al. 1999; Hruby et al. 2010).

La possibilité de suivre les interactions protéine-membrane sans nécessité de marqueur permet d'éviter les effets d'interférences externes probables sur la complexité inhérente des interactions protéine amyloïde-membrane.

Dans notre étude, nous avons utilisé la spectroscopie PWR pour étudier l'interaction des protéines amyloïdes WT et M8 avec des bicouches supportées comme modèles membranaires. Pour étudier l'effet de charge de surface, des bicouches soit de DOPC (0% lipides anioniques), soit eggPC/DOPG (4/1 mol/mol) (20% lipides anioniques) ou encore d'asolectine (~40% lipides anioniques) ont été utilisées.

III.1. Formation des bicouches supportées à la surface du cristal PWR

Les bicouches supportées sont préparées par l'éclatement de liposomes de très petites tailles - SUV (Small Unilamellar Vesicles) de lipides sur le cristal PWR (**Figure III - 5**). Le dépôt des bicouches est suivi par les variations de l'angle de résonance en polarisation *s* et en *p*. La **Figure III - 6** présente les spectres PWR polarisé *s* obtenus avec le cristal nu (courbe

pointillée) et le cristal couvert d'une bicouche de DOPC (courbe continue) toujours en présence d'un tampon (tampon Tris (TBS) pH 7,4).

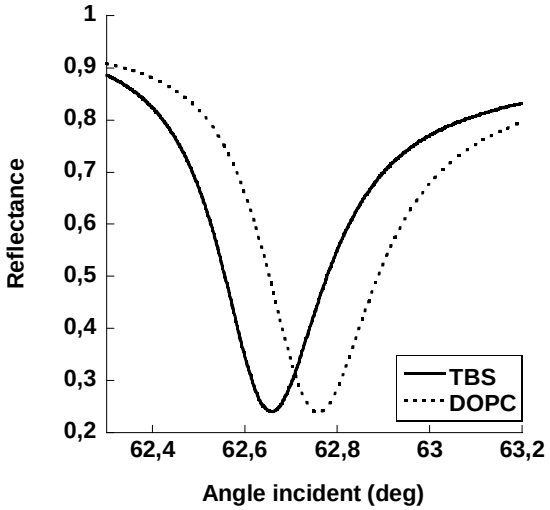


Figure III - 6: Spectres obtenus pour un cristal nu (courbe pointillée) et cristal recouvert d'une bicouche supportée de DOPC sur la surface du cristal PWR dans un tampon Tris (pH 7,4). Les spectres sont enregistrés avec une lumière à 632,8 nm en polarisation *s*. La température est contrôlée à 25 ± 0,2°C.

Lors du dépôt des bicouches lipidiques supportées, les déplacements en polarisation *p* varient de 100 à 120 mdeg et en polarisation *s* de 80 à 90 mdeg en fonction de la composition lipidique. Ces variations sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour des bicouches lipidiques suspendues formées par la méthode Montal-Mueller, et confirment que les bicouches lipidiques sont bien formées sur le cristal de PWR (Salamon et al. 1997; Alves et al. 2004). Les valeurs plus grandes des déplacements en polarisation *p* par rapport à celles en polarisation *s* indiquent que les chaînes alkyls des lipidiques sont orientées plutôt perpendiculairement à la surface du prisme.

III.2. Adsorption des protéines WT et M8 sur les bicouches lipidiques

Les constantes d'affinité des interactions protéines-lipides peuvent être obtenues par analyse des spectres PWR en exprimant les variations d'angle de résonance en fonction de la concentration de protéine injectée. Dans le cas des protéines amyloïdes où plusieurs phénomènes se produisent simultanément lors de l'interaction avec les lipides (adsorption et agrégation) les constantes obtenues sont des constantes apparentes. Afin de déterminer ces valeurs, les interactions entre des protéines amyloïdes WT et M8 avec différentes bicouches lipidiques ont été étudiées en ajoutant successivement des quantités croissantes de protéines à l'état monomère dans la cellule PWR contenant la bicouche lipidique supportée. Nous avons utilisé une gamme de concentration allant de 10 pM à 5 µM au maximum. A chaque concentration, l'équilibre spectral a été atteint avant l'ajout d'une nouvelle quantité de

protéine (temps d'attente de 10 à 15 minutes). Les solutions de protéines dans le tampon Tris (pH 7,4) sont préparées juste avant l'injection dans la cellule PWR.

Une expérience de contrôle (addition du tampon Tris (pH 7,4) seul) ne montre aucune variation observable. Pour tous les lipides testés, l'addition des protéines (WT ou M8) entraîne des changements spectraux. Cela indique que les protéines interagissent avec la membrane.

Pour chaque expérience, deux étapes ont été analysées :

- Les changements spectraux produits lors de l'addition des protéines (jusqu'à 5 µM pour WT dans toutes les expériences et pour M8 en interaction avec les bicouches de eggPC/DOPG et DOPC et jusqu'à 1 µM pour M8 en interaction avec les bicouches d'asolectine).
- Les variations en fonction du temps des spectres obtenus à la concentration finale.

Nous présentons les résultats pour chaque type de lipides étudiés : DOPC, asolectine, eggPC/DOPG (rapport molaire 4/1).

III.2.1. **Interactions des protéines avec la bicouche de DOPC**

En augmentant la quantité des protéines (WT et M8) en contact avec la bicouche de DOPC, deux phases d'interaction ont été observées : la première phase correspond à des déplacements positifs des angles de résonance pour les deux polarisations *s* et *p* et la deuxième phase correspond à une diminution des angles de résonance pour les deux polarisations. La **Figure III - 7** présente les résultats obtenus lors de l'addition de WT sur une bicouche supportée de DOPC.

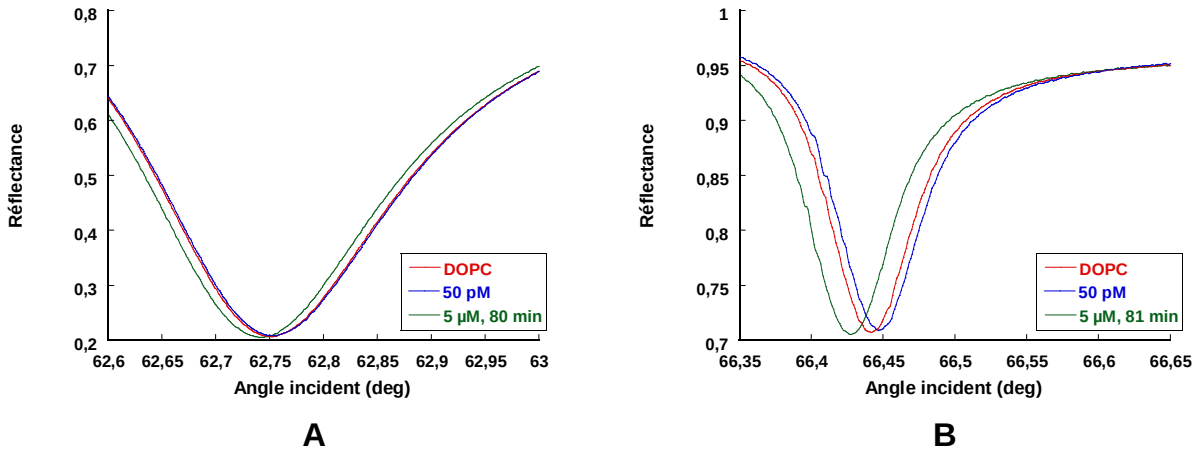


Figure III - 7: Spectres PWR en polarisation *p* (A) et en polarisation *s* (B) d'une interaction DOPC-WT. La première phase : variation positive d'angle de résonance (à concentration en protéine ≤ 50 pM) et la deuxième phase : variation négative d'angle de résonance (jusqu'à 5 µM). Le temps indiqué correspond au temps d'attente à la concentration de 5 µM, soit environ 200 minutes après la première injection de protéine. Tampon TBS, pH 7,4, 25 ± 0,2 °C.

La première phase (**Figure III - 7 A et B**: DOPC vers DOPC + 50 pM de WT, ajoutés de façon successive) correspond à des déplacements positifs pour la polarisation *p* (3 mdeg) et pour la polarisation *s* (5 mdeg). La deuxième phase est observée à partir d'une concentration de 50 pM (**Figure III - 7 A et B**: DOPC + 50 pM de WT vers DOPC + 5 µM de WT, ajoutés de façon successive) avec le déplacement d'angle de résonance de -12 mdeg pour la polarisation *p* et de -20 mdeg pour la polarisation *s* (par rapport à l'équilibre à 50 pM).

La **Figure III - 8** présente les résultats d'une expérience de DOPC-M8 en polarisation *p* (A) et en polarisation *s* (B). Les mêmes types de variations sont observés avec M8 qu'avec WT.

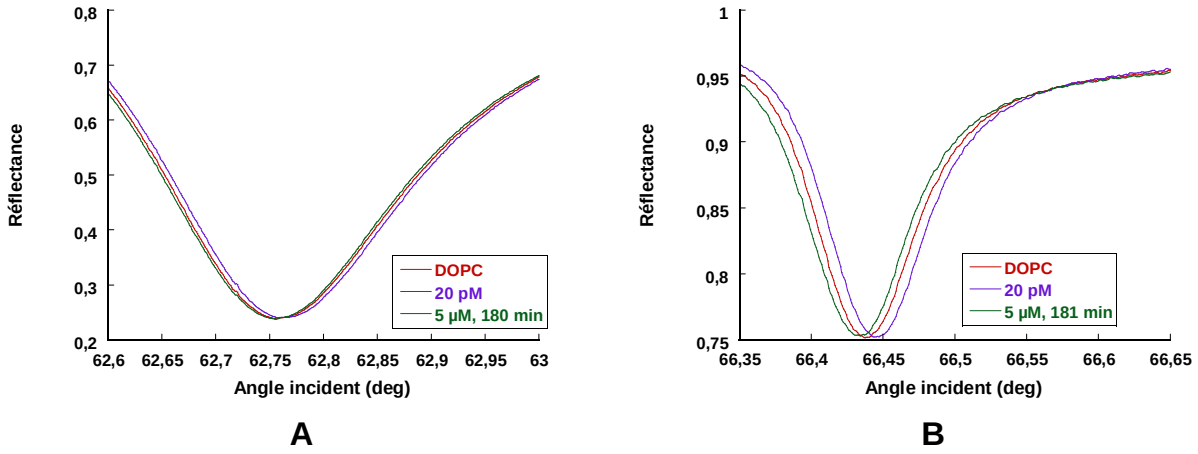


Figure III - 8: Spectres PWR en polarisation *p* (A) et en polarisation *s* (B) d'une interaction DOPC-M8. La première phase : variation positive d'angle de résonance (à concentration en protéine ≤ 20 pM) et deuxième phase : variation négative d'angle de résonance (jusqu'à 5 µM). Le temps indiqué correspond au temps d'attente à la concentration de 5 µM, soit environ 330 minutes après la première injection de protéine. Tampon TBS, pH 7,4, 25 ± 0,2 °C.

Dans cette expérience, la première phase (**Figure III - 8 A et B** : DOPC vers DOPC + 20 pM de M8, ajoutés de façon successive) présente un déplacement positif de 6 mdeg pour la polarisation *p* et 8 mdeg pour la polarisation *s*. Ensuite, la deuxième phase révèle une variation de -7 mdeg pour la polarisation *p* et -8 mdeg pour la polarisation *s* (par rapport à l'équilibre à 20 pM) (**Figure III - 8 A et B** : DOPC + 20 pM de M8 vers DOPC + 5 µM de M8, ajoutés de façon successive).

A 5 µM, après 1 à 3 heures, très peu de changements spectraux ont été observés pour les deux protéines WT et M8.

Le déplacement positif d'angle de résonance dans la phase 1 indique une augmentation d'indice de réfraction des couches recouvrant le prisme. Cela correspond à une augmentation en masse des couches liée à l'adsorption des protéines sur la bicouche lipidique. Le déplacement pour la polarisation *s* est plus grand que celui pour la polarisation *p* (pour WT et M8) indiquant une accumulation plutôt latérale des protéines sur la surface (**Figure III - 9**

A). Une accumulation verticale aurait entrainé une variation plus importante pour la polarisation *p* par rapport à la polarisation *s* (**Figure III - 9 B**).

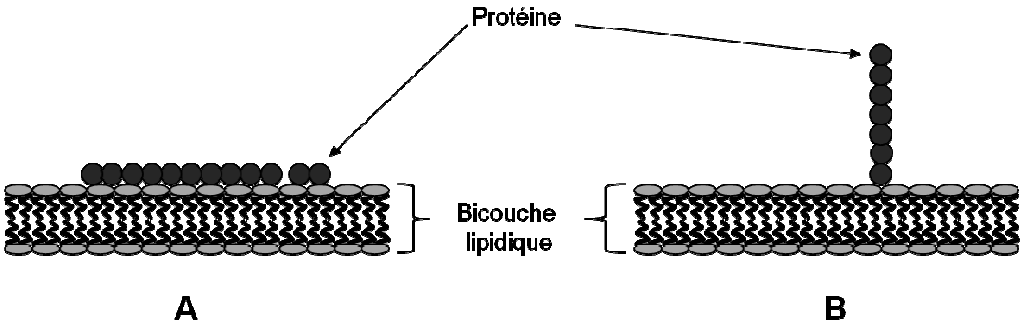


Figure III - 9: Adsorption des protéines sur la bicouche lipidique

Le déplacement négatif observé pour la gamme de concentration de 20 pM à 5 µM en M8 et de 50 pM à 5 µM en WT correspond à une diminution en masse, il peut être attribué soit à l'insertion des protéines dans les couches entraînant le déplacement des molécules lipidiques soit à une élimination des molécules lipidiques présentes à la surface liée à l'agrégation des protéines (Devanathan et al. 2006). Le même phénomène biphasique a été observé lors de l'étude par PWR des interactions du peptide Aβ 1-40 avec une membrane bicouche contenant de la sphingomyéline et du cholestérol (rapport molaire de 1 : 0.35) (Devanathan et al. 2006). Dans ces interactions, la concentration du peptide Aβ 1-40 pour laquelle on observe le changement de phase était de 5 µM et les variations des angles de résonance étaient également plus fortes que dans notre étude : 40 mdeg en polarisation *p* et 27 mdeg en polarisation *s* pour la première phase ; et ensuite -63 mdeg en *p* et -36 mdeg en *s* par rapport à l'équilibre à 5 µM.

L'extraction de lipides a été observée pour l'hIAPP pour des membranes contenant du POPG (Domanov and Kinnunen 2008) et des membranes ne contenant que PC (Sparr et al. 2004). Cet effet est expliqué par l'interaction électrostatique entre la charge positive de hIAPP et les compositions négatives des membranes (Domanov and Kinnunen 2008). Pourtant, cette explication ne peut pas expliquer l'effet sur les membranes neutres comme dans le cas de nos études. Sparr et al. ont conclu que cet effet est lié à la fibrillation au niveau de la membrane (Sparr et al. 2004).

Green et al. ont également constaté que l'agrégation de hIAPP à la surface des membranes entraine des lésions au niveau des membranes (Green et al. 2004). Ces lésions ont été expliquées soit par un mécanisme de type détergent comme l'effet du Triton X-100 ou soit par une expansion des lipides (Green et al. 2004).

Pour WT, la phase 2 est observée plus tard que pour M8 (à une concentration en protéine supérieure de 50 pM par rapport à 20 pM). Cela peut être attribué à une cinétique de

formation de fibre plus lente que celle de M8, donc, le déplacement ou l'élimination du lipide aurait lieu plus tardivement.

Nous avons réalisé plusieurs expériences M8/DOPC et WT/DOPC, pour chaque expérience, les deux phases sont observées. En revanche les variations d'angles de résonances sont différentes d'une expérience à l'autre rendant très difficile la détermination des constantes d'affinité apparentes des protéines pour les bicouches de DOPC. Nous pensons que les variations observées sont liées à la complexité des interactions car à côté des interactions avec les membranes, les protéines WT et M8 forment également des agrégats. Par conséquent, à un moment donné, il y a toujours différents types d'agrégats de protéines venant en interaction avec des bicouches supportées de DOPC. Nous pouvons donner un ordre de grandeur de ces constantes d'affinité apparentes pour WT et pour M8 : ces constantes varient du subpicomolaire au nanomolaire.

III.2.2. **Interactions des protéines avec la bicouche d'asolectine**

L'addition de quantité croissante de WT sur la bicouche d'asolectine déposée sur le cristal PWR entraine aussi la variation des angles de résonance. Trois phases ont été observées (**Figure III - 10**). Les deux premières phases sont similaires à celles observées avec la monocouche de DOPC (premièrement 8 mdeg en polarisation *p* et 15 mdeg en polarisation *s* jusqu'à 120 pM et ensuite, -9 mdeg en *p* et -14 mdeg en *s* par rapport à l'équilibre à 120 pM). Une troisième phase avec des variations positives des spectres est enfin observée correspondant à une augmentation en masse au niveau de la bicouche d'asolectine. Cette augmentation en masse traduit l'accumulation des protéines sur la bicouche lipidique.

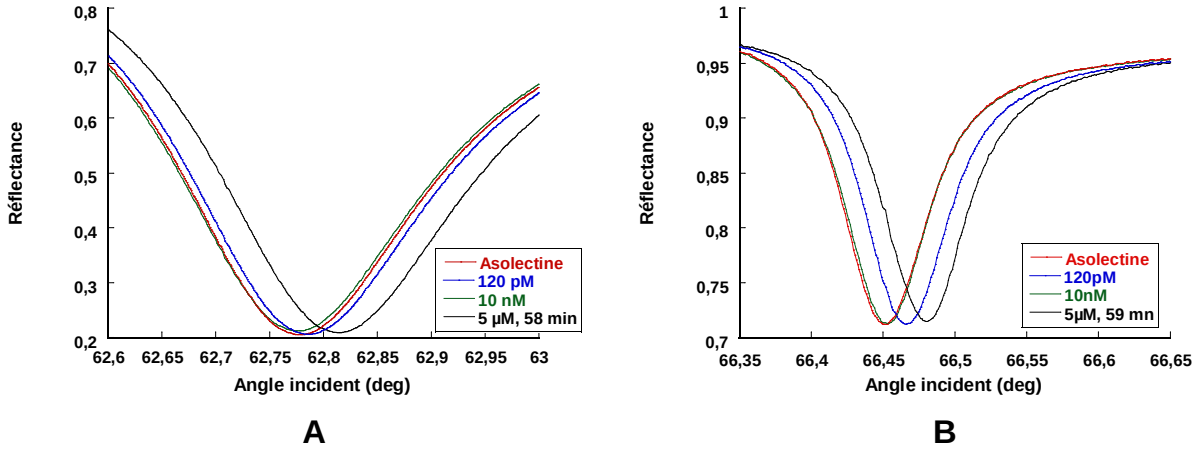


Figure III - 10: Spectres PWR en polarisation *p* (A) et en polarisation *s* (B) d'une interaction Asolectine-WT. La première phase avec variation positive d'angle de résonance (à concentration en protéine ≤ 120 pM), la deuxième phase avec variation négative d'angle de résonance (jusqu'à 10 nM) et la troisième phase avec variation positive d'angle de résonance (> 10 nM). Le temps indiqué correspond au temps d'attente à la concentration de 5 µM, soit environ 330 minutes après la première injection de protéine. Tampon TBS, pH 7,4, 25 ± 0,2 °C.

Quand la concentration atteint 1 µM, l'équilibre a lieu après ~10 minutes accompagné par des déplacements faibles sur les deux polarisations. Après 24 minutes à 1 µM, il n'y a pas de modification des spectres. La concentration de protéine a ensuite été augmentée à 5 µM. Cependant, même à 5 µM après une heure, nous observons seulement des déplacements spectraux positifs (36 mdeg en polarisation *p* et 22 mdeg en polarisation *s* par rapport à l'équilibre à 1 µM).

Pour M8, en augmentant la concentration jusqu'à 1 µM (après plusieurs additions de protéine pendant 160 minutes) il n'y a pas de changements notables des angles de résonance aussi bien en polarisation *p* qu'en polarisation *s* (**Figure III - 11** : Asolectine (courbe rouge) et Asolectine + 1 µM de M8 (courbe bleu) pour les deux polarisations *p* (A) et *s* (B)).

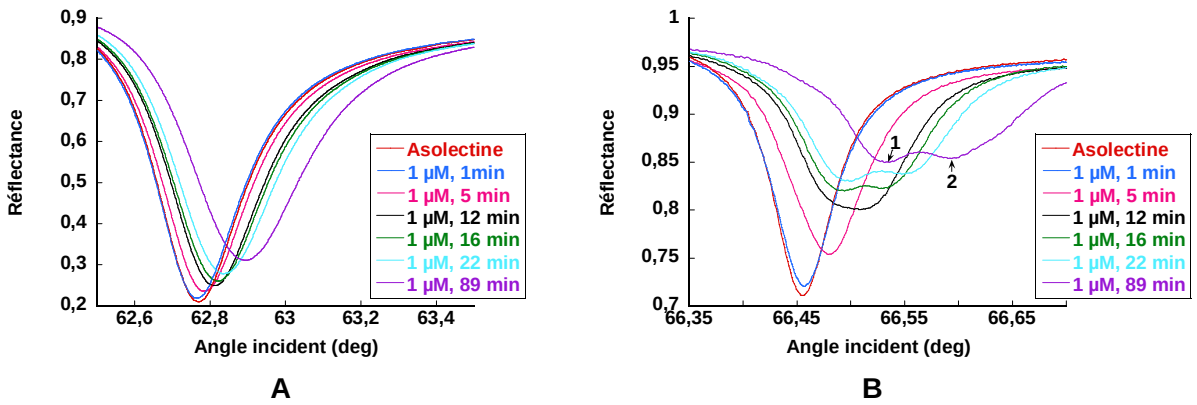


Figure III - 11: Spectres PWR obtenus à une concentration 1 µM de M8 à différents temps pour la polarisation *p* (A) et pour la polarisation *s* (B). Différentes quantités de protéine ont été additionnées après l'équilibre à chaque concentration donnée (jusqu'à 1 µM). Le t = 0 correspond à l'instant où la concentration en protéine atteint 1 µM, soit environ 160 minutes après la première injection de protéine. Tampon TBS, pH 7,4, 25°C ± 0,2 °C.

Par contre, l'équilibre à 1 µM n'a pas eu lieu. Quand la concentration atteint 1 µM au bout de 10 minutes, des changements importants de la forme des spectres sont observés (**Figure III - 11**). Ces changements sont caractérisés par :

- Des déplacements positifs importants des angles de résonance et un élargissement des bandes surtout en polarisation *s*. Cela signifie une accumulation en masse importante des protéines sur la bicouche d'asolectine et un changement de la bicouche surtout en polarisation *s*.
- Réduction importante de la profondeur des spectres particulièrement en polarisation *s* ce qui indique une diminution importante de l'épaisseur des couches à la surface du cristal.
- Apparition de deux résonances sur le spectre en polarisation *s* (**Figure III - 11 B**). Ce profil semble indiquer la formation de deux domaines (1 et 2 , **Figure III - 11 B**) de compositions lipidiques et/ou protéique différentes dans la membrane lipidique

(Salamon et al. 2005). Salamon et al. ont montré des profiles spectraux similaires pour des membranes composées de DOPC et de sphingomyéline qui forment des domaines différents. Leur spectre PWR contient un domaine à l'angle de résonance plus faible qui correspond au DOPC et un domaine à l'angle de résonance plus grand qui correspond à la sphingomyéline (Salamon et al. 2005). Ces deux domaines posséderaient donc des indices de réfraction différents.

Les dimensions de ces domaines peuvent être évaluées. La résolution latérale de la technique PWR est du même ordre de grandeur que la longueur de propagation des ondes plasmons, c'est-à-dire de l'ordre du µm dans nos études (Salamon et al. 2005; Alves et al. 2005). Les domaines formés sont donc de l'ordre du µm. Ces résultats sont cohérents avec l'ampleur des défauts formés par la protéine M8 en interaction avec la monocouche d'asolectine observés par ellipsométrie (**Figure II - 14**, page 102).

Les évolutions d'angles de résonances des deux domaines sont présentées sur la **Figure III - 12**.

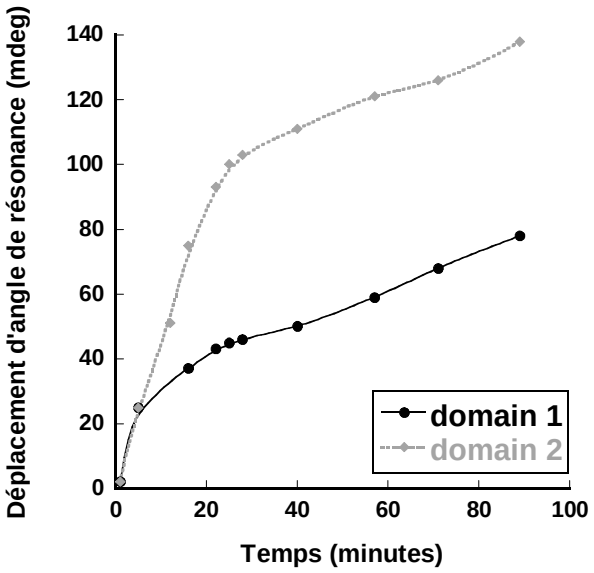


Figure III - 12: Evolution des angles de résonance pour les deux domaines formés dans la bicouche d'asolectine en interaction avec la protéine M8. Le t = 0 correspond à l'instant où la concentration en protéine atteint 1 µM, soit environ 160 minutes après la première injection de protéine. L'expérience a été effectuée avec un tampon TBS à pH 7,4 à la température de 25 ± 0,2 °C.

Après 90 minutes, un déplacement de 78 mdeg a été observé pour le domaine de plus faible angle de résonance (domaine 1) et de 138 mdeg pour le domaine de plus grand angle de résonance (domaine 2) en polarisation *s*. En polarisation *p*, ce phénomène n'est pas observé, l'angle de résonance a été déplacé positivement de 123 mdeg.

Les calculs de constantes d'affinité de WT et M8 avec des bicouches d'asolectine montrent que des constantes d'affinité apparentes pour des membranes d'asolectine varient du subpicomolaire au nanomolaire pour les deux protéines.

Les résultats obtenus ont montré qu'il n'y avait pas de grande différence entre l'interaction de la protéine non toxique (WT) avec la bicouche de DOPC et celle d'asolectine à part que la deuxième phase a lieu plus tôt (50 pM et 120 pM). En revanche, la protéine toxique (M8) se comporte très différemment vis-à-vis de la bicouche chargée négativement d'asolectine par rapport à la bicouche zwittérionique de DOPC. Elle a induit un phénomène de ségrégation des lipides ou lipides/protéines dans les membranes d'asolectine.

Dans les expériences réalisées précédemment, plusieurs phénomènes coexistent:

- L'adsorption et/ou l'insertion des protéines WT et M8 dans les bicouches lipidiques et l'agrégation des protéines en solution.
- De plus, il y a probablement toujours plusieurs types d'agrégats des protéines en interaction avec la bicouche d'asolectine.

Afin de nous affranchir, du moins au départ, des phénomènes d'agrégation des protéines, nous avons réalisé un autre type d'expérience où les protéines sont introduites à l'état de monomère en une seule fois.

Les spectres PWR obtenus après l'addition de 1 µM de protéines sur une bicouche supportée d'asolectine sont présentés sur la **Figure III - 13**.

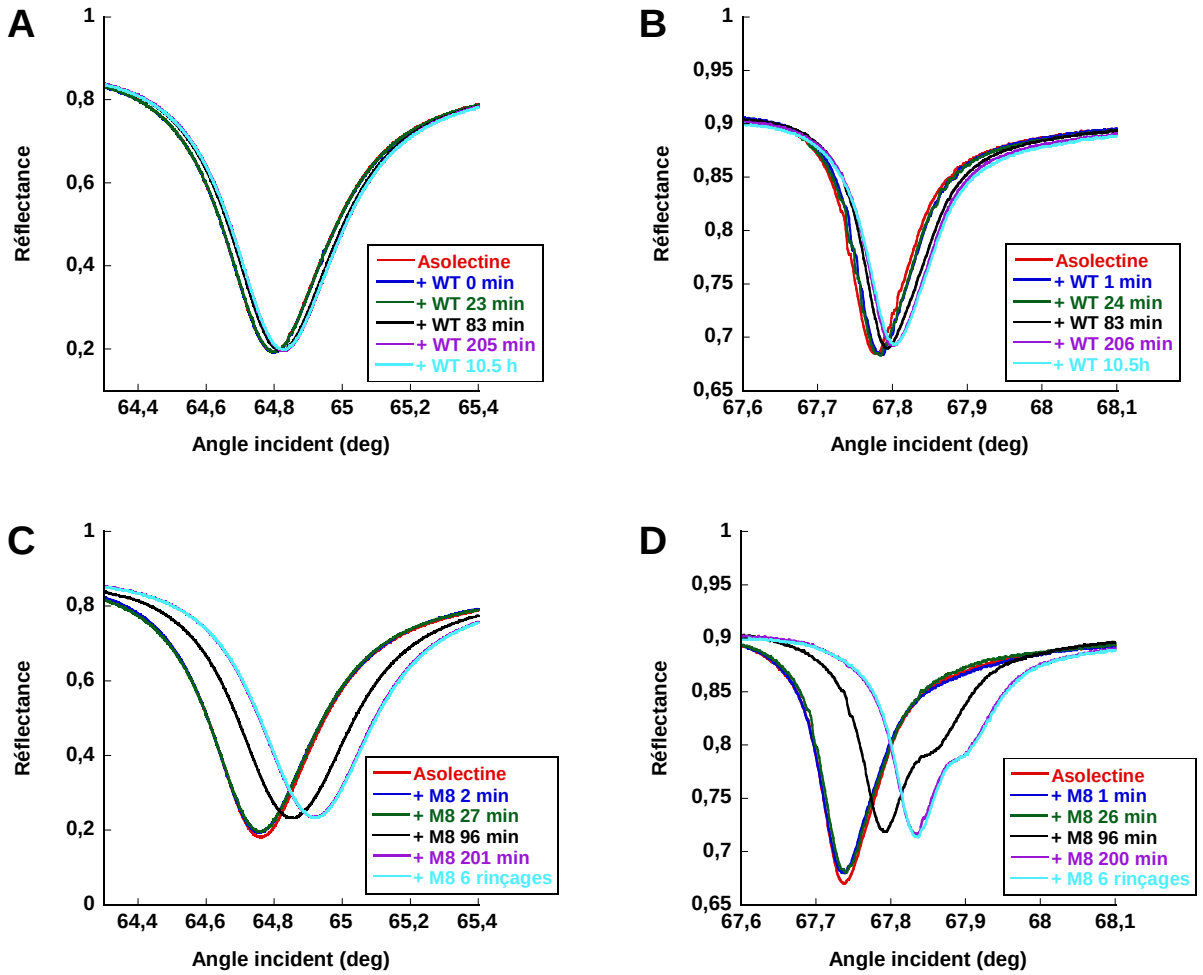


Figure III - 13: Spectres PWR obtenus avec addition de 1 µM de WT (A, B) ou de M8 (C, D) sur une bicouche d'asolectine en polarisation *p* (gauche) et en polarisation *s* (droite). Les protéines sont injectées dans la cellule PWR en une seule fois à l'état de monomère à 1 µM. Tampon TBS, pH 7,4, température 25 ± 0,2 °C.

Pour le WT, seuls des déplacements d'angles de résonance ont été observés (**Figure III - 13 A, B**). Pour le M8 des changements d'angles de résonance ont été accompagnés par une diminution importante d'épaisseur des spectres (**Figure III - 13 C, D**). Après environ 90 minutes, apparaît deux domaines bien distincts en polarisation *s* comme dans les expériences où la protéine M8 est ajoutée de façon successive (**Figure III - 13 D, courbe noire**).

Après les mêmes temps d'interaction, les déplacements spectraux des deux polarisations lors de l'interaction de M8 avec une bicouche d'asolectine sont toujours plus grands que ceux obtenus avec le WT (**Figure III - 14**). Ce fait conforte l'idée d'une interaction plus forte avec la protéine toxique M8 comparé à l'effet de la protéine sauvage WT des bicouches d'asolectine (insertion et/ou déplacement des lipides comme observé précédemment). Les effets de M8 sur la bicouche d'asolectine persistent après rinçage (**Figure III - 13 C, D**), ils sont donc irréversibles.

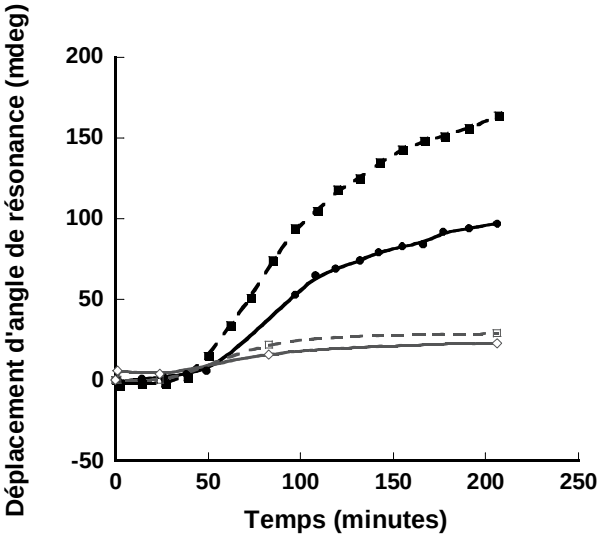


Figure III - 14: Déplacements d'angle de résonance principale d'interactions des protéines WT (gris) et M8 (noir) avec une bicouche d'asolectine en polarisation *p* (courbe pointillée) et en polarisation *s* (courbe continue). Les protéines sont injectées dans la cellule PWR en une seule fois à l'état de monomère à 1 µM. Tampon TBS, pH 7,4, 25 ± 0,2 °C.

Les résultats sur la formation de deux domaines dans les bicouches d'asolectine démontrent que la protéine M8 induit une ségrégation de la bicouche. On pourrait observer alors une partie protéique et une partie lipidique. Ces résultats sont en accord avec la perméabilisation des liposomes par M8. D'autres hypothèses sont soit la protéine toxique induirait une ségrégation des lipides au sein de la bicouche soit la protéine toxique s'associe de manières différentes aux différents lipides de la bicouche.

La formation des « mosaïques » dans les membranes a également été reporté pour le peptide Aβ 1–42 (Valincius et al. 2008). Une combinaison des mesures d'épaisseur des membranes avec la capacitance spécifique a permis à Valincius et al. de proposer un modèle où les oligomères de Aβ 1–42 s'insèrent dans des membranes de PC (DOPC, DPhyPC, DMPC, or DMPC-d54) et y forment des « mosaïques ». Cette formation est accompagnée par une diminution de la barrière électrique membranaire, qui permet le transfert des ions à travers la membrane. Dans le cas de la protéine α-synucléine, l'effet de réorganisation des bicouches supportées de DOPA/DOPC/NBD-PC (1-palmitoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino] hexanoyl] -sn-glycero-3-phosphocholine) (rapport molaire 30/69/1) a été reporté (Haque et al. 2010). Dans ces interactions, l'α-synucléine a rendu hétérogène les bicouches de PA/PC en différents domaines riches en PA et riches en PC. La gamme de concentration est de 0,26 à 2,6 µM, de même l'ordre de nos expériences. La réorganisation des membranes induite par les protéines amyloïdes serait un aspect important conduisant à la perméabilisation de la membrane et pourrait expliciter la toxicité de certaines protéines amyloïdes.

III.2.3. **Interactions des protéines avec la bicouche de eggPC/DOPG**

Lors de l'interaction avec la bicouche eggPC/DOPG, l'augmentation de la concentration de M8 est corrélée avec des déplacements positifs (**Figure III - 15 A**). A 5µM, un équilibre est atteint après environ 15 minutes pour les deux polarisations, le déplacement d'angle de résonance est de 21 mdeg pour la polarisation *p* et de 34 mdeg pour la polarisation *s* (**Figure III - 15 A** ; **Figure III - 15 B**, courbe bleu pour la polarisation *s*). Après ~30 minutes, un effet similaire comme pour l'interaction M8-asolectine (**Figure III - 11**) a été observé pour les deux polarisations mais les amplitudes sont beaucoup plus faibles (**Figure III - 15 B**, courbe verte pour la polarisation *s*). La **Figure III - 15 B** reporte la formation de deux domaines en polarisation *s* au cours du temps.

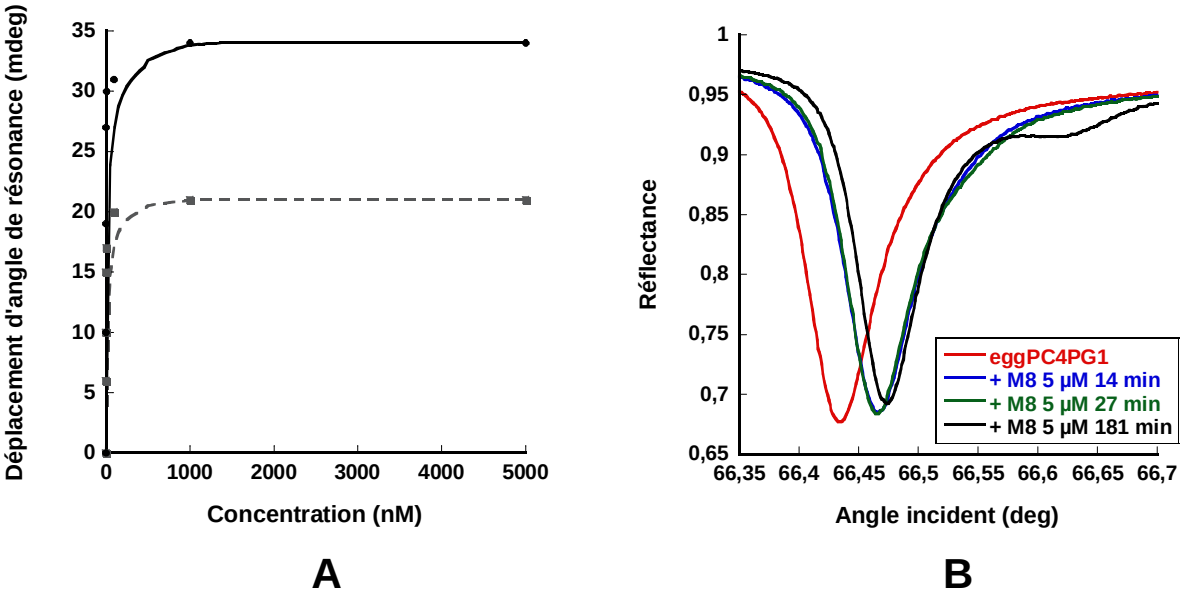


Figure III - 15: Interaction de M8 avec une bicouche d'eggPC/DOPG (4/1 mol/mol) : A) Déplacements positifs d'angle de résonance obtenus en polarisation *p* et *s*. B) Apparition de deux domaines pour la polarisation *s*. Le t = 0 correspond à l'instant où la concentration en protéine atteint 5 µM, soit environ 90 minutes après la première injection de protéine. Tampon TBS à pH 7,4, température 25 ± 0,2 °C.

L'apparition des deux domaines est également attribuée à une réorganisation de la bicouche eggPC/DOPG induite par la protéine M8. L'amplitude de cet effet par rapport à celui d'interaction M8-asolectine est en cohérence avec le **pourcentage de charge ionique** dans les deux bicouches : eggPC/DOPG (25% de charge négative) et asolectine (41% de charge négative) (avec 26% de phosphatidyl inositol (PI), 14% d'acide phosphatidic (PA), et de 1% de phosphatidylserine (PS)) et avec **l'interaction spécifique** de M8 avec PG et PI établie lors des expériences sur les monocouches (chapitre II). Ces résultats confirment la spécificité des interactions de la protéine M8 avec les lipides anioniques PG et PI.

Due à la complexité des interactions, nous ne pouvons donner qu'une estimation de la constante d'affinité apparente de M8 en interaction avec la membrane modèle de eggPC/PG : de l'ordre du nanomolaire.

Conclusion :

Les études par la spectroscopie PWR nous permettent de conclure que :

- Les protéines amyloïdes WT et M8 interagissent avec les membranes lipidiques même à des concentrations très faibles (de l'ordre du nM).
- L'interaction de la protéine toxique M8 est beaucoup plus importante que celle du WT et spécifique pour les lipides chargés négativement.
- Le M8 toxique perturbe fortement l'intégrité de la bicouche chargée négativement et tend à former des domaines hétérogènes lipidique et/ou protéique dans les membranes.

IV. Structure secondaire des protéines amyloïdes WT et M8 en interaction avec les bicouches lipidiques - Etude par ATR-FTIR

Nous avons étudié des interactions des protéines WT et M8 avec des bicouches lipidiques supportées par la spectroscopie ATR-FTIR afin de déterminer leur structure secondaire dans ces assemblages. La transition de structure des protéines lors d'interaction avec des liposomes d'asolectine a été également déterminée par la spectroscopie ATR-FTIR.

IV.1. Structure secondaire des protéines WT et M8 en interaction avec les liposomes d'asolectine

La présence des liposomes de lipides accélèrent visuellement la fibrillation des protéines (**Figure III - 3**). Nous avons suivi la transition structurale des protéines lors des interactions protéine-lipide. Ces informations ont été obtenues avec la spectroscopie ATR-FTIR.

Dans ces expériences, les protéines sont incubées avec les LUV d'asolectine dans du tampon PBS (pH 7,4 à 37°C, sans agitation). A différents temps 10 µL d'échantillon sont prélevés et séchés sur le crystal ATR en germanium pour ensuite enregistrer le spectre ATR-FTIR (**Figure III - 16 C et D**). Les contrôles ont été réalisés en parallèle dans les mêmes conditions mais sans les LUV d'asolectine (**Figure III - 16, A et B**).

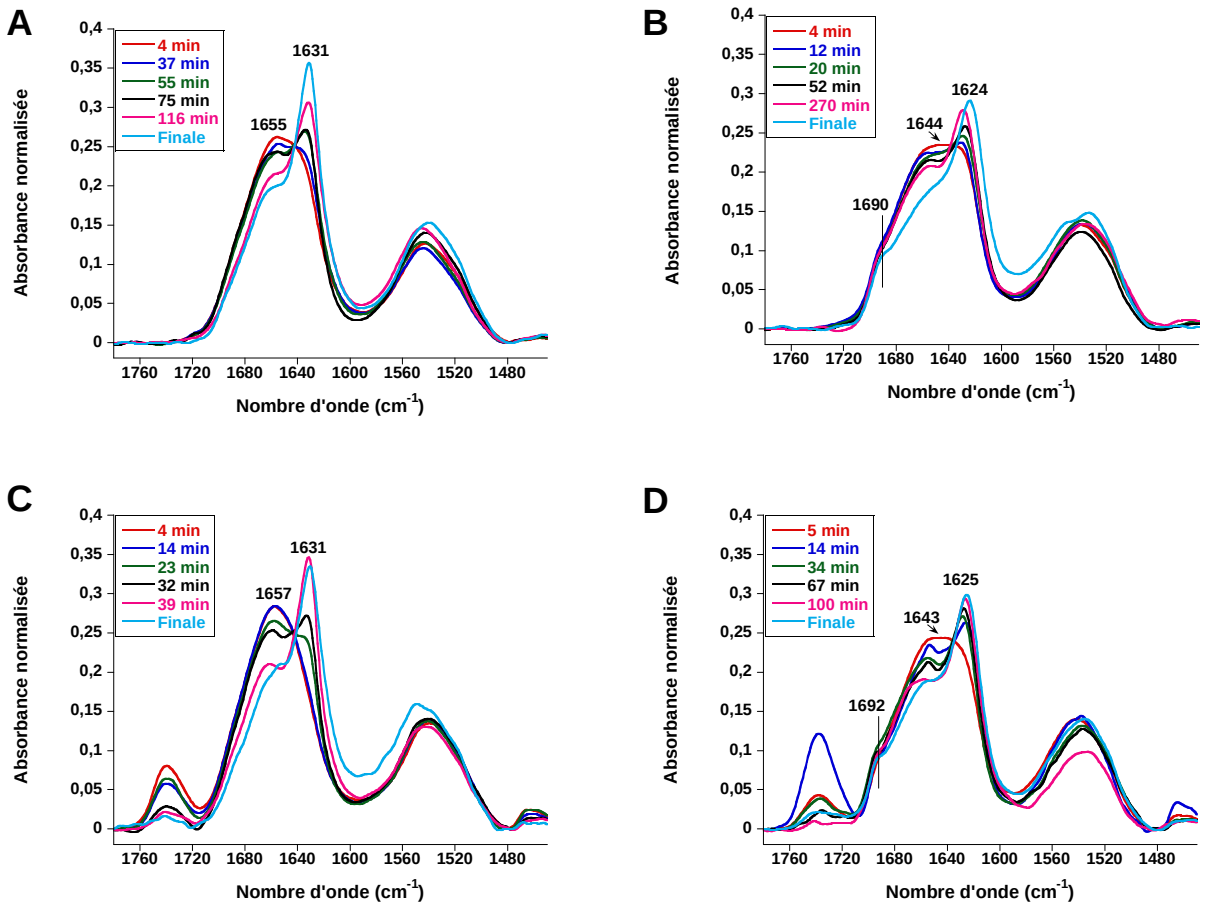


Figure III - 16: Spectres ATR-FTIR de WT et M8 à différents temps de leur processus d'agrégation en absence d'asolectine (A : WT et B : M8) ou en présence de LUV d'asolectine (C : WT + Asolectine, D : M8 + Asolectine). La concentration en protéine est de 7,5 µM, la concentration de lipides est de 30 µM. Les incubations ont été réalisées dans un tampon PBS à pH 7,4 à 37°C, sans agitation. Les spectres sont enregistrés à température ambiante (~21-22°C). Le temps zéro correspond à l'introduction des monomères dans le tampon PBS (début du processus d'auto-assemblage).

Les premiers spectres (à 4-5 minutes) montrent une bande d'absorption intense et large vers 1655-1657 cm^{-1} pour WT et 1643-1644 cm^{-1} pour M8. Ces bandes correspondent à une structure principalement désordonnée pour les deux protéines (WT et M8) comme démontrés par Berthelot et collègues (Berthelot et al. 2010) pour WT et M8 seuls. Les spectres sur la **Figure III - 16** montrent que la structuration des protéines est plus rapide en présence des LUV d'asolectine (C par rapport à A pour WT, D par rapport à B pour M8). Enfin, pour WT ou M8, les structures similaires ont été observées en présence ou en absence de LUV d'asolectine. A l'état final, les spectres de WT présentent une bande importante à 1631 cm^{-1} et pas ou très peu de composant vers 1690 cm^{-1}. Ce profil correspond à une structure riche en feuillets β parallèles. Les spectres finaux de M8 montrent une bande intense à 1624-1625 cm^{-1} et une épaule d'intensité plus faible vers 1690 cm^{-1}. Ces bandes sont caractéristiques d'une structure riche en feuillets β antiparallèles (Goormaghtigh et al. 1994b).

Pour quantifier ces variations structurales, les spectres obtenus sont déconvolués. Le protocole est détaillé dans l'**annexe II.2.3,** page 210. La **Figure III - 17** présente l'évolution

de la composition parallèle dans la structure de la protéine WT (A) et de la composante antiparallèle dans la structure de la protéine M8 (B).

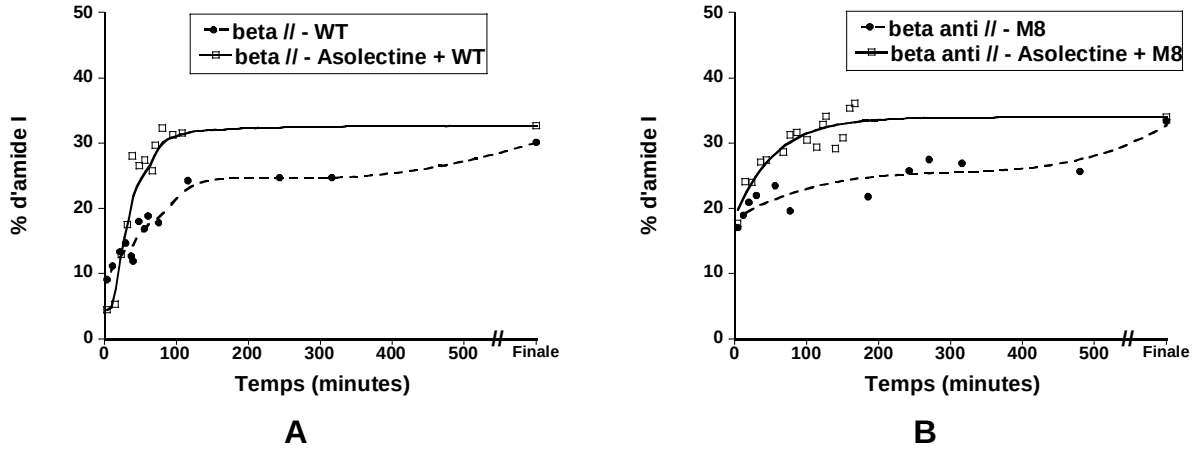


Figure III - 17: Evolution des structures de feuillets β parallèles dans la structure secondaire du WT seul (A, courbe pointillée) et en interaction avec des LUV d'asolectine (A, courbe continue) et de feuillets β antiparallèles dans la structure secondaire du M8 seul (B, courbe pointillée) et en interaction avec des LUV d'asolectine (B, courbe continue). La concentration en protéine est de 7,5 µM. La concentration des lipides est de 120 µM. Tampon PBS, pH 7,4. L'incubation a été réalisée à 37°C.

Les résultats obtenus montrent clairement qu'au bout de 100 minutes, en présence des LUV d'asolectine, les protéines WT et M8 sont dans leurs structures finales alors que ces états ne sont pas aboutis dans les cas des protéines seules même après 500 minutes (**Figure III - 17 A et B**).

Ces résultats sont en accord avec des résultats dans la littérature sur l'accélération de la structuration en une structure riche en feuillets β induite par la présence des lipides. Par example, la transition en une structure riche en feuillets β de Aβ 1-40 est accélérée par la présence des vésicules de DMPC/DMPG (rapport molaire 2/1) (Bokvist and Gröbner 2007). Egalement, les membranes chargées négativement catalysent la fibrillation de hIAPP (Knight and Miranker 2004; Domanov and Kinnunen 2008) et PrP (106-126) (Dorosz et al. 2009). Utilisant des monocouches auto-assemblées (self-assembled monolayers, SAM), Wang et al. ont montré que l'interaction avec des monocouches de différentes propriétés (hydrophobe, hydrophile, charge négative, charge positive) accélèrent à la fois la fibrillation et la transition de structure de random coil à feuillets β (Wang et al. 2011). La cinétique de transition structurale est nettement augmentée avec des structures en feuillets β bien observé après seulement une heure d'incubation, alors que la fibrillation en solution dure plus d'un jour (Wang et al. 2011). Cette transition structurale est liée à la toxicité sur des cellules en cultures pour des peptides A*β* (29-40); Aβ (29-42) (Demeester et al. 2000).

En conclusion, des liposomes d'asolectine accélèrent la fibrillation et la structuration des protéines amyloïdes WT et M8 sans changer les structures finales de WT et M8.

Cependant, dans ces expériences, le prélèvement a pris des lipides et des protéines en solutions qu'ils soient en interaction ou non. En conséquence, les spectres ATR-FTIR enregistrés ensuite montrent la structure moyenne de toutes protéines présentes dans le milieu. Afin de déterminer uniquement la structure des protéines en interaction avec les bicouches lipidiques, nous avons réalisé l'étude ATR-FTIR des interactions des protéines WT et M8 avec des bicouches lipidiques supportées sur le cristal ATR en germanium.

IV.2. Structure secondaire des protéines WT et M8 en interaction avec les bicouches lipidiques supportées

Nous avons étudié la structure des protéines en interaction avec les bicouches lipidiques hydratés par la spectroscopie ATR-FTIR polarisée. Etant donné que la quantité de protéines utilisée dans nos études était faible (de 7,5 µM et 25 µM, correspondant à ~0,06 mg/mL et 0,2 mg/mL), nous avons effectué l'échange H/D pour pouvoir obtenir des informations structurales sans être gêné par la bande de déformation de l'eau vers 1640 cm^{-1}.

Les bicouches lipidiques ont été formées par fusion des liposomes de lipides (SUV, Small Unilamellar Vesicles) sur le cristal ATR en germanium dans la cellule servant à faire l'échange H/D comme détaillé dans la partie Matériels et Méthodes (A**nnexe I.1.2**, page 194). La **Figure III - 18** présente les spectres ATR-FTIR en polarisation *s* et *p* d'une bicouche d'asolectine. Les spectres montrent nettement les absorptions des vibrations antisymétriques et symétriques des chaînes hydrocarbonées (CH_2) des molécules lipidiques vers 2924 et 2854 cm^{-1}. Les bandes d'absorption vers 1736 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations C=O esters des lipides (**Figure III - 18**, image insérée). L'absorbance de la bande CH_2 antisymétrique en polarisation *p* est $1{,}3.10^{-3}$ et correspond à l'intensité attendue pour une bicouche supportée à la surface du cristal ATR en germanium. Le rapport dichroïque A_p/A_s est de 1,66 pour la bande CH_2 antisymétrique, de 1,63 pour la bande CH_2 symétrique et de 1,54 pour la bande C=O ester. Ces valeurs indiquent que la bicouche est bien orientée pour un lipide fluide comme l'asolectine.

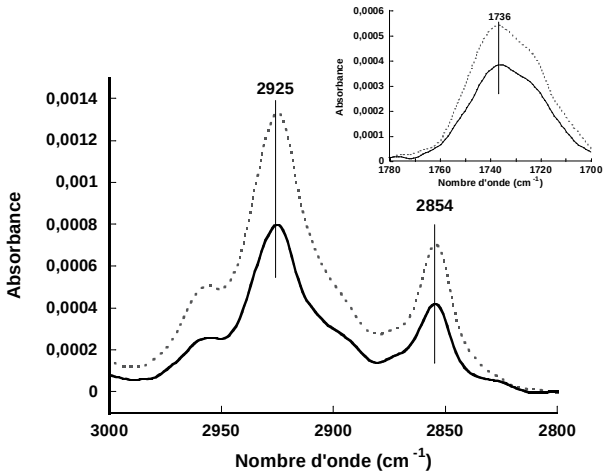


Figure III - 18: Spectres ATR pour la polarisation *p* (courbe pointillée) et pour la polarisation *s* (courbe continue) d'une bicouche d'asolectine formée à la surface du cristal ATR en germanium en éclatant les SUV d'asolectine dans un tampon TBS à pH 7,4 à la température ambiante.

Une fois la bicouche bien formée, les protéines sont injectées dans le puits de la cellule. Après une à deux heures d'incubation à la température ambiante, la cellule ATR est rincée doucement avec du tampon Tris pH 7,4 (3 à 5 fois * 20 µL) afin d'éliminer les protéines n'ayant pas interagit avec les membranes puis l'échange H/D est ensuite réalisé. Les spectres ATR sont enregistrés pour les deux polarisations *s* et *p*. La différence entre des spectres en polarisation *p* et *s* montre l'anisotropie d'orientation des structures. Ce type d'analyse sera présenté par la suite. La somme *s*+*p* des spectres permet de comparer les quantités de protéines adsorbées sur les bicouches lipidiques car cette grandeur n'est quasiment pas sensible à l'anisotropie des molécules. Les sommes *s*+*p* des spectres de WT et M8 en interaction avec des bicouches d'asolectine et DOPC sont représentées sur la **Figure III - 19**.

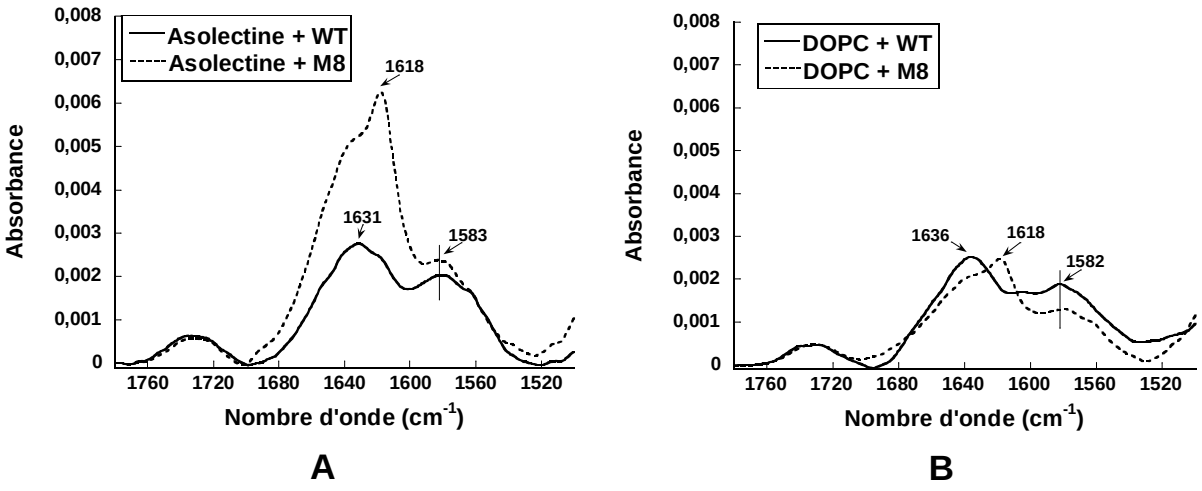


Figure III - 19: Spectres ATR-FTIR des protéines WT (courbe continue) et M8 (courbe pointillée) en interaction avec des bicouches d'asolectine (A) et DOPC (B) dans un tampon Tris à pH 7,4. La concentration en protéine est de 7,5 µM. Les expériences ont été réalisées à la température ambiante.

La présence des bande amide I' sur les spectres (**Figure III - 19**) montre que les deux protéines WT et M8 ont interagit avec les bicouches d'asolectine et de DOPC. La protéine WT a une bande principale à 1631 cm^{-1} en agrégeant sur une bicouche d'asolectine (**Figure III - 19 A,** courbe continue) et à 1636 cm^{-1} en présence d'une bicouche de DOPC (**Figure III - 19 B,** courbe continue). Ces profils correspondent à une structure riche en feuillets β parallèles (Tamm and Tatulian 1997; Goormaghtigh et al. 1994b). La différence de fréquence suggère que la bicouche d'asolectine induit pour la protéine WT une compacité des feuillets plus importantes que l'état induit par la bicouche de DOPC (Marsh 1997). Ce fait est en cohérence avec l'importance de la contribution électrostatique dans les interactions de WT avec les lipides. Pour la protéine M8 on observe une bande intense à 1618 cm^{-1} (**Figure III - 19 A et B**, courbe pointillée) indiquant des feuillets β antiparallèles fortement agrégés dans les deux cas. Cependant, l'effet des interactions électrostatiques, spécifique de M8 avec la bicouche d'asolectine est bien mis en évidence par l'intensité de la bande I' qui est plus de deux fois supérieure comparée à celle obtenue en présence d'une bicouche de DOPC. De même, si l'on compare les spectres des protéines WT et M8 en interaction avec la bicouche d'asolectine, la forte interaction spécifique de M8 avec des bicouches chargées négativement est confirmée.

Les absorptions vers 1582-1583 cm^{-1} dans tous les spectres (**Figure III - 19 A et B**) peuvent être attribuées aux chaînes latérales des résidus arginines et asparagines deutérés (Arginines : 8,3% dans la séquence peptidique de WT et 9,7% dans celle de M8 ; asparagines : 6,9% dans WT et 1,3 % dans M8) (Goormaghtigh et al. 1994a).

L'absorbance à 1631 cm^{-1} ou 1636 cm^{-1} de WT en interaction avec des bicouches d'asolectine ou de DOPC pour les deux polarisations *p* et *s* (**Figure III - 20**) peuvent être attribuée à une structure riche en feuillets β parallèles.

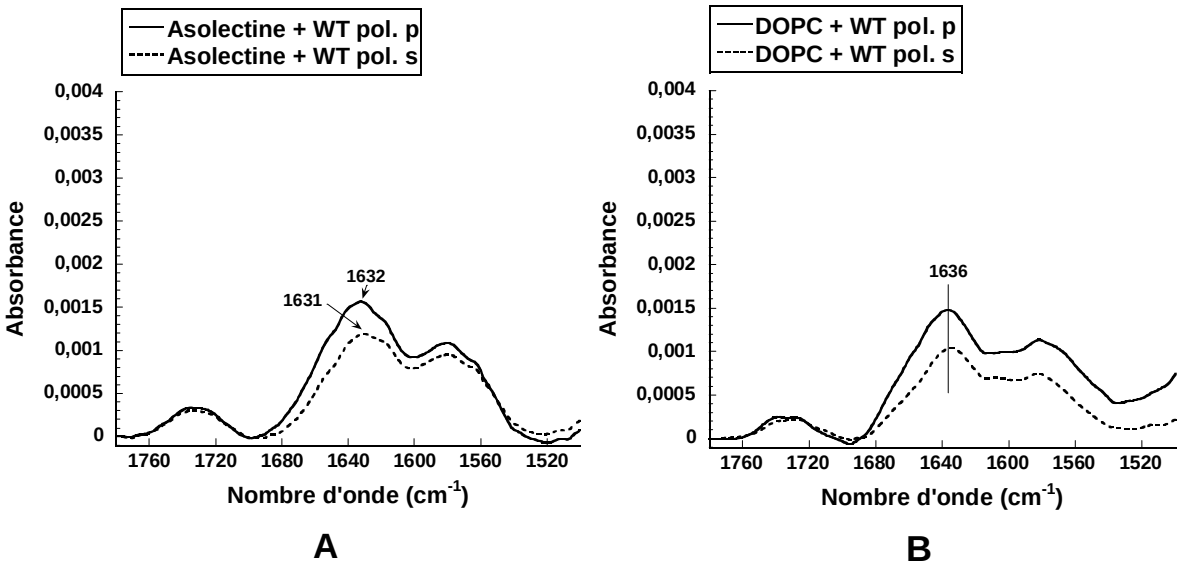


Figure III - 20: Spectres ATR-FTIR de la protéine WT en interaction avec des bicouches d'asolectine (A) et DOPC (B) pour la polarisation *p* (courbe continue) et pour la polarisation *s* (courbe pointillée) dans le tampon Tris à pH 7,4. La concentration en protéine est de 7,5 µM. Les expériences ont été réalisées à la température ambiante.

Les rapports dichroïques de ~1,3 (interaction avec la bicouche d'asolectine) et de ~1,4 (interaction avec la bicouche de DOPC) sur l'amide I sont observés. Si l'on compare ces valeurs avec des simulations réalisées avec le logiciel développé au laboratoire (Buffeteau and Desbat 1989) nous pouvons en déduire que le moment de transition de l'amide I fait un angle moyen de ~30° par rapport à la normale à la bicouche.

Pour M8, l'absorbance à 1618 cm^{-1} en interaction avec des bicouches d'asolectine ou de DOPC pour les deux polarisations *p* et *s* (**Figure III - 21**) est attribuée à une structure riche en feuillets β antiparallèles. Le rapport dichroïque varie de ~1,4 à 1,6 ce qui suggère que le moment de transition de l'amide I est orienté avec un angle d'environ 50° par rapport à la surface de la bicouche d'asolectine et de DOPC.

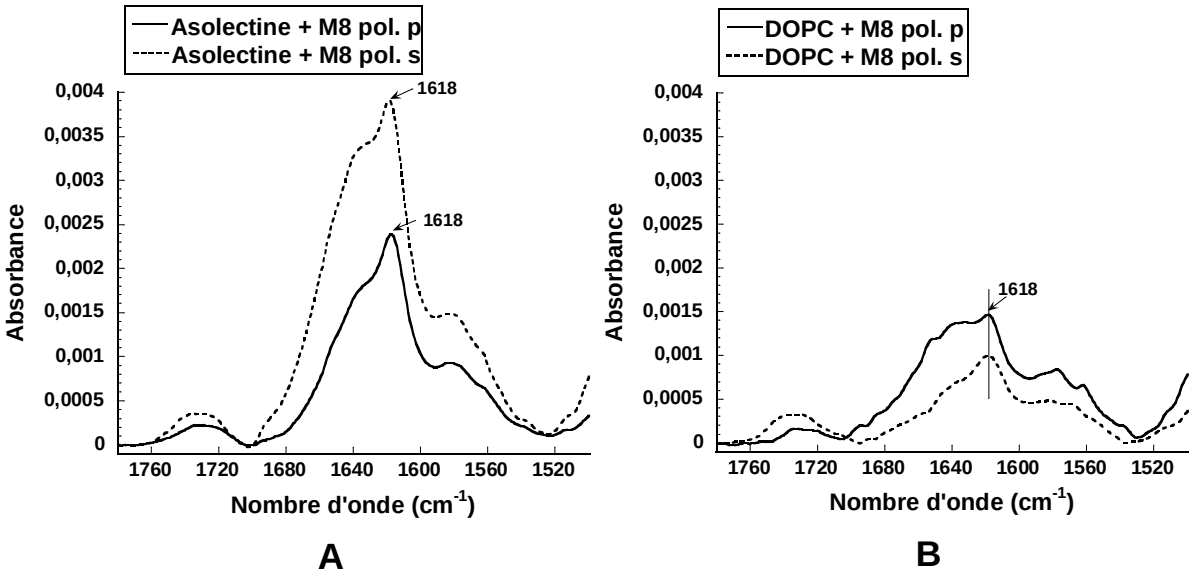


Figure III - 21: Spectres ATR-FTIR de la protéine M8 en interaction avec des bicouches d'asolectine (A) et DOPC (B) pour la polarisation *p* (courbe continue) et pour la polarisation *s* (courbe pointillée) dans un tampon Tris à pH 7,4. La concentration en protéine est de 7,5 µM. Les expériences ont été réalisées à la température ambiante.

Une estimation des pourcentages de la structure secondaire des protéines WT et M8 en interaction avec des bicouches d'asolectine et de DOPC est présentée dans le **Tableau III - 1** :

Tableau III - 1: Estimation des structures secondaires des protéines WT et M8 en interaction avec des bicouches supportées de DOPC et d'asolectine dans un tampon TBS à pH 7,4 à la température ambiante.

Protéines	**+ bicouches lipidiques**					
	Asolectine			**DOPC**		
	β parallèle (%)	**β antiparallèle (%)**	**Autres ***	**β parallèle (%)**	**β antiparallèle (%)**	**Autres***
WT	39	11	50	38	10	52
M8	10	35	55	7	36	57

*Autres : Non assigné à une structure en feuillet β parallèle ou antiparallèle

Ces pourcentages sont similaires à ceux obtenus pour la structure secondaire finale des protéines en interaction avec des liposomes lipidiques.

Conclusion :

- L'interaction de la protéine toxique (M8) avec les bicouches lipidiques sont plus forte que celle du sauvage non toxique (WT).
- Dans ces interactions, l'interaction électrostatique est importante.
- En interaction avec des bicouches lipidiques supportées, la protéine WT s'organise dans une structure riche en feuillets β parallèles alors que la protéine M8 adopte une structure riche en feuillets β antiparallèles. Ces profils sont

similaires de la structure secondaire des fibres formées par les deux protéines en solution.

IV.3. Effets des protéines sur des bicouches lipidiques supportées

Comme nous l'avons montré sur la **Figure III - 19**, la présence des bande AI' après rinçage a confirmé l'adsorption et/ou l'insertion des protéines sur/dans les bicouches. Pour évaluer des changements induits par les protéines WT et M8 au niveau des bicouches, nous nous sommes intéressés aux vibrations méthylène symétrique et antisymétrique car leurs positions et leurs rapports dichroïques sont sensibles à la structure et l'organisation des chaînes hydrocarbonées des lipides (Gray et al. 1996; Tamm and Tatulian 1997). Nous avons également analysé le comportement de la bande d'absorbance C=O ester des lipides.

La vibration d'élongation symétrique du méthylène à 2853-2854 cm^{-1} est caractéristique des chaînes hydrocarbonées à l'état cristal-liquide (Tamm and Tatulian 1997) indiquant que des bicouches supportées d'asolectine et de DOPC (**Figure III - 18**) sont fluides à la température ambiante. Lors de nos expériences nous n'avons pas observé de changements significatifs de la fréquence de cette bande. De plus, les rapports dichroïques de cette bande et de la bande de vibration asymétrique de CH_2 vers 2924 cm^{-1} ne changent pas de façon importante. Il faut remarquer cependant qu'au départ les chaînes lipidiques d'asolectine et de DOPC purs sont déjà très fluides et une augmentation du désordre peut très bien ne pas donner une variation significative des fréquences CH_2. Il est possible également que les interactions des protéines avec les chaînes carbonées soient faibles.

Nous avons détecté que les vibrations phosphates de l'asolectine sont perturbées en présence des protéines alors que ce n'est pas le cas avec le DOPC (**Figure III - 22**). Particulièrement, en interaction avec une bicouche d'asolectine, les vibrations antisymétriques de phosphates sont décalées vers les hauts nombres d'onde quelques soit la protéine (**Figure III - 22 A**) : de 1218 cm^{-1} à 1226 cm^{-1} pour le WT et de 1218 cm^{-1} à 1234 cm^{-1} pour le M8. Cela confirme l'interaction préférentielle entre les charges positives de la protéine et les charges négatives des lipides.

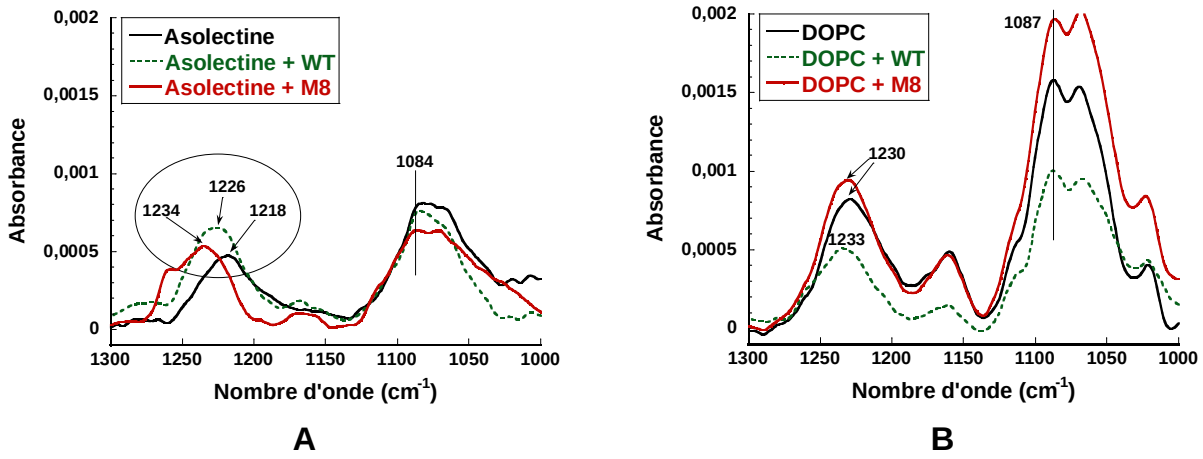


Figure III - 22: Spectres ATR-FTIR *p+s* des groupes phosphates dans les interactions de la protéine WT (courbe verte) et de la protéine M8 (courbe rouge) avec des bicouches d'asolectine (A) et de DOPC (B) dans le tampon Tris à pH 7,4. La concentration en protéine est de 7,5 µM. Les expériences ont été réalisées à la température ambiante.

Conclusion : Il n'y a pas de changements observables sur les vibrations CH_2 au niveau des bicouches en interaction avec les protéines WT et M8 par spectrométrie FTIR, par contre, les groupes phosphates des lipides chargés sont directement perturbés dans les interactions protéine-bicouche chargée négativement.

IV.4. Interactions des fibres matures des protéines WT et M8 avec des bicouches supportées

Dans la littérature, des fibres amyloïdes sont décrites comme étant moins toxiques que des agrégats oligomères (Bucciantini et al. 2002). Nos expériences sur la perméabilisation des liposomes ont montré le faible effet des fibres matures des protéines WT et M8. Nous avons donc étudié l'interaction des fibres de WT et M8 avec une bicouche supportée d'asolectine par la spectroscopie ATR-FTIR. Les fibres matures des protéines (formées dans un tampon PBS à pH 7,4 au moins 1 mois avant les expériences) ont été incubées avec une bicouche d'asolectine formée à la surface du cristal ATR en germanium. Après une heure, la surface a été rincée et les spectres ATR des deux polarisations ont été enregistrés. Les résultats obtenus n'ont montré aucune variation significative au niveau des spectres avant (bicouche seule) et après incubation avec des fibres. **Figure III - 23** présente les sommes de spectres de deux polarisations en interaction de fibres de WT (**Figure III - 23 A**) et de fibres de M8 (**Figure III - 23 B**) avec une bicouche d'asolectine. L'absence des bandes amides I signifie qu'il n'y a pas eu de protéine adsorbée en quantité suffisante sur la bicouche d'asolectine. Nous n'avons observé aucun changement significatif des vibrations C=O esters et des vibrations symétriques et asymétriques des chaînes hydrocarbonées des lipides. Ces résultats confirment

que les fibres amyloïdes matures des protéines amyloïdes WT et M8 ont peu d'affinité pour interagir avec des bicouches d'asolectine.

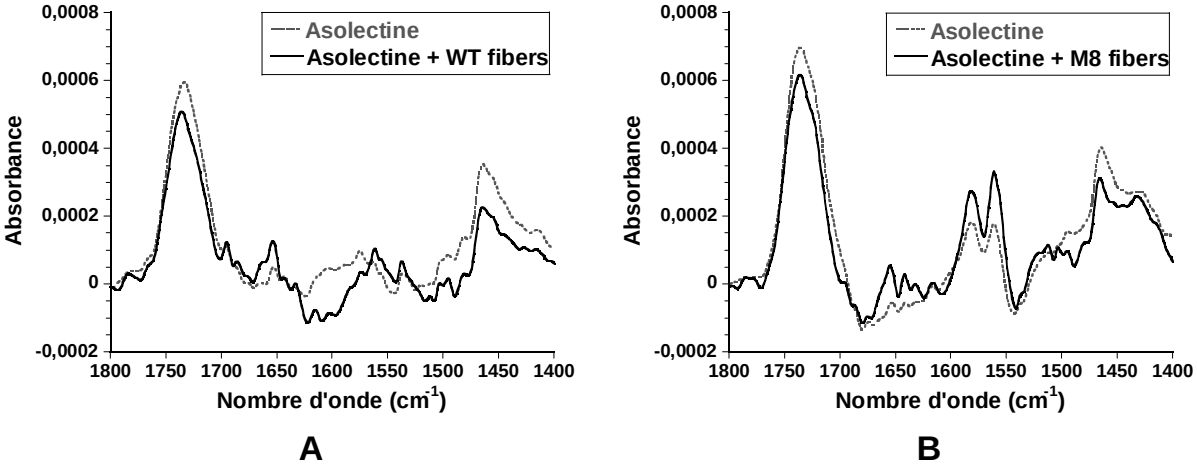


Figure III - 23: Spectres ATR-FTIR d'interaction des fibres de WT (A) et des fibres de M8 (B) avec une bicouche d'asolectine. La concentration en protéine est de 25 µM. Les expériences ont été réalisées à la température ambiante.

Conclusion : Les fibres amyloïdes matures des protéines WT et M8 n'interagissent quasiment pas avec des bicouches d'asolectine.

V. **Conclusions du chapitre**

Plusieurs études ont montré l'implication importante des membranes dans la fibrillation des protéines amyloïdes et donc dans la pathologie amyloïdoses (Bystrom et al. 2008; Hebda and Miranker 2009).

L'adsorption et/ou l'insertion des protéines amyloïdes et leur agrégation au niveau des membranes peuvent perturber les membranes (Kayed et al. 2004; Engel et al. 2008), conduisant à la formation de pores/canaux cationiques bien définis (Kim et al. 2009) (α-synucléine) ; (Quist et al. 2005) (Aβ 1-40, α-synucléine, hIAPP) ou des défauts/anomalies transitoires (van Rooijen et al. 2010) (α-synucléine); (Sonkina et al. 2010) (PrP 185-206). Nos résultats des interactions protéine-lipide sur les bicouches montrent que les protéines amyloïdes WT et M8 perméabilisent des membranes modèles chargées négativement. Les deux protéines s'auto-assemblent sur les bicouches lipidiques et la protéine toxique M8 induit des perturbations membranaires très importantes et irréversibles pouvant expliquer sa toxicité.

Les perturbations induites par des protéines amyloïdes sur des bicouches modèles sont liées fortement au processus de fibrillation et de transition structurale des protéines amyloïdes. Dans notre étude, la fibrillation et la transition structurale en structures riches en feuillets β des protéines WT et M8 sont accélérées par la présence des liposomes lipidiques (DOPG, asolectine). Ces résultats sont en accord avec les résultats reportés dans la littérature

pour différentes protéines amyloïdes, par exemple : l'Aβ (Koppaka and Axelsen 2000; Koppaka et al. 2003; Bokvist and Gröbner 2007; Wang et al. 2011); l'hIAPP (Knight and Miranker 2004) ; le PrP (Dorosz et al. 2009)…

La protéine M8 toxique se structure en une structure riche en feuillets β antiparallèles et perturbent fortement les bicouches membranaires chargées négativement. Cependant, l'effet de la protéine non toxique WT qui se structure en une structure riche en feuillets β parallèles est beaucoup plus faible. Ces résultats comparés aux résultats de Cerf et al. sur la structure β antiparallèle des oligomères toxiques de Aβ 1-42 par rapport à la structure riche en feuillets β parallèles des fibres matures moins ou non toxiques (Cerf et al. 2009) semble indiquer que la toxicité est probablement liée à une structure antiparallèle.

En conclusion, par combinaison de trois techniques de spectroscopie : fluorescence, PWR, ATR-FTIR polarisé, nous avons trouvé que :

- Dans les interactions avec les bicouches chargées négativement, les effets de la protéine toxique M8 sont toujours beaucoup plus importants que ceux du WT.
- Les fibres matures présentent peu d'interaction avec les bicouches lipidiques.
- Dans ces interactions, la protéine WT s'organise en une structure riche en feuillets β parallèles et le M8 : riche en feuillets β antiparallèles.
- La toxicité de la protéine M8 semble liée à sa morphologie, sa structure différentes et ainsi à son effet spécifique sur les lipides membranaires chargés négativement.

Nous avons obtenus des informations sur les interactions des protéines WT et M8 avec les modèles membranaires (monocouches, bicouches). Cependant, dans ces interactions, à un moment donné, plusieurs types d'assemblage (monomère, oligomères, protofibres, fibres) des protéines peuvent venir interagir avec les membranes. Afin de contourner ce problème, nous avons entrepris d'élaborer une cellule microfluidique permettant de séparer les différents types d'agrégat pour ensuite étudier l'interaction de ces assemblages avec les membranes lipidiques par spectrométrie FTIR.

Bibliographie

Alves, I. D., S. M. Cowell, Z. Salamon, S. Devanathan, G. Tollin, and V. J. Hruby. **2004**. Different structural states of the proteolipid membrane are produced by ligand binding to the human delta-opioid receptor as shown by plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *Mol. Pharmacol.* 65 (5):1248-1257.

Alves, I. D., C. K. Park, and V. J. Hruby. **2005**. Plasmon resonance methods in GPCR signaling and other membrane events. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6 (4):293-312.

Berthelot, K., S. Lecomte, J. Gean, F. Immel, and C. Cullin. **2010**. A yeast toxic mutant of HET-s((218-289)) prion displays alternative intermediates of amyloidogenesis. *Biophys. J.* 99 (4):1239-1246.

Bokvist, M., and G. Gröbner. **2007**. Misfolding of Amyloidogenic Proteins at Membrane Surfaces: The Impact of Macromolecular Crowding. *J. Am. Chem. Soc.* 129:14848-14849.

Bucciantini, M., E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli, J. Zurdo, N. Taddei, G. Ramponi, C. M. Dobson, and M. Stefani. **2002**. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416 (6880):507-511.

Buffeteau, T., and B. Desbat. **1989**. Thin-film optical constants determined from infrared reflectance and transmittance measurements. *Appl. Spectrosc.* 43 (6):1027-1032.

Bystrom, R., C. Aisenbrey, T. Borowik, M. Bokvist, F. Lindstrom, M. A. Sani, A. Olofsson, and G. Grobner. **2008**. Disordered proteins: biological membranes as two-dimensional aggregation matrices. *Cell. Biochem. Biophys.* 52 (3):175-189.

Cerf, E., R. Sarroukh, S. Tamamizu-Kato, L. Breydo, S. Derclaye, Y. F. Dufrene, V. Narayanaswami, E. Goormaghtigh, J. M. Ruysschaert, and V. Raussens. **2009**. Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide. *Biochem. J.* 421 (3):415-423.

Demeester, N., G. Baier, C. Enzinger, M. Goethals, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu, and C. Labeur. **2000**. Apoptosis induced in neuronal cells by C-terminal amyloid b-fragments is correlated with their aggregation properties in phospholipid membranes. *Molecular Membrane Biology* 17 (4):219-228.

Devanathan, S., Z. Salamon, G. Lindblom, G. Grobner, and G. Tollin. **2006**. Effects of sphingomyelin, cholesterol and zinc ions on the binding, insertion and aggregation of the amyloid Abeta(1-40) peptide in solid-supported lipid bilayers. *FEBS J.* 273 (7):1389-1402.

Domanov, Y. A., and P. K. Kinnunen. **2008**. Islet amyloid polypeptide forms rigid lipid-protein amyloid fibrils on supported phospholipid bilayers. *J. Mol. Biol.* 376 (1):42-54.

Dorosz, J., R. Volinsky, E. Bazar, S. Kolusheva, and R. Jelinek. **2009**. Phospholipid-induced fibrillation of a prion amyloidogenic determinant at the air/water interface. *Langmuir* 25 (21):12501-12506.

Engel, M. F., L. Khemtemourian, C. C. Kleijer, H. J. Meeldijk, J. Jacobs, A. J. Verkleij, B. de Kruijff, J. A. Killian, and J. W. Hoppener. **2008**. Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (16):6033-6038.

Fukuda, T., E. Matsumoto, S. Onogi, and Y. Miura. **2010**. Aggregation of Alzheimer amyloid beta peptide (1-42) on the multivalent sulfonated sugar interface. *Bioconjug. Chem.* 21 (6):1079-1086.

Goormaghtigh, E., V. Cabiaux, and J. M. Ruysschaert. **1994a**. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds. *Subcell. Biochem.* 23:329-362.

———. **1994b**. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell. Biochem.* 23:405-450.

Gray, C., S. A. Tatulian, S. A. Wharton, and L. K. Tamm. **1996**. Effect of the N-terminal glycine on the secondary structure, orientation, and interaction of the influenza hemagglutinin fusion peptide with lipid bilayers. *Biophys. J.* 70 (5):2275-2286.

Green, J. D., L. Kreplak, C. Goldsbury, X. Li Blatter, M. Stolz, G. S. Cooper, A. Seelig, J. Kistler, and U. Aebi. **2004**. Atomic force microscopy reveals defects within mica supported lipid bilayers induced by the amyloidogenic human amylin peptide. *J. Mol. Biol.* 342 (3):877-887.

Hebda, J. A., and A. D. Miranker. **2009**. The interplay of catalysis and toxicity by amyloid intermediates on lipid bilayers: insights from type II diabetes. *Annu. Rev. Biophys.* 38:125-152.

Hruby, V. J., I. Alves, S. Cowell, Z. Salamon, and G. Tollin. **2010**. Use of plasmon waveguide resonance (PWR) spectroscopy for examining binding, signaling and lipid domain partitioning of membrane proteins. *Life Sci.* 86 (15-16):569-574.

Kayed, R., Y. Sokolov, B. Edmond, M.-T. McIntire, S. C. Milton, J. E. Hall, and C. G. Glabe. **2004**. Permeabilization of Lipid Bilayers Is a Common Conformation-dependent Activity of Soluble Amyloid Oligomers in Protein Misfolding Diseases. *J. Biol. Chem.* 279:46363–46366.

Kim, H.-Y., M.-K. Cho, A. Kumar, E. Maier, C. Siebenhaar, S. Becker, C. O. Fernandez, H. A. Lashuel, R. Benz, A. Lange, and M. Zweckstetter. **2009**. Structural Properties of Pore-Forming Oligomers of α-Synuclein. *J. Am. Chem. Soc.* 131 (47):17482–17489.

Knight, J. D., and A. D. Miranker. **2004**. Phospholipid catalysis of diabetic amyloid assembly. *J. Mol. Biol.* 341 (5):1175-1187.

Koppaka, V., and P. H. Axelsen. **2000**. Accelerated Accumulation of Amyloid b Proteins on Oxidatively Damaged Lipid Membranes. *Biochemistry* 39 (32):10011-10016.

Koppaka, V., C. Paul, I. V. J. Murray, and P. H. Axelsen. **2003**. Early Synergy between Ab42 and Oxidatively Damaged Membranes in Promoting Amyloid Fibril Formation by Ab40. *The Journal Of Biological Chemistry* 278 (38):36277-36284.

Marsh, D. **1997**. Dichroic ratios in polarized Fourier transform infrared for nonaxial symmetry of beta-sheet structures. *Biophys J* 72 (6):2710-2718.

Okada, T., M. Wakabayashi, K. Ikeda, and K. Matsuzaki. **2007**. Formation of toxic fibrils of Alzheimer's amyloid beta-protein-(1-40) by monosialoganglioside GM1, a neuronal membrane component. *J. Mol. Biol.* 371 (2):481-489.

Pastor, M. T., N. Kummerer, V. Schubert, A. Esteras-Chopo, C. G. Dotti, M. Lopez de la Paz, and L. Serrano. **2008**. Amyloid toxicity is independent of polypeptide sequence, length and chirality. *J. Mol. Biol.* 375 (3):695-707.

Quist, A., I. Doudevski, H. Lin, R. Azimova, D. Ng, B. Frangione, B. Kagan, J. Ghiso, and R. Lal. **2005**. Amyloid ion channels: A common structural link for protein-misfolding disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (30):10427-10432.

Salamon, Z., M. F. Brown, and G. Tollin. **1999**. Plasmon resonance spectroscopy: probing molecular interactions within membranes. *Trends Biochem. Sci.* 24 (6):213-219.

Salamon, Z., S. Devanathan, I. D. Alves, and G. Tollin. **2005**. Plasmon-waveguide resonance studies of lateral segregation of lipids and proteins into microdomains (rafts) in solid-supported bilayers. *J. Biol. Chem.* 280 (12):11175-11184.

Salamon, Z., H. A. Macleod, and G. Tollin. **1997**. Coupled plasmon-waveguide resonators: a new spectroscopic tool for probing proteolipid film structure and properties. *Biophys. J.* 73 (5):2791-2797.

Sonkina, S., Tukhfatullina, II, N. Benseny-Cases, M. Ionov, M. Bryszewska, B. A. Salakhutdinov, and J. Cladera. **2010**. Interaction of the prion protein fragment PrP 185-206 with biological membranes: effect on membrane permeability. *J. Pept. Sci.* 16 (7):342-348.

Sparr, E., M. F. Engel, D. V. Sakharov, M. Sprong, J. Jacobs, B. de Kruijff, J. W. Hoppener, and J. A. Killian. **2004**. Islet amyloid polypeptide-induced membrane leakage involves uptake of lipids by forming amyloid fibers. *FEBS Lett.* 577 (1-2):117-120.

Stefani, M., and C. M. Dobson. **2003**. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med. (Berl)* 81 (11):678-699.

Tamm, L. K., and S. A. Tatulian. **1997**. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* 30 (4):365-429.

Valincius, G., F. Heinrich, R. Budvytyte, D. J. Vanderah, D. J. McGillivray, Y. Sokolov, J. E. Hall, and M. Losche. **2008**. Soluble amyloid beta-oligomers affect dielectric membrane properties by bilayer insertion and domain formation: implications for cell toxicity. *Biophys. J.* 95 (10):4845-4861.

van Rooijen, B. D., M. M. Claessens, and V. Subramaniam. **2010**. Membrane Permeabilization by Oligomeric alpha-Synuclein: In Search of the Mechanism. *PLoS One* 5 (12):e14292.

Volles, M. J., S. J. Lee, J. C. Rochet, M. D. Shtilerman, T. T. Ding, J. C. Kessler, and P. T. Lansbury, Jr. **2001**. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* 40 (26):7812-7819.

Wang, Q., N. Shah, J. Zhao, C. Wang, C. Zhao, L. Liu, L. Li, F. Zhou, and J. Zheng. **2011**. Structural, morphological, and kinetic studies of beta-amyloid peptide aggregation on self-assembled monolayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (33):15200-15210.

Chapitre IV.

Développement d'une cellule microfluidique pour l'étude du processus d'assemblage des protéines amyloïdes et de leur interaction avec les membranes par spectroscopie infrarouge

Table des matières

Chapitre IV : Développement d'une cellule microfluidique pour l'étude du processus d'assemblage des protéines amyloïdes et de leur interaction avec les membranes par spectroscopie infrarouge. 163

I. Introduction **165**

II. Hydrodynamique des fluides dans les systèmes microfluidiques 169

II.1. Profile des écoulements 170

II.1.1. Régime d'écoulement 170

II.1.2. Vitesse d'écoulement 171

II.1.3. Perte de charge 171

II.2. Diffusion hydrodynamique dans les systèmes microfluidiques 172

III. Cahier des charges pour la réalisation de la cellule microfluidique 174

III.1. Choix du matériau 174

III.2. Choix de la géométrie 175

III.3. Choix des dimensions du canal 176

IV. Techniques de microfabrication utilisées 176

IV.1. Lithographie 176

IV.2. Gravure 177

V. Résultats obtenus 178

V.1. Vérification de la diffusion des protéines dans le canal microfluidique 178

V.2. Tests de la formation du canal 180

V.2.1. Formation du canal par gravure humide 180

V.2.2. Formation du canal par lithographie 180

V.3. Tests du collage 182

Bibliographie 186

I. Introduction

La protéine PFD HET-s (WT) et son mutant M8 présentent des différences importantes au niveau de leur toxicité vis-à-vis de la levure *S. cerevisiae* (Couthouis et al. 2009), de la morphologie des fibres formées en solution pH 7,4 et de leur structure secondaire (Berthelot et al. 2009). De plus, ces deux protéines ont différentes voies de formation des fibres en fonction du temps (Berthelot et al. 2010). Au cours de l'agrégation du WT dans une solution PBS à pH 7,4, même à des temps courts, on observe par microscopie électronique à transmission (TEM) uniquement des protofibres, des fibres et des paquets de fibres de grandes tailles (quelques µm) (**Figure IV - 1, A**). Ce phénomène peut être dû à une fibrillation très rapide ou à une absence réelle d'intermédiaires (Berthelot et al. 2010). Dans le cas du M8, dans les mêmes conditions d'expériences, la formation d'agrégats de diverses tailles est observée en fonction du temps (**Figure IV - 1, B-F**). On observe tout d'abord des oligomères sphériques de ~10 nm de diamètre, ensuite au cours du temps des agrégats fibreux plus grands se forment (Berthelot et al. 2010).

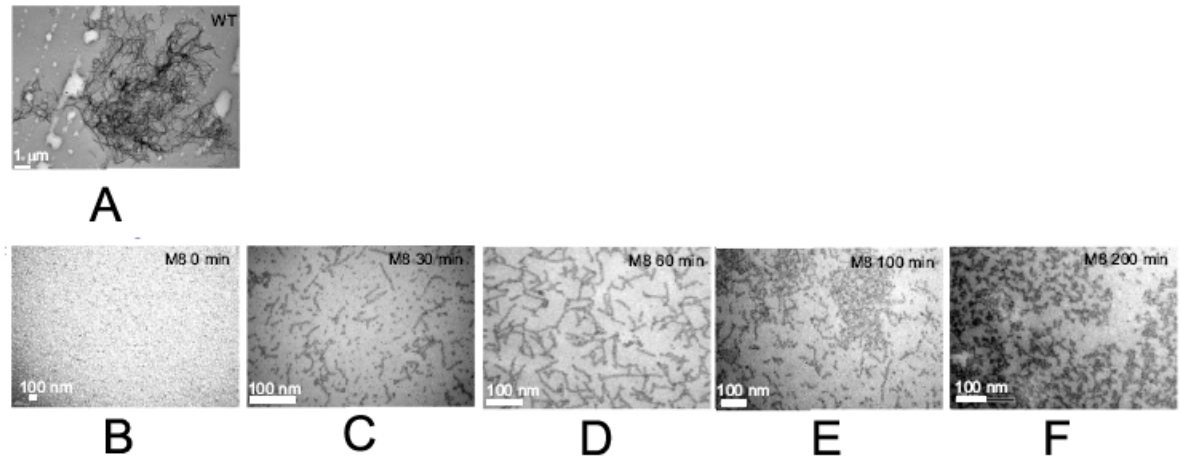


Figure IV - 1: Images TEM des fibres de WT et le processus de polymérisation du M8 (sans agitation). Le tampon est PBS à pH 7,4. La température des expériences est 37 °C. (Extrait de (Berthelot et al. 2010)).

Les résultats reportés dans les chapitres précédemment montrent que ces deux protéines présentent également différents effets sur les membranes modèles. Dans ces expériences, les protéines (WT et M8) sont introduites à l'état monomère (à partir d'une solution de HCl à pH 2). Par conséquent, l'interaction avec des lipides membranaires se produit en parallèle avec l'agrégation des protéines. Il est donc difficile de distinguer des phénomènes propres à chaque type d'agrégat, surtout dans le cas de la protéine M8. Plusieurs études récentes ont montré le rôle important des oligomères solubles dans la toxicité des protéines amyloïdes (Chiti and Dobson 2006). Cependant, il est très difficile d'obtenir des

extraits homogènes d'oligomères afin d'étudier leurs interactions avec les membranes. Dans notre cas, la présence de différents types d'agrégats est observée à différents moments du processus de fibrillation (**Figure IV -** 1). Pour d'autres protéines amyloïdes, les oligomères solubles sont souvent des espèces peu stables formées on- ou off- « pathway» amyloïdogénique (Necula et al. 2007; Goldsbury et al. 2011).

Ce fait montre l'intérêt d'avoir un système de séparation qui arrive à isoler les différents états d'agrégation des protéines amyloïdes afin de les étudier.

La microfluidique se base sur les écoulements de fluides simples ou complexes, mono ou multiphasiques, dans des microsystèmes artificiels, c'est-à-dire des réseaux de canaux de dimensions comprises entre 1 et 1000 µm (Tabeling 2003; Whitesides 2006). Deux caractéristiques : petite taille et écoulements laminaires dans les canaux permettent de contrôler la concentration moléculaire en temps et dans l'espace (Whitesides 2006). Les systèmes microfluidiques permettent donc de réaliser plusieurs opérations de synthèse et d'analyse en moins de temps, en diminuant les réactifs et l'énergie consommés (Hinsmann et al. 2001).

Les systèmes microfluidiques à flux laminaires créent un état stable à un point d'observation donné ce qui permet des acquisitions longues de données en ce point (Kakuta et al. 2003). Cette caractéristique favorise l'observation des phénomènes rapides de l'ordre de la miliseconde (Kaun et al. 2006) qui sont difficilement accessibles par les autres techniques. La microfluidique peut donc être couplée à des techniques de détection qui nécessitent des temps d'enregistrements longs.

A titre d'exemple, les cinétiques de transition de conformation des protéines albumine sérum humaine et anhydrase bovine carbonique ont été suivies à l'aide d'un système microfluidique couplé à la spectroscopie de fluorescence (Kerby et al. 2006). Les systèmes microfluidiques permettent ainsi de faire varier facilement différentes conditions expérimentales qui influencent les réactions observées (Yin et al. 2009). Coupler à la microspectroscopie Raman, elle permet de suivre en temps réels le polymorphe des cristaux $CaCO_3$ formés dans des conditions différentes et d'étudier plus généralement les processus de biominéralisation (Yin et al. 2009)…

Dans le cas des protéines amyloïdes, la connaissance de leurs cinétiques d'agrégation et transitions structurales ainsi que de leurs interactions avec des membranes est indispensable pour comprendre leurs toxicités et les pathologies amyloïdes. La microfluidique offre la possibilité unique de séparer différents d'état d'agrégations des protéines amyloïdes sans les isoler du processus d'agrégation (**Figure IV - 2 A**). Très récemment, Knowles et al. ont publié les premiers travaux pour détecter les premiers états de nucléation d'une protéine modèle (bovine insuline) générés dans des microgouttes et détectés par fluorescence

(Knowles et al. 2011). De plus, les conditions expérimentales peuvent être facilement variées à l'aide des entrées/sorties dans les systèmes microfluidiques. Cela est en effet important pour l'étude des protéines amyloïdes dont l'agrégation est très sensible aux conditions externes (Goldsbury et al. 2011). Pour sa part, la spectroscopie IR donne l'identification de la structure secondaire des protéines dans leurs différents états d'agrégation (**Figure IV - 2 B**). De plus, l'imagerie IR est une des meilleurs techniques qui permettent à la fois la détermination structurale et la distribution spatiale de ces structures (Kazarian 2007). A notre connaissance, à l'heure actuelle, il n'existe pas de système microfluidique qui permet la détection **en ligne** et la caractérisation structurale des protéines par spectroscopie IR dans des conditions physiologiques.

Notre objectif est de développer un dispositif couplant la technique de séparation microfluidique avec la détection **en ligne** par spectroscopie infrarouge.

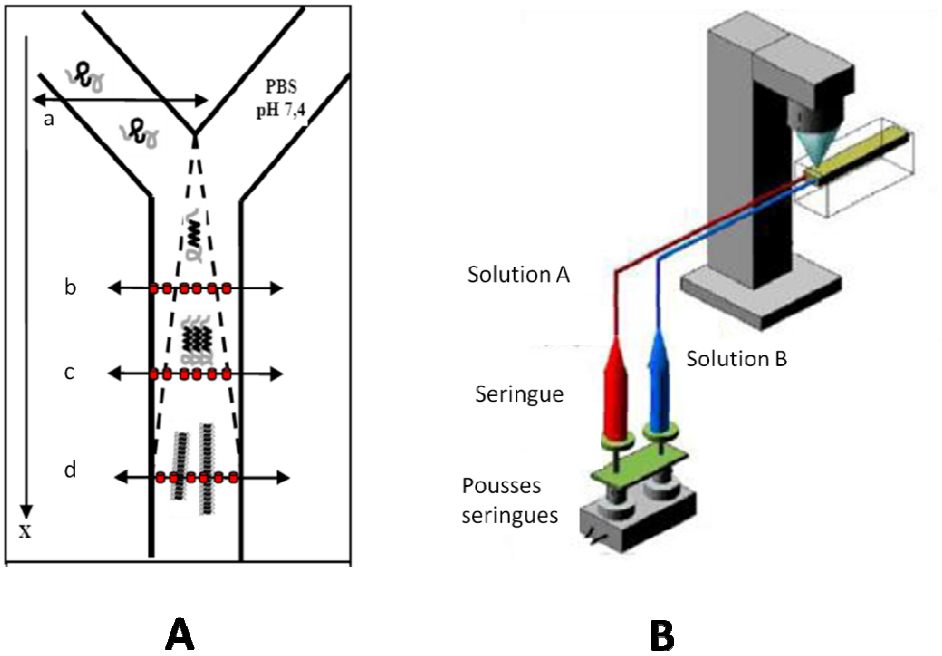


Figure IV - 2: (A) Schéma de séparation des agrégats des protéines amyloïdes dans un canal microfluidique, (B) Montage de détection par IR.

Dans la littérature, des couplages de cellule microfluidique avec la spectroscopie IR ont exploité la propriété des écoulements statiques de la microfluidique (Kakuta et al. 2003; Kulka et al. 2004; Leng et al. 2006). Des cinétiques de réactions très rapides réalisées dans des cellules microfluidiques comme la neutralisation d'acide acétique par la soude (Wagner et al. 2011) ou l'échange isotopique de l'eau avec l'eau lourde ont été étudiée par spectroscopie IR (Kakuta et al. 2003; Kulka et al. 2004). **Figure IV - 3** présente le couplage microfluidique avec la spectroscopie IR pour suivre la cinétique de l'échange isotopique H/D à un intervalle de temps de 0.072 s (Kakuta et al. 2003). Dans ce cas, le mélange peut être réalisé dans une

cellule microfluidique fabriquée avec des matériaux classiques (verre, silicium) puisque la détection se fait à la sortie de la cellule (Bessoth 1999; Kakuta et al. 2003).

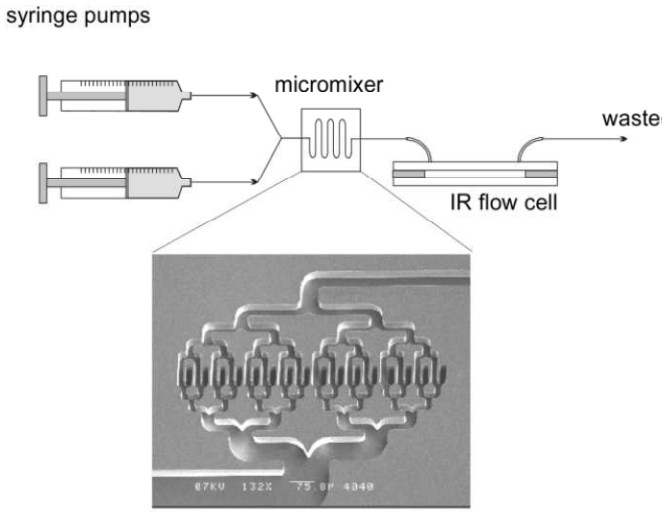


Figure IV - 3: Schéma d'un montage microfluidique couplé à la détection par IR (d'près (Kakuta et al. 2003))

Il existe plusieurs contraintes techniques pour la fabrication des puces microfluidiques adaptables à la détection en infrarouge. Les matériaux traditionnels pour la fabrication des cellules microfluidiques comme le verre, le quartz, le silicium.… (Tabeling 2003) sont faiblement transparents dans le moyen infrarouge (zone spectrale qui permet l'identification des structures secondaires des protéines) (**Figure IV - 4**).

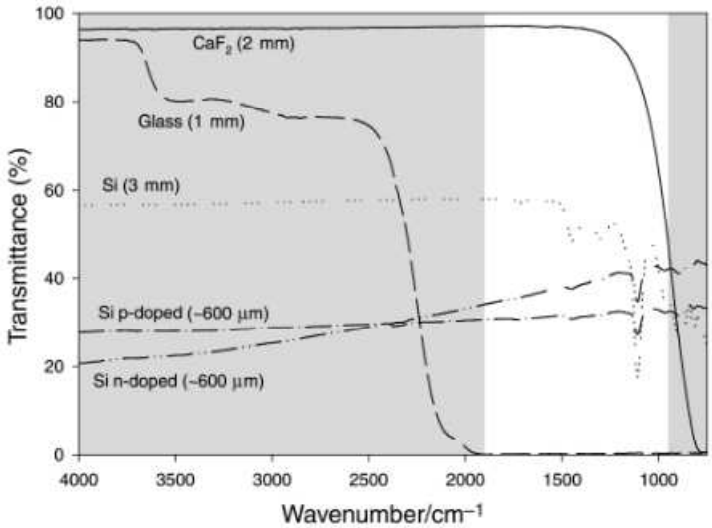


Figure IV - 4: Comparaison de la transmittance dans le moyen infrarouge (longueur d'onde 14–2,5 mm, nombre d'onde 700 – 4000 cm^{-1}) de CaF_2 et de différents matériaux généralement utilisés pour les dispositifs microfluidiques (Hinsmann et al. 2001).

Pour cette raison, le CaF_2 est un matériau de choix pour la fabrication des cellules microfluidiques dédiées à la détection par spectroscopie IR (Hinsmann et al. 2001; Kolhed et

al. 2002; Kulka et al. 2004; Kaun et al. 2006). Quelques cellules microfluidiques pour la détection en infrarouge ont été fabriquées en utilisant des faces CaF_2 : (Pan et al. 2004) (l'épaisseur du canal est ~10 µm) ; (Svasek 2004), épaisseur 15 µm ; (Kulka et al. 2004) 10 µm ; (Kolhed et al. 2002) 15 µm).

La détection des bandes amides I (1600 - 1700 cm^{-1}) est limitée dans les réactions où le solvant est aqueux à cause de la forte absorbance de l'eau vers 1640 cm^{-1}. Pour cette raison, l'épaisseur des canaux ne doit pas dépasser 10 µm afin de ne pas saturer le signal (Hinsmann et al. 2001). Le montage de (Pan et al. 2004) avec une épaisseur de canaux de 100 µm pour séparer et déterminer un mélange de trois acides aminés dans un solvant aqueux ne peut pas être utilisé en IR mais en fluorescence (Pan et al. 2004). L'utilisation de D_2O peut permettre de contourner ce problème et permet d'augmenter le chemin optique. Le montage de Kakuta et al. (2003) avec l'épaisseur des canaux de 25 µm a permis la détection de la transition structurale de l'ubiquitine induit par le méthanol à pH 2 dans D_2O (Kakuta et al. 2003). L'étude d'interaction de l'antibiotique vancomycine et peptide Ac2KAA des bactéries par Kaun et al. par IR a également été réalisée dans D_2O dans une cellule d'épaisseur 10 µm (Kaun et al. 2006).

Pourtant, l'utilisation de D2O est une contrainte bien trop lourde pour l'étude des protéines amyloïdes (purification, manipulation…). Notre objectif est de réaliser une cellule microfluidique avec une épaisseur inférieure de 10 µm.

Nous présenterons premièrement dans ce chapitre un rappel sur l'hydrodynamique des fluides dans un système microfluidique. Puis, nous exposerons le cahier des charges pour la réalisation de la cellule microfluidique permettant le couplage avec la spectroscopie infrarouge. Nous détaillerons en suite les processus de fabrication testés ainsi que nos premiers résultats.

II. **Hydrodynamique des fluides dans les systèmes microfluidiques**

Pour pouvoir utiliser la technique de microfluidique afin d'isoler et de caractériser les différents états d'agrégation des protéines amyloïdes, il est nécessaire de connaître les phénomènes qui se produisent dans un canal microfluidique. En géométrie microfluidique, il existe deux types d'écoulements: les écoulements laminaires monophasiques et les diphasiques. Dans le cadre de notre étude, nous sommes intéressés aux écoulements monophasiques afin de pouvoir suivre la cinétique d'agrégation des protéines amyloïdes.

II.1. **Profile des écoulements**

II.1.1. Régime d'écoulement

La miniaturisation modifie la physique des écoulements. A l'échelle microfluidique, il n'y a aucune turbulence, l'inertie ne joue aucun rôle et les écoulements sont pilotés uniquement par les contraintes de pression dans les canaux et de viscosité des fluides.

Dans le cas général d'un fluide Newtonien, le champ de vitesse **v** d'un écoulement obéit à l'équation de Navier-Stokes :

$$\rho\left(\frac{\delta \boldsymbol{v}}{\delta t} + \boldsymbol{v}.\nabla \boldsymbol{v}\right) = -\nabla p + \eta \Delta \boldsymbol{v} + F \qquad \text{(IV - 1)}$$

où p est le champ de pression, F est une force extérieure exercée par unité de volume, ρ la densité du fluide, et η sa viscosité dynamique. Le champ de vitesse obéit à l'équation de conservation de la masse :

$$\frac{\delta \rho}{\delta t} + div(\rho \boldsymbol{v}) = 0 \qquad \text{(IV - 2)}$$

qui, lorsque le fluide est incompressible devient :

$$div(\boldsymbol{v}) = 0$$

Les écoulements incompressibles, stationnaires et caractérisés par une seul échelle spatiale L sont contrôlés par un unique nombre sans dimensions – le nombre de Reynolds (Tabeling 2003). Ce nombre, correspond au rapport entre les forces inertielles et les forces visqueuses, s'écrit :

$$R_e = \frac{f_{inertielles}}{f_{visqueuses}} = \frac{\rho \boldsymbol{v} L}{\eta} \qquad \text{(IV - 3)}$$

où U et L la vitesse et la longueur caractéristique du fluide.

En microfluidique, dans la grande majorité des applications les forces inertielles sont faibles devant les forces de viscosité, les effets inertiels sont donc négligeables. Lorsque le nombre de Reynolds est petit devant 1, le terme non linéaire de l'équation de Navier-Stokes peut être négligé et le champ de vitesse stationnaire obéit alors à l'équation de Stokes :

$$-\nabla p + \eta \Delta \boldsymbol{v} + F = 0 \qquad \text{(IV - 4)}$$

Dans ces conditions, l'écoulement est laminaire.

Dans les systèmes microfluidiques, le nombre de Reynolds n'excèdent pas 10^{-1} (Tabeling 2003). En général, les premières turbulences apparaissent pour $R_e > 1000$ dans un écoulement de type Poiseuille (**Figure IV - 5 b**) (Laval 2007).

II.1.2. Vitesse d'écoulement

Pour estimer le profil de l'écoulement induit par une surpression dans un canal microfluidique, considérons un canal de largeur w suffisamment grande devant sa hauteur h (**Figure IV - 5 A**) de façon à pouvoir se placer dans l'approximation de la cellule de Hele-Shaw. Un écoulement de Hele-Shaw s'effectue entre deux plaques parallèles, séparées d'une distance bien plus petite que l'échelle de variation du champ de vitesse dans un plan parallèle aux plaques. Cet écoulement est supposé s'effectuer à très bas nombre de Reynolds (Tabeling 2003) ce qui permet de négliger les effets de bords et faire l'hypothèse que l'écoulement est invariant sur toute la largeur du canal.

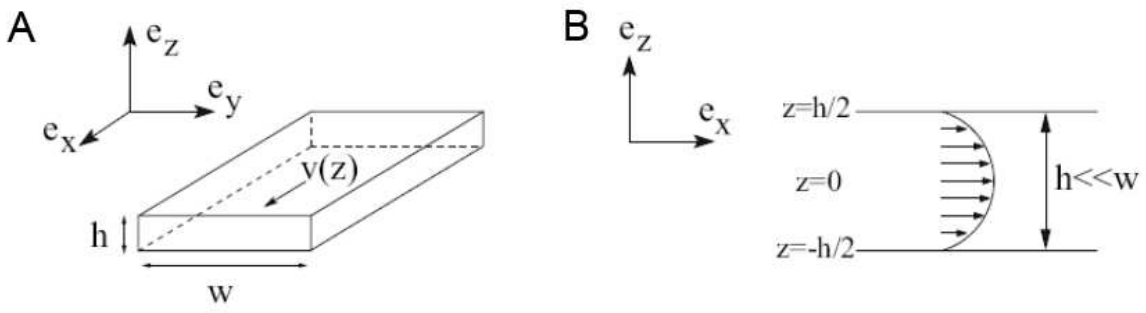


Figure IV - 5: (A) Schéma d'un canal de largeur w grand devant sa hauteur h. ν(z) est le vecteur vitesse du fluide à la position z. Ce canal peut être considéré comme une cellule de Hele-Shaw. (B) Profil d'écoulement de Poiseuille dans le canal. (Extrait de (Laval 2007).

En supposant le fluide incompressible et en appliquant l'équation IV.4, on trouve que le fluide ne s'écoule que selon la direction x et que la vitesse dépend uniquement de z, suivant un profil de type écoulement de Poiseuille comme illustré sur la **Figure IV - 5 B**. Le profil de vitesse du fluide est ainsi parabolique avec des vitesses parallèles aux parois, maximales à mi-hauteur et nulles aux parois. La distribution des vitesses $v(z)$ selon la position z dans le canal est :

$$v(z) = v_{max}\left(1 - \left(\frac{z}{h/2}\right)^2\right) \qquad \text{(IV - 5)}$$

avec v_{max} la vitesse maximale à mi-hauteur du canal.

II.1.3. Perte de charge

La perte de charge le long d'un canal droit de longueur L est la différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal.

La vitesse v_{max} est proportionnelle au gradient de pression P constant selon l'axe x et a pour expression :

$$v_{max} = \frac{h^2}{8\eta}\frac{dP}{dx} \qquad \text{(IV - 6)}$$

Le gradient de pression est relié au débit Q du fluide par l'expression :

$$Q = w\int_{-h/2}^{h/2} v(z)dz = \frac{h^3}{12\eta}\frac{dP}{dx} \qquad \text{(IV - 7)}$$

La perte de charge est donnée par :

$$\Delta P = \frac{12L\eta}{h^3 w}Q \qquad \text{(IV - 8)}$$

Par analogie avec la résistance électrique, le rapport $\Delta P/Q$ représente la résistance hydrodynamique du canal. Elle varie proportionnellement avec la viscosité du fluide et augmente très vite quand la hauteur h diminue. Les pressions atteintes pour imposer des débits peuvent donc rapidement devenir importantes si les canaux sont de petites dimensions ou si les fluides sont visqueux. D'un point de vue pratique, si la pression à appliquer dépasse quelques bars, il faut utiliser des connectiques appropriées permettant l'injection des fluides. L'approximation de la cellule de Hele-Shaw permet à la fois d'obtenir rapidement une estimation du profil de vitesse et de se rendre compte des effets d'échelle sur la perte de charge dans un canal. Dans le cas plus général d'un canal de largeur *w* et de hauteur *h*, les expressions du profil de vitesse et de la résistance hydrodynamique sont sensiblement plus complexes car il faut tenir compte des variations de l'écoulement selon *y* (Laval 2007).

II.2. **Diffusion hydrodynamique dans les systèmes microfluidiques**

Les systèmes microfluidiques sont déjà largement utilisés pour étudier les cinétiques de réactions. Deux types d'expérimentations sont réalisés :

- Soit une approche monophasique par co-écoulement de deux fluides en parallèle (Kerby et al. 2006; Kaun et al. 2006).
- Soit une approche biphasique par écoulement de gouttes dans un fluide porteur (de l'huile dans de l'eau ou l'inverse) (Srisa-Art et al. 2008; Knowles et al. 2011).

Pour l'étude de la cinétique de formation des fibres amyloïdes, dans les conditions imitant les conditions physiologiques, les solutions impliquées sont toutes des phases

aqueuses. Nous souhaitons étudier la cinétique d'agrégation des protéines par l'approche monophasique que nous allons maintenant détailler.

Les écoulements de bas nombre de Reynolds dans les systèmes microfluidiques sont laminaires, le mélange entre les fluides se fait uniquement par diffusion moléculaire. Lorsqu'un solvant et un soluté sont injectés dans un canal en forme de Y comme présenté sur la **Figure IV - 6**, les liquides s'écoulent en parallèle et le soluté diffuse dans le solvant.

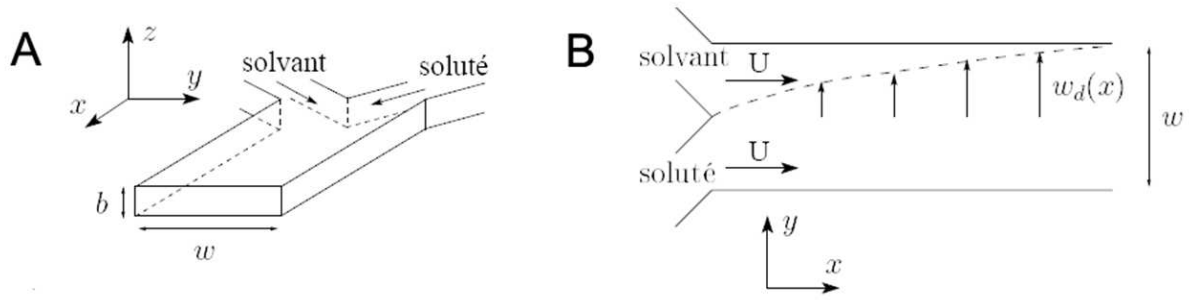


Figure IV - 6: (A) Schéma d'un canal en forme de Y dans lequel sont injectés le solvant et la solution de soluté. Lorsque les deux solutions pénètrent dans le canal principal à une vitesse moyenne *v*, le mélange se fait uniquement par diffusion. (B) Le profil en pointillé délimite le domaine caractéristique de diffusion du soluté dans le solvant. Cette figure est adaptée de la référence (Laval 2007)

La diffusion dépend de la mobilité des molécules de soluté dans le solvant, c'est-à-dire du mouvement brownien des molécules. Cette mobilité est caractérisée par **le coefficient de diffusion D**. Le coefficient de diffusion d'une molécule est estimé par la formule de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{\mathrm{kT}}{6\pi \mathrm{R}\eta} \qquad \text{(IV - 9)}$$

avec k la constante de Boltzmann, R le rayon des molécules diffusantes assumées être sphériques, T la température absolue.

Quelques valeurs de coefficient de diffusion des molécules dans l'eau à 20°C sont présentées dans le **Tableau IV - 1** (Tabeling 2003).

Tableau IV - 1: Valeurs de coefficients de diffusion de molécules dans l'eau à 20 °C (Tabeling 2003)

Soluté	**D (cm^2/s)**
Eau	10^{-5}
Fluorescéine	3×10^{-6}
Sucrose	$4{,}6 \times 10^{-10}$
Myosin	$1{,}2 \times 10^{-11}$

La distance de diffusion, notée w_d augmente progressivement le long du canal. Le temps de diffusion de la molécule est égale à :

$$t_m = \frac{{w_d}^2}{D} \qquad \text{(IV - 10)}$$

Le nombre de Péclet P_e est un nombre adimensionnel extrêmement important, qui traduit l'importance des effets de convection sur les effets diffusifs. Sa détermination permet d'estimer si le mélange peut être réalisé dans un canal :

$$P_e = \frac{t_{diffusion}}{t_{convection}} = \frac{vw}{D} \qquad \text{(IV - 11)}$$

avec w la largeur du canal.

Dans les microsystèmes, il n'y a pas d'ordre de grandeur caractéristique pour le nombre de Péclet.

Si Pe $\gg 1$, cela signifie que la diffusion est lente par rapport au déplacement du fluide dans le canal. Dans ce cas, il faut que les fluides s'écoulent sur une distance très grande pour que le mélange entre les deux composés devienne homogène (dans le cas de la **Figure IV - 6**, cette distance est de l'ordre de $P_e w/16)$ (Laval 2007).

III. Cahier des charges pour la réalisation de la cellule microfluidique

Notre objectif est d'étudier l'auto-assemblage du PFD de HET-s et du mutant M8 dans un canal microfluidique afin de détecter les variations de structure et/ou organisation du monomère à la fibre mature par spectrométrie FTIR. Ensuite, nous voulons étudier l'interaction de différents états d'agrégation des protéines avec les membranes modèles. Ce couplage nous impose des contraintes de fabrication pour la cellule microfluidique.

III.1. Choix du matériau

Nous avons choisi le CaF_2 pour fabriquer nos cellules car sa transmittance est près de 95% dans la zone spectrale de 1400-1600 cm^{-1} (**Figure IV - 4**), ce qui nous permettra d'observer les bandes amide I et amide II des protéines et ainsi d'élucider leur structure secondaire.

Pour la formation des canaux, dans la littérature, deux processus sont utilisées : soit les bords des canaux sont formés par le CaF_2 lui-même en effectuant la **gravure** sur les faces CaF_2 (Pan et al. 2004) (avec l'épaisseur du canal est ~10 µm) soit ces bords sont formés par des **résines photosensibles** (par exemple : la résine négative SU-8 (Svasek 2004, épaisseur 15

µm ; Kulka et al., 10 µM (Kulka et al. 2004); Kölhed et al. ((Kolhed et al. 2002)) 15 µm)). Dans notre étude, nous avons essayé les deux possibilités.

III.2. **Choix de la géométrie**

L'utilisation du cône de diffusion dans les canaux microfluidiques comme détaillé dessus permettrait de déterminer la cinétique de formation des fibres amyloïdes par spectroscopie infrarouge.

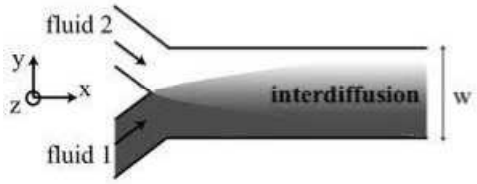


Figure IV - 7: Cône d'interdiffusion de deux fluides injectés dans les deux entrées du canal microfluidique

La distance de diffusion w_d augmente progressivement le long du canal formant un cône de diffusion (**Figure IV - 8**). Le flux étant laminaire, dans les conditions constantes de débit, de température et de viscosité, la concentration en soluté en un point donné reste invariable. Cette propriété permet d'accumuler les spectres IR de même sujet (en un point) afin d'obtenir un rapport S/N suffisant.

L'auto-assemblage des protéines PFD HET-s (WT) et M8 est induite par un changement de pH passage de pH 2 à pH 7,4. En injectant les protéines monomériques en solution dans HCl à pH 2 dans un canal (A) et le tampon à pH 7,4 (par example le PBS) dans un autre canal (B), nous formons dans le canal central un cône d'interdiffusion en concentration de la protéine et du pH. La diffusion très lente dans le canal ralentit considérablement l'agrégation de protéines (formée en variant le pH de la solution) et par conséquent favorise l'observation des espèces formées à chaque temps de réactions. L'enregistrement des spectres infrarouges en combinaison avec la détermination de pH à différents points dans ce cône permet de corréler le changement de la structure secondaire des protéines avec la variation du pH de la solution. En optimisant les débits, un contrôle de pH à valeur physiologique permettra d'étudier la cinétique d'agrégation des protéines en suivant l'évolution des spectres FTIR le long du cône de diffusion.

Nous avons donc opté pour un modèle simple de canal en Y dans un premier temps.

III.3. **Choix des dimensions du canal**

Due à la perturbation de la bande d'absorption de δ_{OH} de l'eau vers 1640 cm^{-1}, qui se trouve dans la zone spectrale de la bande AI des protéines, l'épaisseur de la cellule microfluidique pour étudier des protéines amyloïdes dans des conditions physiologiques (solvant aqueux) ne doit pas dépasser 10 µm.

La principale caractéristique des écoulements à bas nombre de Reynolds est que le mélange entre les fluides se fait uniquement par un mécanisme de diffusion. Le temps caractéristique pour que la diffusion soit complète est proportionnel à la largeur du canal (**équation IV.10**). Ainsi, pour réduire le temps de diffusion, il faut diminuer la largeur du canal. Pourtant, cela entrainera une perte de charge très importante qui peut décoller la cellule microfluidique. Il faut donc optimiser cette valeur afin d'avoir un temps de diffusion approprié.

IV. **Techniques de microfabrication utilisées**

Dans les systèmes microfluidiques, les dimensions sont de l'ordre de 1-1000µm. La formation des motifs microfluidiques dans un substrat est faite à l'aide des techniques de microfabrication. Nous allons commencer par la lithographie qui est le point de départ de la microfabrication puis nous décrirons la technique de gravure pour former des canaux dans les cellules microfluidiques.

IV.1. **Lithographie**

La lithographie consiste à déposer un motif défini de résine sur un substrat (verre, silicium…). Cela se fait par plusieurs étapes comme schématisées sur la **Figure IV - 8** (**a-d**). D'abord une couche mince de résine photosensible est déposée sur le substrat par la technique de « spin-coating » (**Figure IV - 8 a**). L'épaisseur de la couche dépend de la vitesse de la tournette et de la viscosité de la résine. Le solvant restant dans la couche de résine est enlevé par l'étape de « pre-exposure bake » qui consiste à chauffer le substrat avec la couche de résine dessus à une température appropriée pendant un temps donné. Ensuite, la couche est ensuite exposée à une radiation UV (365 nm ou 405 nm) à l'aide d'un aligneur (Suss Microtech MJb4) à travers un masque comportant des domaines transparents et opaques correspondant au motif désiré (**Figure IV - 8 b**). Si la résine est positive, comme le S1818 ou SPR 220, l'insolation dégrade les liaisons chimiques entre les molécules de polymères, si elle est négative, comme le SU-8 (Micro Chem, MA, USA), l'insolation permet la réticulation de la résine irradiée. Une nouvelle étape de chauffage permet de finaliser la réticulation. La dernière étape de la lithographie est le développement ou dissolution de la partie irradiée pour

les résines positives (**Figure IV - 8 c**) (pattern identique) et de la partie non irradiée pour les résines négatives (**Figure IV - 8 d**) (pattern renversé) à l'aide d'un solvant spécifique. Nous avons utilisé les solvants basiques MF319 et MF351 (Shipley, Marlborough, MA, USA) pour le développement.

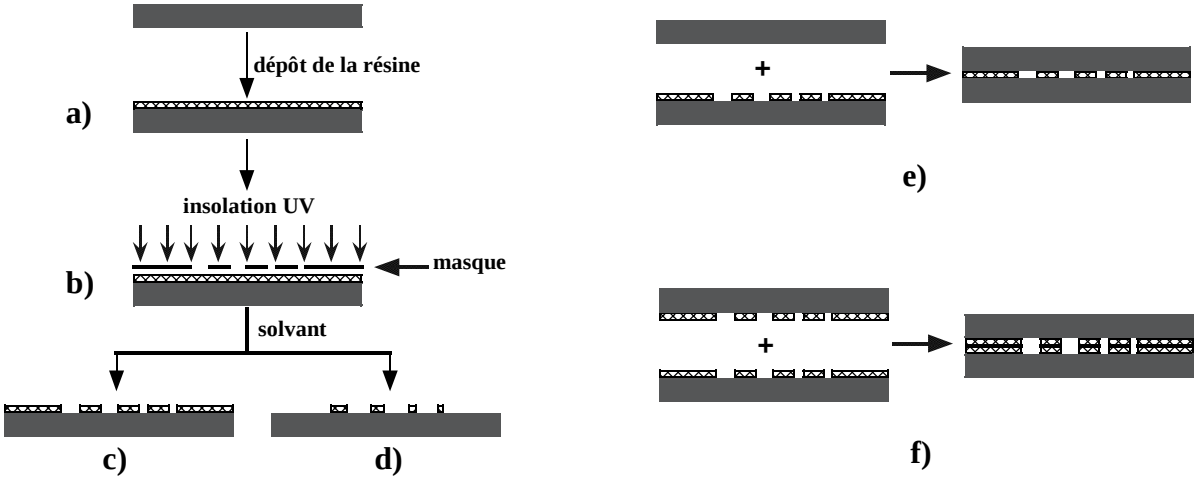


Figure IV - 8: Méthode de déposition d'une couche mince de résine positive (c) et de résine négative (d) sur un substrat par la lithographie douce. Formation de la cellule microfluidique en collant une face résinée avec une face CaF_2 (e) ou en collant 2 faces résinés (f).

La profondeur des canaux formés est ensuite mesurée à l'aide d'un profilomètre Dektak 6M.

IV.2. **Gravure**

La gravure permet définir un motif dans un substrat à des endroits déterminés au préalable lors de l'étape de lithographie. Il y a deux types de gravures (Tabeling 2003):

- La gravure humide : les canaux sont faits par une attaque chimique d'un solvant approprié.
- La gravure sèche : les canaux sont formés par une attaque physique (laser ou des faisceaux ioniques accélérés).

Nous avons testé dans un premier temps la gravure humide pour la formation des canaux.

La gravure humide utilise des réactifs de différentes natures selon le substrat à graver en phase liquide. Par exemple, pour graver le CaF_2 une solution saturée de sel de Mohr ($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$) est utilisée (Pan et al. 2004).

D'abord, une couche de résine est déposée sur la face CaF_2 et le motif du canal est défini par lithographie. La face opposée du substrat est couvert d'une couche de vernis à ongle pour la protéger. Le substrat est ensuite placé dans un bain de sel de Mohr qui va attaquer les canaux du substrat (non protégés par la résine et le vernis). Une agitation magnétique est appliquée pour homogénéiser la solution afin de favoriser une attaque

homogène sur l'ensemble du canal. La profondeur de la gravure est contrôlée par le temps de réaction et la vitesse d'agitation. Ce type de gravure conduit souvent à des canaux de forme circulaire car la gravure se fait de manière isotrope. Pour graver le verre, le réactif le plus couramment utilisé est l'acide fluorhydrique. En plus de la couche de résine, afin d'éviter une attaque trop prononcée du substrat par l'acide, le substrat est couvert préalablement par une couche protectrice en métal. Après la gravure, la résine restée et le vernis à ongle sont éliminés par l'acétone.

V. **Résultats obtenus**

La fabrication des cellules microfluidiques a été réalisée au LOF (laboratoire du Futur), Rhodia/CNRS/Universités de Bordeaux. Les spectres infrarouges ont été enregistrés utilisant un couplage d'un spectromètre IR Nicolet 6700 et un microscope Nic-Plan (ISM – Institut des Sciences Moléculaires, CNRS/Université Bordeaux 1/Institut Polytechnique de Bordeaux).

V.1. **Vérification de la diffusion des protéines dans le canal microfluidique**

En premier lieu, nous avons voulu tester la possibilité de diffusion d'une protéine dans le canal.

Nous avons réalisé une cellule microfluidique en CaF_2 d'épaisseur ~100 µm en utilisant un film d'une résine photosensible (Dupont WBR Serie 200). Ce travail est réalisé par Thierry Robin, étudiant en stage de master 2, 1er semestre 2011. Cette cellule a été utilisée pour observer par spectroscopie infrarouge la diffusion d'une protéine dans le canal. Le montage expérimental est présenté sur la **Figure IV - 9**.

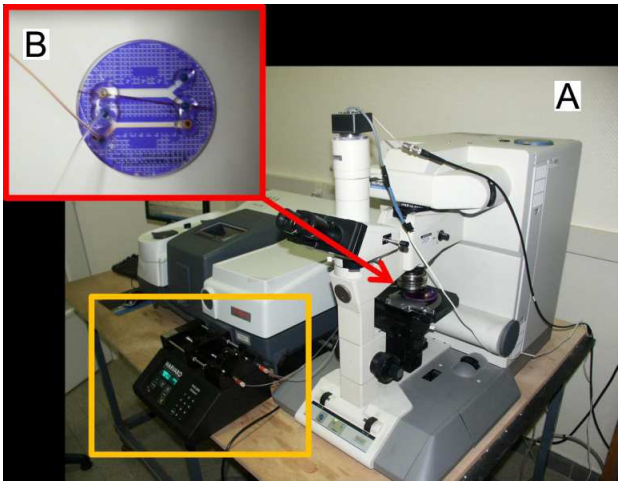


Figure IV - 9: (A) Montage expérimental : spectromètre IR Nicolet 6700 (gauche) couplé à un microscope Nic-Plan (droite). Le pousse-seringue (cadre orange) injecte les solutions dans la cellule microfluidique. La cellule est posée sur le porte objet du microscope infrarouge (flèche rouge) (B) Photographie de la cellule microfluidique avec un canal d'une épaisseur de 100 µm.

La protéine de test choisie est le cytochrome c (masse moléculaire ~12 kDa). Elle est injectée en solution de 15 mg/mL dans D_2O dans une entrée, et D_2O seul est injecté dans l'autre entrée. Les spectres infrarouges sont enregistrés en différents points (voir **Figure IV - 10**). La bande d'amide I' vers 1650 cm^{-1} sur les spectres à gauche est attribuée à la structure en hélice α du cytochrome c. La bande d'absorption vers 1550 cm^{-1} sur les spectres à droite est attribuée à la vibration de combinaison de D_2O (Herzberg 1989). L'amide II' est observé à 1457 cm^{-1}. La quantité de protéine détectée à différents endroits du canal par les spectres IR illustre bien l'existence d'une zone de diffusion au sein du canal (**Figure IV - 10**). En point 1, 2, 3, on observe seulement la bande liée à la présence de D_2O. Les points 4 et 5 mettent en évidence la présence du cytochrome c dans le canal. La quantité de cytochrome c est plus importante en point 5 qu'en point 4. Cette propriété est attendue pour la formation d'un cône de diffusion au sein du canal (**Figure IV - 7**). Vers la fin du canal, l'augmentation de l'absorption vers 1650 cm^{-1} au point 4' par rapport au point 4, et la détection de cette bande (1650 cm^{-1}) au point 3' indique une diffusion du cytochrome c dans le canal principal. Ces résultats valident la diffusion des protéines dans nos conditions expérimentales, et valident ainsi notre approche.

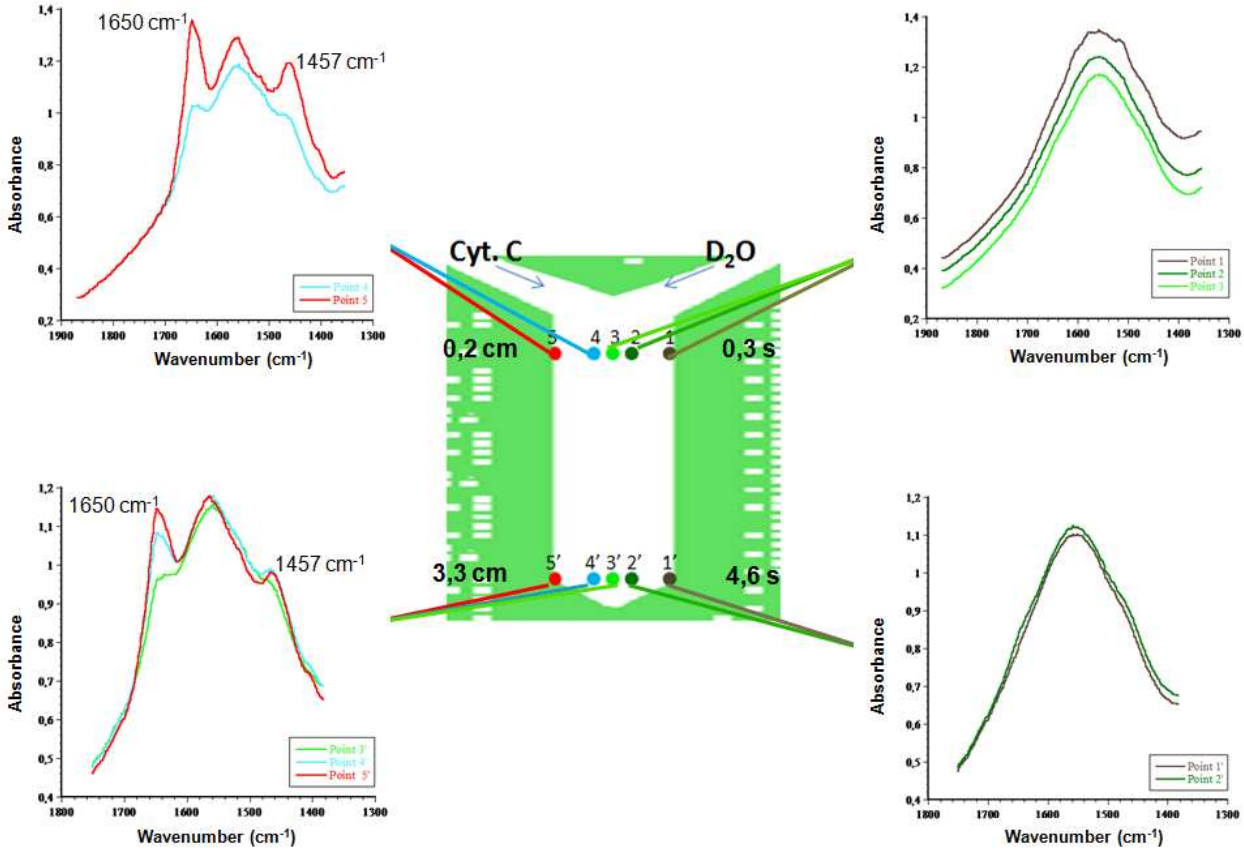


Figure IV - 10: Spectres IR en différents points au sein du canal microfluidique lors de l'injection d'une solution de cytochrome c et d'une solution de D_2O dans deux entrées du canal. Les dimensions du canal est 100 µm de l'épaisseur, 3,5 cm de la longueur et 0,5 cm de la largeur.

Néanmoins, nous ne pouvons pas envisager de faire nos études en milieu D_2O, ainsi les résultats suivant présentent la fabrication d'une cellule avec une épaisseur inférieure à 10 µm.

V.2. **Tests de la formation du canal**

V.2.1. Formation du canal par gravure humide

Dans un premier temps, nous avons testé la fabrication des canaux par gravure sur une face CaF_2 dans une solution saturée de sel de Mohr ($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$). Pour la lithographie, les résines positives S1818 (Shipley, Marlborough, MA, USA) et SPR 220 (Rohm and Haas, Philadelphia, PA, USA) sont utilisées. A 20°C avec agitation de 1000 rpm, la vitesse de gravure est ~0,27 µm par heure. Des canaux de profondeurs différentes sont formés (5-7 µm).

Pourtant, après la gravure, nous avons observé beaucoup de rugosité sur les faces CaF_2 et dans les canaux (à l'aide d'un profilomètre). Cette propriété peut favoriser l'agrégation des protéines aux bords des canaux. De plus, les tests de collages faits ensuite ont montré une faible adhésion entre les faces en CaF_2. Ces tests sont faits en utilisant une couche de résine positive (S1818 ou SPR 220) déposée sur une autre face CaF_2 comme une colle pour coller avec la face gravée. Deux faces CaF_2 sont mises en contact avant d'être chauffées dans une étuve à 135 °C en différent temps.

Ces caractéristiques ne sont pas appropriées pour nos objectifs.

V.2.2. Formation du canal par lithographie

Nous avons donc décidé d'essayer les résines photosensibles à la fois pour la formation des canaux et le collage. L'épaisseur de la couche de résine sera la profondeur des canaux formés.

Vue la difficulté d'avoir un collage robuste entre 2 faces CaF_2, la nature cassante de CaF_2 et le prix couteux des faces, nous avons opté pour optimiser les protocoles sur verre dans un premier temps et ensuite transposer sur les faces de CaF_2 (voir **Figure IV - 11**).

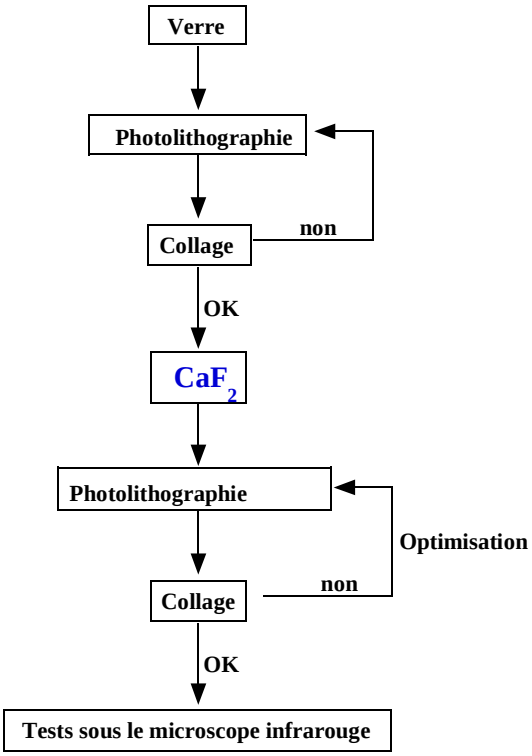


Figure IV - 11: Protocole pour optimiser la fabrication la cellule microfluididque en CaF_2

Dans un premier temps, des tests sur la profondeur du canal en fonction de la résine utilisée et des conditions expérimentales (voir **Tableau IV - 2**) sont réalisés. Les résultats sont présentés surs la **Figure IV - 12**. La courbe de SPR220 montre que dans les conditions utilisées pour avoir une épaisseur environ 10 µm, soit il faut faire le « spincoating » à ~1200 rpm sur une des deux faces soit à ~6000 rpm sur deux faces. La courbe de S1818 montre que pour avoir un canal de ~10 µm de profondeur, il faut associer deux faces résinées, « spincoating » à ~500 rpm.

Tableau IV - 2: Les conditions utilisées pour les premiers tests de lithographie

Résine	Temps de spin coating (s)	Soft bake	Exposure (s)	Développement
S1818	45	180 s/115°C	15	180 s/ MF319
SPR220	40			

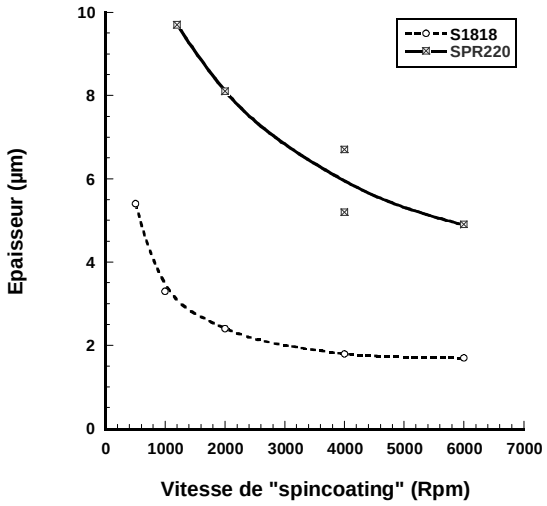


Figure IV - 12: Profondeur du canal en fonction de la vitesse du « spincoating » (x_{rpm})

V.3. **Tests du collage**

Pour construire les cellules microfluidiques en CaF_2 d'épaisseur maximum 10 µm, la méthode de collage est très importante pour assurer la robustesse mécanique des systèmes sous l'influence de la pression des écoulements.

Les premiers tests d'optimisation sont faits sur plaque de verre. Nous avons d'abord utilisé des résines positives (SPR 220 et S1818) pour la fabrication de canal car elles peuvent être très facilement éliminées afin de recycler les faces (surtout pour les faces CaF_2 après).

D'abord, nous avons testé le collage à l'étuve en utilisant des épingles pour tenir les faces en contact. Différentes conditions de collage ont été testées avec « hard bake » ou sans « hard bake » (**Tableau IV - 3**):

Tableau IV - 3: Les conditions de tests pour optimiser le collage à l'étuve de SPR220

Prebake		Exposure	Post bake		Développement	Hard bake		Collage	
Temp. # (°C)	Time (min*)		Temp. (°C)	Time (min)	(soit dans MF351 soit dans MF319)	Temp. (°C)	Time (min)	Temp. (°C)	Time (min)
115	1,5	45 s	115	1,5	3	135 ; 150 ; 180	1/3 ; 0,5 ; 2/3 ;	135	20 ; 40 ; 60 ; 120
115	1,5	45 s	115	1,5	3	non	non	135	30

Temp.= Température ; * min=minutes

Ces tests de collage sont faits entre une face résinée avec une face de verre (**Figure IV - 8 e**) ou entre 2 faces résinées (**Figure IV - 8 f**). Dans les cas où les faces résinées sont traitées avec un « hard bake », soit il n'y a pas d'adhésion entre les faces après le collage, soit le collage ne tient pas au cours du temps. Dans les cas où il n'y a pas de traitement par « hard bake », après le collage à l'étuve, les faces sont associées mais seulement au niveau des

épingles (si une face résinées) soit dans la zone qui connecte deux épingles (si 2 faces sont résinées). Cela signifie qu'il n'y a pas de contact étroit sur toute l'interface entre deux faces.

A partir de ces résultats, nous avons conclu que le collage à l'étuve en utilisant des épingles n'est pas approprié et que le « hard bake » semble vieillir ou dégrader la résine.

Nous avons donc testé le collage sous la presse chauffante. Les tests de collages sont faits à 6 bars (la pression maximale disponible), à 115 °C à l'aide de 2 supports métalliques parfaitement plans. En variant les conditions de la lithographie et le temps d'application de la presse, nous avons constaté une perturbation importante liée à la présence des poussières dans l'air (car la taille d'une poussière n'est pas négligeable à une échelle de dizaine µm) ainsi la non-homogénéité de la couche de résine au niveau des trous qui servent à l'entrée et à la sortie des canaux. Nous avons également trouvé qu'avec les temps de presse de plus de 1 minute, il y a la formation des chemins imprévus entre deux faces soit par des rétractions de la résine entre deux faces en verre soit par des poches d'air qui sont emmagasinées lors du collage (**Figure IV - 13**).

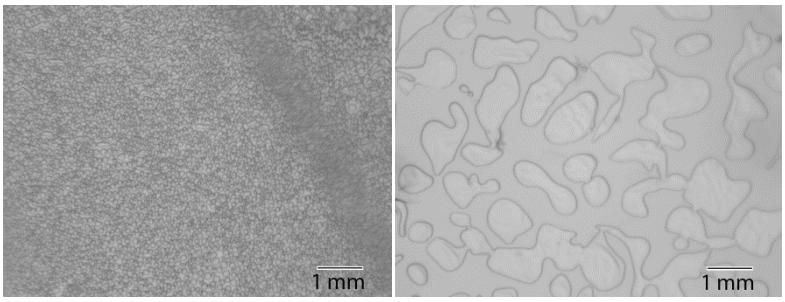


Figure IV - 13: Les motifs formés au cours du collage avec la presse chauffante avec plus (gauche) ou moins (droite) de temps de presse.

Ces motifs entrainent donc la fuite des solutions au cours d'écoulement. Pour minimiser ces problèmes nous avons changé le motif du masque pour la photolithographie (**Figure IV - 14 B**). Le nouveau motif mets en place plusieurs cases pour piéger l'air restant entre deux faces.

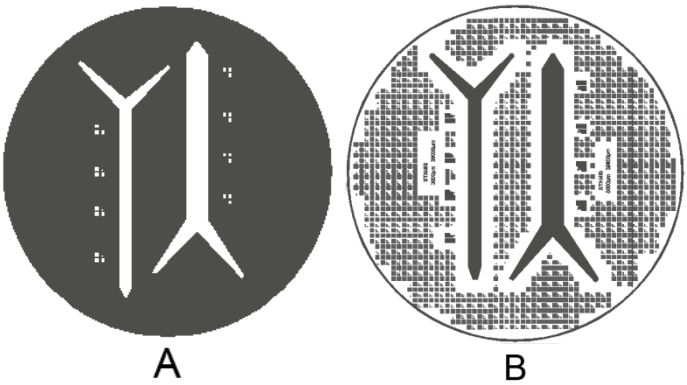


Figure IV - 14: Motifs des masques utilisés : avant (A) et après (B) l'optimisation pour le collage.

Pourtant, toutes ces optimisations n'ont pas permis la fabrication d'une cellule microfluidique appropriée avec les deux résines positives (SPR 220 et S1818). Nous avons décidé d'essayer une résine négative qui est souvent utilisée pour former les motifs sur les supports en microfluidique et ensuite sert au collage, la SU8. Le travail d'optimisation de la fabrication de la cellule fut prit en charge par Thierry Robin (stage de master 2, 1er semestre 2011).

Un nouveau motif de canaux microfluidiques est envisagé (**Figure IV - 15**).

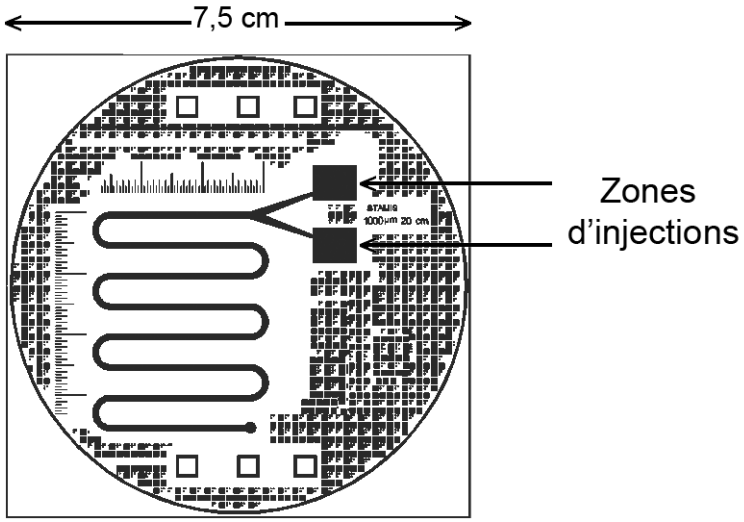


Figure IV - 15: Motif de la cellule microfluidique pour la détection en IR proposé par T. Robin (Master 2 recherche). Deux entrées sont élargies en carré noir. Deux règles sont inclues pour pouvoir repérer facilement la position. 6 cases carrées sur deux côtés blancs servent à faire le background.

Les zones d'injections sont agrandies, le canal de mélange est plus long afin d'augmenter la longueur de diffusion. Les cases blanches servent à enregistrer le background pour les spectres infrarouge. Une cellule en CaF_2 d'épaisseur 8 µm (en utilisant le SU8) a été fabriquée (rapport de stage Thierry Robin, le 10 juin 2010). Cette cellule a été utilisée pour la détection en ligne d'une protéine (polylysine) injectée dans le canal (**Figure IV - 16**).

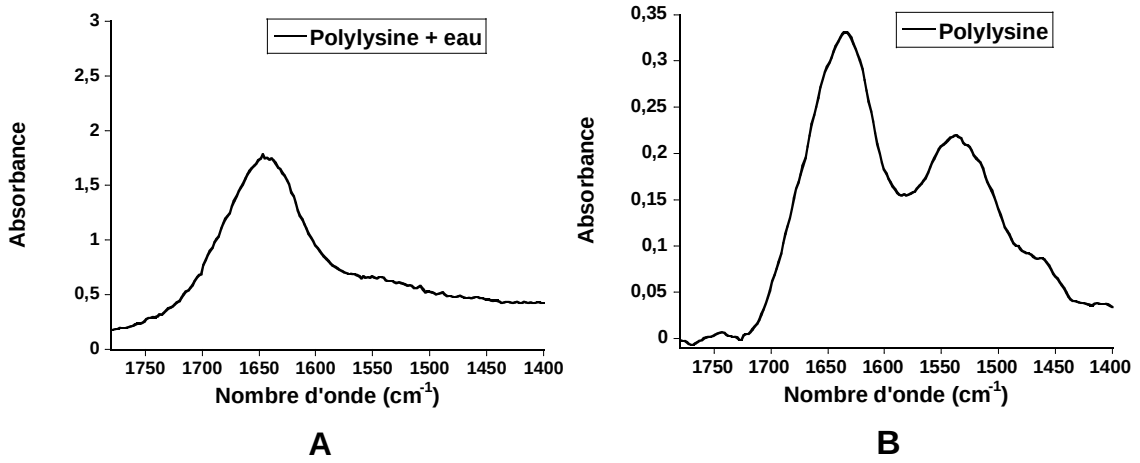


Figure IV - 16: Mesure par couplage FTIR/microfluidique du signal d'une solution de polylysine à une concentration de 15 mg/mL dans un canal en CaF_2 de 8 µm d'épaisseur et de 200 µm de largeur. (A) Signal brut obtenu ; (B) Spectre de la polylysine obtenu après soustraction du signal de l'eau.

La **Figure IV-16 A** démontre que le signal infrarouge n'est pas saturé à cette épaisseur du canal (8 µm). **La Figure IV-16 B** montre le spectre de la polylysine se trouvant dans le canal. Ces résultats confirment que notre couplage permet la détection en ligne des protéines dans les canaux microfluidiques par spectroscopie infrarouge.

Actuellement, des problèmes de fuite près des zones d'injection rendent difficile l'analyse des cinétiques, car les débits ne sont pas constants. Il reste donc à optimiser l'injection des fluides.

Conclusion :

Les résultats obtenus ont prouvé :

- La diffusion de protéine dans le canal microfluidique.
- La faisabilité d'un couplage d'une cellule microfluidique à 8 µm avec la détection en ligne par spectroscopie infrarouge.

Bibliographie

Berthelot, K., F. Immel, J. Gean, S. Lecomte, R. Oda, B. Kauffmann, and C. Cullin. **2009**. Driving amyloid toxicity in a yeast model by structural changes: a molecular approach. *FASEB J.* 23 (7):2254-2263.

Berthelot, K., S. Lecomte, J. Gean, F. Immel, and C. Cullin. **2010**. A yeast toxic mutant of HET-s((218-289)) prion displays alternative intermediates of amyloidogenesis. *Biophys. J.* 99 (4):1239-1246.

Bessoth, F. G., deMello, A.J., Manz, A. **1999**. Microstructure for efficient continous flow mixing. *Anal. Commun.* 36:213-215.

Chiti, F., and C. M. Dobson. **2006**. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75:333-366.

Couthouis, J., K. Rebora, F. Immel, K. Berthelot, M. Castroviejo, and C. Cullin. **2009**. Screening for toxic amyloid in yeast exemplifies the role of alternative pathway responsible for cytotoxicity. *PLoS One* 4 (3):e4539.

Goldsbury, C., U. Baxa, M. N. Simon, A. C. Steven, A. Engel, J. S. Wall, U. Aebi, and S. A. Muller. **2011**. Amyloid structure and assembly: insights from scanning transmission electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 173 (1):1-13.

Herzberg, G. **1989**. Molecular Spectra and Molecular Structure: II. Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules. *Krieger*.

Hinsmann, P., J. Frank, P. Svasek, M. Harasek, and B. Lendl. **2001**. Design, simulation and application of a new micromixing device for time resolved infrared spectroscopy of chemical reactions in solution. *Lab Chip* 1 (1):16-21.

Kakuta, M., P. Hinsmann, A. Manz, and B. Lendl. **2003**. Time-resolved Fourier transform infrared spectrometry using a microfabricated continuous flow mixer: application to protein conformation study using the example of ubiquitin. *Lab Chip* 3 (2):82-85.

Kaun, N., S. Kulka, J. Frank, U. Schade, M. J. Vellekoop, M. Harasek, and B. Lendl. **2006**. Towards biochemical reaction monitoring using FT-IR synchrotron radiation. *Analyst* 131 (4):489-494.

Kazarian, S. G. **2007**. Enhancing high-throughput technology and microfluidics with FTIR spectroscopic imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (3):529-532.

Kerby, M. B., J. Lee, J. Ziperstein, and A. Tripathi. **2006**. Kinetic measurements of protein conformation in a microchip. *Biotechnol. Prog.* 22 (5):1416-1425.

Knowles, T. P., D. A. White, A. R. Abate, J. J. Agresti, S. I. Cohen, R. A. Sperling, E. J. De Genst, C. M. Dobson, and D. A. Weitz. **2011**. Observation of spatial propagation of amyloid assembly from single nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108 (36):14746-14751.

Kolhed, M., P. Hinsmann, P. Svasek, J. Frank, B. Karlberg, and B. Lendl. **2002**. On-line fourier transform infrared detection in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 74 (15):3843-3848.

Kulka, S., N. Kaun, J. R. Baena, J. Frank, P. Svasek, D. Moss, M. J. Vellekoop, and B. Lendl. **2004**. Mid-IR synchrotron radiation for molecular specific detection in microchip-based analysis systems. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (7):1735-1740.

Laval, P. **2007**. Outils microfluidiques pour l'étude des processus de cristallisation : solubilité, polymorphisme et cinétique de nucléation. *PhD thesis, Université Bordeaux I.*

Leng, J., B. Lonetti, P. Tabeling, M. Joanicot, and A. Ajdari. **2006**. Microevaporators for kinetic exploration of phase diagrams. *Phys. Rev. Lett.* 96 (8):084503.

Necula, M., R. Kayed, S. Milton, and C. G. Glabe. **2007**. Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J. Biol. Chem.* 282 (14):10311-10324.

Pan, T., R. T. Kelly, M. C. Asplund, and A. T. Woolley. **2004**. Fabrication of calcium fluoride capillary electrophoresis microdevices for on-chip infrared detection. *J. Chromatogr. A* 1027 (1-2):231-235.

Srisa-Art, M., E. C. Dyson, A. J. deMello, and J. B. Edel. **2008**. Monitoring of real-time streptavidin-biotin binding kinetics using droplet microfluidics. *Anal. Chem.* 80 (18):7063-7067.

Svasek, P. S., E.; Lendl, B.; Vellekoop, M. **2004**. Fabrication of miniaturized fluidic devices using SU-8 based lithography and low temperature wafer bonding. *Sensors and Actuators A* 115:9.

Tabeling, P. **2003**. Introduction to microfluidics. *Oxford University Press*.

Wagner, C., W. Buchegger, M. Vellekoop, M. Kraft, and B. Lendl. **2011**. Time-resolved mid-IR spectroscopy of (bio)chemical reactions in solution utilizing a new generation of continuous-flow micro-mixers. *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (8):2487-2497.

Whitesides, G. M. **2006**. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442 (7101):368-373.

Yin, H., B. Ji, P. S. Dobson, K. Mosbahi, A. Glidle, N. Gadegaard, A. Freer, J. M. Cooper, and M. Cusack. **2009**. Screening of biomineralization using microfluidics. *Anal. Chem.* 81 (1):473-478.

Conclusions et perspectives

Notre travail avait pour objectif d'étudier la relation structure-toxicité des protéines amyloïdes en interaction avec des membranes modèles. Les résultats obtenus nous ont permis de caractériser les interactions de la protéine HET-s (218-289) (WT) et un mutant toxique de HET-s (M8) avec les membranes lipidiques modèles (monocouches, bicouches).

Nous avons utilisé différentes techniques pour sonder la morphologie, le caractère amyloïde et la structure des protéines en interaction avec des membranes modèles.

Deux modèles membranaires ont été utilisés avec les variations de la composition lipidique et de la charge : les monocouches de lipides formées à l'interface air-eau et les bicouches de lipides.

Nous avons montré que dans les interactions protéine amyloïde-membrane, la contribution électrostatique est importante. De façon intéressante, la protéine toxique perturbe très fortement l'intégrité des membranes chargées négativement. Ces résultats sont confirmés pour les deux modèles membranaires : de monocouches lipidiques (par ellipsométrie) et de bicouches lipidiques (par spectroscopie de fluorescence et PWR).

D'un point de vue structural, sur les modèles monocouches nous avons prouvé que l'interface peut modifier les interactions des protéines au cours de leur processus d'auto-assemblage. C'est le cas de la protéine WT qui s'assemble avec une structure riche en feuillets β antiparallèles à l'interface air-eau, structure différente de celle formée en solution. Sur les modèles bicouches, nous n'avons pas observé de différence entre la structure de la protéine auto-assemblée en solution et la structure de la protéine en interaction avec les membranes : la protéine WT s'organise principalement en feuillets β parallèles et la protéine M8 adopte une structure riche en feuillets β antiparallèles.

Nous avons également démontré que les monomères et les fibres matures des protéines amyloïdes (WT et M8) n'endommagent pas l'intégrité des membranes modèles. Ces résultats semblent indiquer le rôle prépondérant des oligomères dans le mécanisme de toxicité surtout dans le cas de la protéine M8.

L'étude sur l'effet de perméabilisation des membranes induit par des fragments de fibres que nous avons réalisée en fluorescence serait intéressante à poursuivre en spectroscopie infrarouge, car elle permettrait de mieux préciser l'implication physique de la taille des espèces amyloïdes sur l'interaction avec les membranes et donc sur la toxicité potentielle de ces espèces.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse sur la protéine non toxique WT et la protéine toxique M8 nous a permis d'envisager que la toxicité des protéines amyloïdes pourrait être la conséquence d'une combinaison d'une part de la morphologie

(courte taille des oligomères), d'autre part d'une structure secondaire riche en composition β antiparallèle et enfin liée à des interactions spécifiques de type électrostatique avec les membranes. Nous pouvons proposer une hypothèse sur le mécanisme de toxicité de la protéine M8 impliquant à la fois des effets de type détergent et/ou « carpet » et la formation des pores dans les membranes par ségrégation des lipides membranaires induite par des formes oligomères.

Afin de discriminer l'interaction de différents assemblages protéiques avec des membranes, nous avons réalisé un couplage de la microfluidique avec la spectroscopie infrarouge. Les premiers résultats ont confirmé la faisabilité de cette cellule. Les cellules microfluidiques couplées avec le nouvel imageur infrarouge du laboratoire permettront de suivre plus précisément la cinétique d'agrégation des protéines amyloïdes en fonction des paramètres physicochimiques (pH, température…) et/ou la présence de liposomes ou d'autres molécules (ions…) dans le milieu.

Nous pouvons de plus envisager d'étudier l'effet du confinement de ces protéines dans des canaux microfluidiques ou la variation de concentration en électrolytes, afin de mimer au mieux le milieu vivant.

Annexes

Table des matières

Annexes **191**

I. Matériels **193**

I.1. Lipides et autres produits chimiques 193

I.1.1. Préparations des liposomes lipidiques 194

I.1.2. Préparations des bicouches lipidiques supportées 194

I.2. Purifications des protéines ((HET-s 218-289) et M8) 195

I.2.1. Les solutions utilisées 195

I.2.2. Expression et purification des protéines 197

I.2.3. Préparation des bactéries compétentes – méthode au $CaCl_2$ 198

I.2.4. Transformation bactérienne 199

I.2.4.1. Miniprep d'ADN plasmidique 199

I.2.4.2. Expression et purification de HET-s(218-289) et M8 200

I.2.4.3. Protocole de dessalage 202

II. Techniques utilisées **203**

II.1. L'ellipsométrie 203

II.1.1. Bref rappel théorique de l'ellipsométrie 203

II.1.2. Montage expérimental 204

II.2. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-FT) 205

II.2.1. Bref rappel théorique 205

II.2.2. Etude in-situ des couches minces orientées à l'interface air-eau par PM-IRRAS 207

II.2.2.1. Principe et avantages du PM-IRRAS 207

II.2.2.2. Montage expérimental 209

II.2.3. Etude de la structure et orientation des couches par la spectroscopie ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared spectroscopy) 209

II.3. La spectroscopie PWR (Plasmon Waveguide Resonance spectroscopy) 211

II.3.1. Principe général 211

II.3.2. Application aux études d'interactions protéine-lipide 212

II.4. Expérience de détection de la perméabilisation membranaire (relargage de calcéine) 213

III. Méthode pour déterminer l'anisotropie de structure secondaire des couches organisées sur le cristal ATR **214**

Bibliographie **216**

I. **Matériels**

I.1. **Lipides et autres produits chimiques**

Les lipides utilisés pour ce travail sont soit des phospholipides purs: 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(10-rac-glycerol)(sel de sodium) (DOPG), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(10-myo-inositol)(sel d'ammonium) (DOPI), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L serine(sel de sodium) (DOPS), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), et 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) de Avanti Polar Lipids, Inc., soit des extraits naturels : egg PC 99% (Avanti Polar Lipids, Inc.) et asolectine (extrait de soja) (Sigma- Aldrich). La composition approximative en phospholipide de l'asolectine est de 29% de phosphatidyl choline (PC), 30% de phosphatidyl ethanolamine (PE), 26% de phosphatidyl inositol (PI), 14% d'acide phosphatidic (PA), et de 1% de phosphatidylserine (PS) (Steunou et al. 2010). Ces lipides ont été utilisés soit pour la formation de monocouches lipidiques déposées à l'interface air-eau, soit pour former des liposomes (LUV – Large Unilamellar Vesicles et SUV – Small Unilamellar Vesicles).

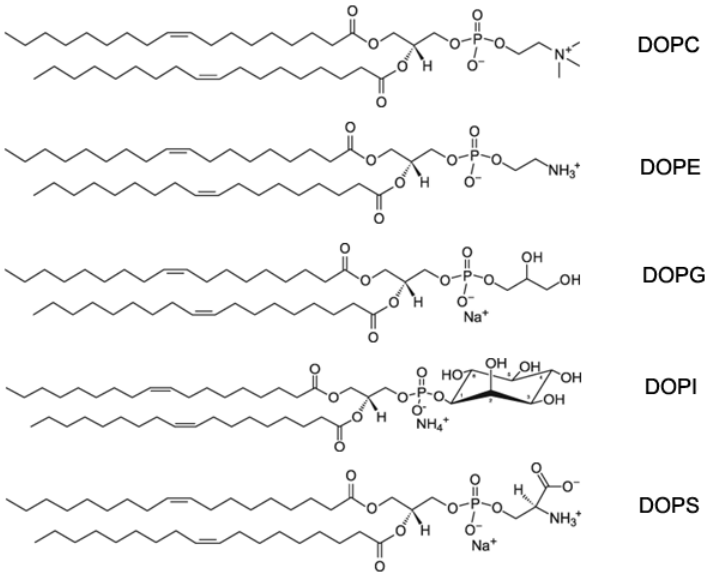


Figure A - 1: Structure des phospholipides utilisés (Avanti Polar Lipids, Inc.)

Les autres produits chimiques utilisés dans nos travaux sont : Tris(hydroxymethyl) aminomethane (≥ 99,8%), sodium cloride (≥ 99,5%), cytochrome c et Poly-D-lysine hydrobromide (masse moléculaire d'environ 150 000-300 000) (Sigma-Aldrich) ; calcéine (analysis) (Sigma) ; imidazole (Aldrich-Sigma) ; isopropyl-D-thiogalactoside, Acrylamide-bisacrylamide 40% (pureté 2X ≥ 99%) et laurylsulfate de sodium (Euromedex, Souffelweyersheim, France) ; urée (Eurobio, Les Ulis, France) ; rouge congo (CR; C.I. 22120; Sigma) ; extrait de levure (Biokar) ; tryptone (Sigma-Aldrich) ; TGS 10X et bleu de

Coomassie (Bio-Rad) ; N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (≥ 99%) et persulfate d'amonium (≥ 98%) (Amersham Biosciences) ; tampon phosphate (PBS) 10X (NaCl 1,37 M, KCl 26,8 mM, Na_2HPO_4 101,4 mM, K_2HPO_4 17,6 mM; MP Biomedicals Europe, Illkirch), D_2O (Eurisotop) ; solvants organiques (méthanol, chloroforme) de qualité HPLC (≥ 99.9%) (Aldrich). L'eau utilisée pour la préparation des solutions a une résistivité nominale de 18 MΩ.cm (Milli-Q, Millipore).

I.1.1. **Préparations des liposomes lipidiques**

Des films lipidiques ont été préparés en évaporant les solutions de lipides dans chloroforme:methanol (4:1, v/v) sous N_2 et en laissant sous vide pendant au moins trois heures pour enlever toutes les traces de solvants organiques. Les films lipidiques ont ensuite été hydratés soit par le tampon Tris à pH 7,4 (Tris 20 mM, NaCl 150 mM) (avec ou sans la calcéine) soit par le tampon PBS à pH 7,4 et agités au vortex pendant quelques minutes.

Les LUV (Large unilamellar vesicles) sont fabriquées par méthode d'extrusion en utilisant des membranes poreuses (Nuclepore, Whatman) de diamètre de 400 nm (x 3 passages), 200 nm (x 4 passages), 100 nm (x 5 passages). Les molécules de calcéine qui ne sont pas encapsulées sont éliminées par chromatographie d'exclusion en utilisant une colonne de Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden).

Le diamètre des vésicules formées est déterminé par diffusion dynamique de la lumière (DynaPro Nanostar, US). Les valeurs obtenues sont de 110-160 nm. La concentration en lipide des suspensions des liposomes est déterminée par le dosage de phosphate (Rouser et al. 1970) (3000-4000 µM).

Les SUV (Small unilamellar vesicles) sont fabriquées par sonication des suspensions de lipides dans le tampon Tris à pH 7,4 à l'aide d'une sonde de sonication en titane dans un bain de glace pour éviter la dégradation des lipides. Les traces de titane sont ensuite éliminées par centrifugation (6000 rpm pendant 2 minutes (Fisherbrand)).

I.1.2. **Préparations des bicouches lipidiques supportées**

Les bicouches lipidiques supportées sont formées par éclatement spontané de petites vésicules lipidiques (SUV) sur le cristal en germanium (cellule *Miracle, Spike Technology*) (pour les expériences en ATR) et sur le cristal de PWR : une suspension de SUV à la concentration de 3-4 mg/mL est déposée à la surface du cristal pendant 10-15 min pour l'éclatement. Ensuite, les liposomes restant en solution sont éliminés par plusieurs rinçages avec le tampon utilisé pour l'expérience.

En ATR, la formation des bicouches est vérifiée par l'intensité des spectres des couches formées en polarisation *p* et *s* et par leur rapport dichroïque. Une bicouche lipidique est considérée formée et orientée si d'une part l'intensité de la bande antisymétrique des CH_2 (vers 2924 cm^{-1}) est environ $1,3*10^{-3}$ en polarisation *p* et d'autre part le rapport dichroïque Ap/As est entre 1,5 (pour des chaînes acyles insaturées) et 1,9 (pour des chaînes acyles saturées).

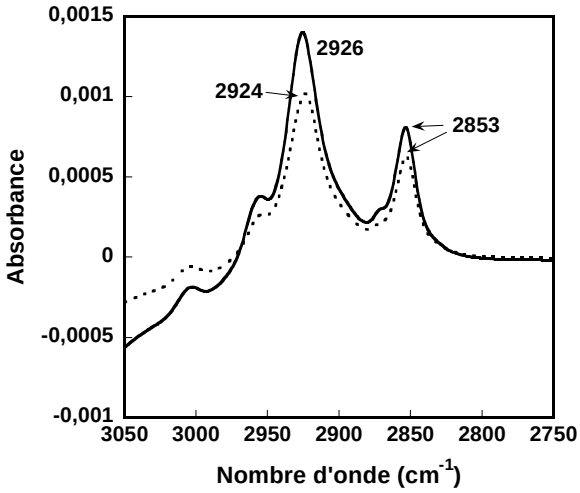


Figure A - 2: Spectres ATR calculés pour la polarisation *p* (courbe continue) et pour la polarisation *s* (courbe pointillée) d'une bicouche de DOPC d'épaisseur 40 Å à la surface du cristal ATR en germanium dans l'eau.

La **Figure A - 2** présente des spectres ATR calculés d'une bicouche de DOPC formée par la fusion des SUV à la surface du cristal ATR en germanium en condition hydratée. Ces spectres sont obtenus en utilisant un logiciel développé pour modéliser l'absorbance des couches (Buffeteau and Desbat 1989). Les constantes optiques de l'eau utilisées sont obtenues de (Bertie and Lan 1996).

En PWR, la formation des bicouches supportées est vérifiée par les déplacements des angles de résonances pour la polarisation *p* et *s*. La formation d'une bicouche entraîne une variation d'environ 120 mdeg en polarisation *p* et d'environ 90 mdeg en polarisation *s* (Salamon et al. 1997).

I.2. **Purifications des protéines ((HET-s 218-289) et M8)**

I.2.1. **Les solutions utilisées**

Antibiotiques :

- Stock 1000X à -20°C:
  - Ampicilline (AMP) 100 mg/mL dans l'eau stérilisée
  - Kanamycine (KAN) 50 mg/mL dans l'eau stérilisée

- Chloramphénicol (CAM) 34 mg/mL dans l'éthanol

IPTG : 1M dans l'eau

soit 200-250 µM, inductions d'une nuit à 15°C

soit 1 mM, inductions pendant 3-4 h à 37°C

Milieu de culture 2TY :

- NaCl 5 g/L
- extraït de levure 10 g/L
- Triptone 16 g/L

Milieu de culture Luria Broth (LB):

- Bactotryptone 10 g/L
- extrait de levure 5 g/L
- NaCl 5 g/L

Tampon A 10X

- NaCl 1,5 M
- Tris-HCl pH 8 1M

Urée 8 M dans tampon A 1X

Guanidine 6 M dans tampon A 1X

Imidazole 250 mM dans tampon A 1X

Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE = sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Gels pour l'électrophorèse (**Tableau A - 1**)

Tableau A - 1: Compositions des solutions pour électrophorèse sur gel (Gel 15% (pour 3 gels)).

Produit chimique	Running	Stacking
H_20	2,2 mL	3 mL
Tris/HCl	1,5 M, pH 8,8 : 2,5 mL	0,5 M, pH 6,8 : 1,25 mL
SDS	100 µL	50 µL
40% Acrylamide	3,75 mL	0,49 mL
APS 10%	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL
Total	10 mL	5 mL

Tampon de migration : TGS 1 X (25mM Tris/192mM Glycine/0,1% (w/v) SDS, pH 8,3).

I.2.2. **Expression et purification des protéines**

Principe : Les plasmides encodant le WT et M8 taggés avec 6-histidine sont introduits dans la souche bactérienne d'expression *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Gold. Les protéines sont ensuite exprimées et purifiées sur colonne d'affinité aux histidines d'après les protocoles suivants. Les protéines sont jugées pures par analyse en électrophorèse sur gel suivie par coloration au Bleu de Coomassie. Les aliquotes de protéines éluées dans l'urée/imidazole sont conservés à -80°C. Les protéines sont dessalées à 4°C le jour même des expériences par filtration sur gel avec HCl 10 mM (pH 2,0).

Etapes expérimentales (Figure A - 3)

Premièrement, les ADN plasmidiques (pET24a-WT-6His/KAN ou pET24a-M8-6His/KAN) sont amplifiés et préparés par « **Miniprep** » à partir de cellules compétentes *E. coli* top 10 transformées avec pET24a-WT-6His/KAN ou pET24a-M8-6His/KAN. Les extraits ADN obtenus sont introduits dans les cellules de compétentes *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Gold pour l'expression des protéines désirées (WT ou M8) par **Transformation**. Les protéines sont ensuite purifiées.

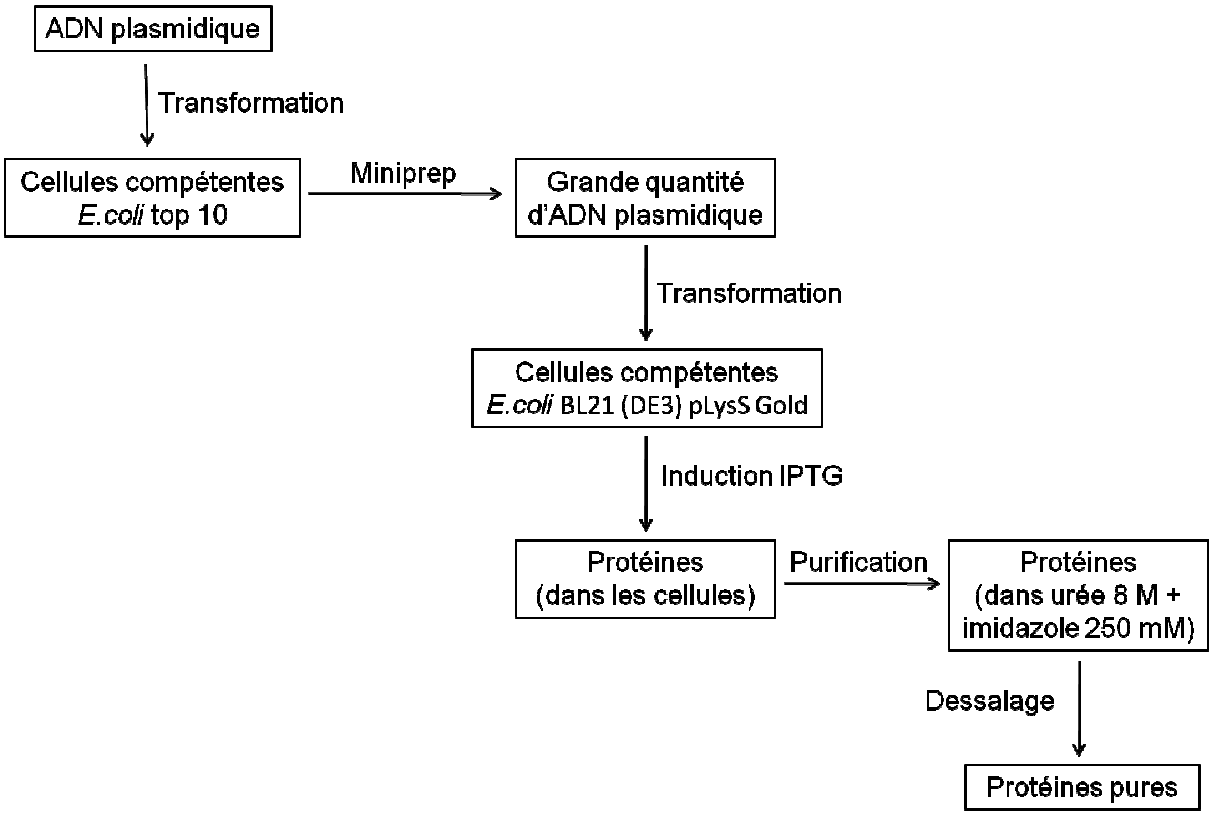


Figure A - 3: Schéma général de la production et de la purification des protéines

I.2.3. **Préparation des bactéries compétentes – méthode au $CaCl_2$**

Objectif : Donner aux cellules utilisées la capacité à capturer de l'ADN présent dans l'environnement.

Principe : Les cellules d'*E. coli* sont cultivées jusqu'en phase exponentielle puis récupérées par centrifugation. Ces cellules sont rendues **compétentes** pour la transformation par traitement chimique au $CaCl_2$ (dans une solution de chlorure de calcium). En présence d'ions calcium, les parois des bactéries sont fragilisées et les bactéries sont rendues « compétentes » pour l'incorporation d'ADN plasmidique par choc thermique.

Les cellules compétentes préparées sont :

- pour la Miniprep d'ADN plasmidique : *E. coli* Top 10
- pour l'expression des protéines : *E. coli* BL21(DE3) Gold pLysS

Protocole :

Jour 1
- Inoculer 1 colonie ou quelques µL d'*E. coli* (Top-10 ou BL21(DE3) Gold pLysS) avec 5 mL LB (sans antibiotiques)
- Agitation O/N à 37°C (O/N = *overnight)*

Jour 2
- Mettre 1-2 mL de culture O/N dans 100 mL LB
- Agiter pendant 2 à 3 h à 37°C, jusqu'à A_{660} = 0,5 – 0,6
- Mettre dans la glace 10 min
- Centrifuger 10 min, 4,000 rpm, +4°C
- Eliminer le surnageant
- Resuspendre le lysat dans 50 mL $CaCl_2$ 0,1 M (+4°C)
- Mettre dans la glace, 30 min
- Centrifuger 10 min, 4,000 rpm, +4°C
- Eliminer surnageant
- Resuspendre le lysat dans 4 mL $CaCl_2$ 0,1 M (+4°C)
- Garder les cellules dans la glace O/N (minimum 2 h)

Jour 3
- Ajouter glycérol 20%
- Aliquoter par 100-200 µL aliquots)
- Congeler dans azote liquide et ensuite conserver à -80°C

I.2.4. **Transformation bactérienne**

Objectif : Introduire les ADN plasmidiques dans les cellules d'*E. coli* afin de produire les protéines désirées.

Principe : Un choc thermique facilite l'entrée de l'ADN plasmidique dans les cellules d'*E. coli* rendues chimiquement compétentes. Les bactéries transformées sont cultivées sur milieu solide sélectif afin d'amplifier les bactéries transformées par le plasmide désiré.

Protocole :

- Mettre 1 µL DNA (pET24a-WT-6His/KAN ou pET24a-M8-6His/KAN) dans les tubes Eppendorf de 1,5 mL
- + 100 µL cellules compétentes d'*E. coli* (Top 10 ou BL21(DE3) Gold pLysS) (sous hotte stérile)
- Mettre dans la glace, 30 min
- 42°C, 50 s
- Glace, 2 min
- + 1mL du milieu LB (sans antibiotiques)
- 37°C, 45 min, agitation 300 rpm
- Centrifuger 5000 rpm, 5 min
- Enlever surnageant (sous hotte stérile)
- Resuspendre le culot dans le milieu LB
- Etaler sur boîte de pétri contenant LB agar + KAN (pour *E. coli* top 10) ou LB agar + KAN + CAM (*E. coli* BL21(DE3) Gold pLysS))
- 37°C, O/N

I.2.4.1. ***Miniprep d'ADN plasmidique***

Objectif : Préparer sélectivement l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien.

Principe : Cette méthode consiste à effectuer une lyse des bactéries transformées au moyen d'un détergent (dodécyl sulfate de sodium) en présence de soude, à pH 13. A ce pH très alcalin, l'ADN est dénaturé (les deux brins de la double-hélice sont séparés). La solution est ensuite neutralisée rapidement, ce qui provoque la renaturation brutale (réappariement des brins du duplex d'ADN). L'ADN chromosomique, très long (~10^6 paires de bases), ne parvient pas à se réapparier complètement et forme des enchevêtrements insolubles. L'ADN

plasmidique, court (~10^3 paires de base), parvient à se reformer et reste en solution et est récupéré par centrifugation. Les protéines précipitées, sont également éliminées avec le détergent et l'ADN chromosomique. L'ADN plasmidique est concentré par précipitation à l'alcool.

Protocole :

Jour 1 - Inoculer 1 colonie ou quelques µL d'*E. coli* (transformé avec pET24a-WT-6His/KAN ou pET24a-M8-6His/KAN) dans 2 mL LB (contenant des antibiotiques).

- Agitation O/N 37°C

Jour 2 - Centrifuger 4 mL de culture, 5 min, 14000 rpm

- Enlever le surnageant
- Ajouter 100 µL d'eau stérilisée et resuspendre doucement le culot
- Ajouter 200 µL 0,1 M NaOH 1% SDS (fraîchement préparée), attendre ~2 min (le lysat clair apparaît)
- Ajouter 150 µL KOAc 5 M pH 5,5
- Mettre dans la glace 10 min
- Centrifuger 15 min, 14000 rpm
- Récupérer le surnageant dans un tube neuf (≈ 400 µL)
- Ajouter 500 µL isopropanol et mixer
- Centrifuger 15 min, 14000 rpm, +4°C (enlever le surnageant)
- Laver le culot avec de l'éthanol froid 70 % (100-200 µL)
- Centrifuger 5 min, 14000 rpm, +4°C (enlever le surnageant)
- Centrifuger 1 min, 14000 rpm (enlever la dernière goutte, sécher le culot pendant quelques min)
- Resuspendre le culot dans 50-100 µL d'eau stérilisée + RNAse A (2-3 µL dans 500 µL)

I.2.4.2. ***Expression et purification de HET-s(218-289) et M8***

Au préalable :

1. **Préparation des cellules chimiques compétentes** BL21(DE3) Gold pLysS
2. **Transformation** sur boite LB Kanamycine 50 µg/mL et Chloramphénicol 34 µg/mL final (KAN/CAM).

Expression :

Inoculation de la préculture

- Inoculer plusieurs colonies d'*E. coli* transformées par le plasmide dans de 50 mL de milieu 2TY KAN/CAM
- Agitation 37°C, 200 rpm, O/N

Inoculation de la culture 2 x 1 L

- Mettre 10 – 12 mL de culture dans de 1 L de milieu 2TY KAN/CAM
- Incuber à 37°C, 150 rpm, jusqu'à Abs 600 nm = 0,8 - 1

Induction IPTG

- Ajouter 0,25 mL de IPTG 1M (Stock 1/1000)
- Incuber 15°C, 150 rpm, O/N
  ou IPTG 1 mM, 37°C, 150 rpm, 3-4 heures)

Purification :

Centrifugation / Lavage

- Mettre les cultures 20 min dans la glace
- Centrifuger 6000 rpm, 30 min, +4°C
- Resuspendre les culots dans 30-40 mL H_20 +4°C et rassembler les culots dans un tube de 50 mL
- Centrifuger 6000 rpm, 30 min, +4°C
- Stocker les culots à -20°C ou -80°C

Sonication

- Ajouter 30 mL de solution tampon A et une pointe de spatule de lysozyme (en poudre, pour fragiliser les membranes cellulaires) à température ambiante.
- Vortexer jusqu'à resuspension des culots puis laisser agiter sur un rocker au moins 30 min
- Soniquer 4 x 1 min, dans de la glace, pause de 30 sec entre les sonications
- Centrifuger 12000 rpm (g), 30 min, +4°C, récupérer les culots
- Laver avec 30 mL de solution tampon A – resuspendre bien avec une spatule
- Centrifuger 12000 rpm, 30 min, récupérer les culots
- Resuspendre les culots dans tampon A/ Guanidine 6 M
- Agiter 30 min – 1 h à la température ambiante

Purification sur Résine TALON (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France)

- Centrifuger les extraits bruts 12000 rpm, 20 min, +4°C

- Ajouter délicatement le surnageant sur 4 mL de résine préalablement lavée et équilibrée (H_2O puis tampon A / Guanidine 6M) dans un tube de 50 mL.
- Agiter 1-3 h à la température ambiante
- Centrifuger 700 rpm, 15 min, éliminer le surnageant
- Laver avec tampon A / 8 M urée,
- Centrifuger 900 rpm, 15 min
- Transférer les résines dans une colonne en plastique lavée
- Laver la résine avec 30 mL tampon A / 8 M urée
- Eluer les protéines avec tampon A / 8 M urée / imidazole 250 mM
- Collecter dans des tubes de 1,5 mL (9 tubes, 2 x 0,75 mL/tube)

SDS-PAGE

10 µl de chaque tube de protéines + 5 µL de tampon de charge dénaturant (β-mercaptol), 99°C, 2 min

Electrophorèse/gel (200 mV) (~45 min)

Tampon de migration : TGS Tris/ Glycine/SDS (préparer à partir de solution mère 10X)

Révélation :

- coloration au bleu de Coomassie
- décoloration dans éthanol/acide acétique/eau (40/10/50)

Sécher les gels

Pooler les fractions protéiques en aliquotes de 500 µL et stocker à -80°C

Rendement : ~2-4 mg de protéine par litre de culture

I.2.4.3. ***Protocol de dessalage***

L'expérience est faite dans la chambre froide à +4 °C

1. Equilibrer la colonne de résine Hi-Trap Sephadex G-25 (5 mL, HiTrap™ Desalting, GE Healthcare Europe GmbH, Orsay, France) avec du HCl à pH 2 pendant 10 min, 0,9 mL/min
2. Décongeler l'aliquote de protéine (~500 µL)
3. Faire passer la solution de protéine par colonne de résine, 0,9 mL/min
4. Récupérer les échantillons dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL, 04-05 mL par fraction

5. Déterminer la concentration en protéine (absorbance à 280 nm, les coefficients d'extinction molaire à 25 °C de WT est 6990 $M^{-1}cm^{-1}$, de M8 est 4470 $M^{-1}cm^{-1}$) (ExPASy http://web.expasy.org/protparam/).

II. Techniques utilisées

II.1. L'ellipsométrie

II.1.1. Bref rappel théorique de l'ellipsométrie

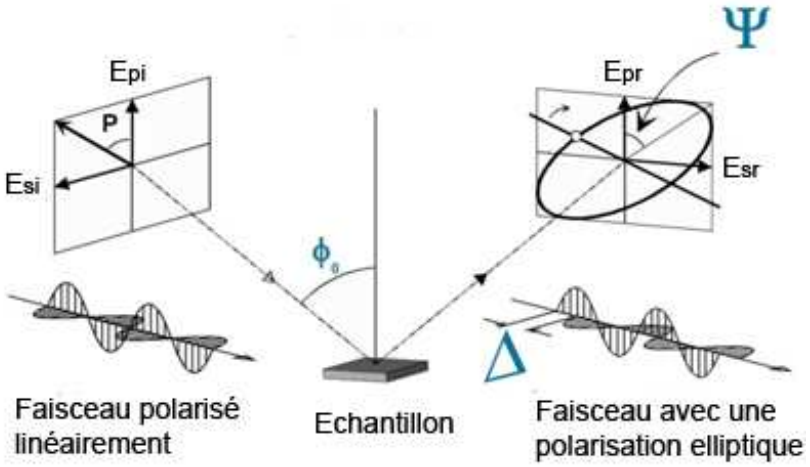


Figure A - 4: Principe de l'ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique de mesure du changement d'état de polarisation de la lumière par réflexion sur une surface plane, **Figure A - 4**. Cette méthode permet de remonter aux paramètres d'épaisseurs et optiques des couches constituant la surface.

Lorsqu'une onde plane linéaire se réfléchit sur une surface plane avec un angle azimutal, par rapport au plan d'incidence, l'onde réfléchie est elliptique. Cette modification provient de la différence de coefficient de réflexion des ondes polarisées p (r_p) et s (r_s) et du déphasage de ces 2 ondes (δ_p et δ_s) introduit par la réflexion. Les deux coefficients r_p et r_s sont complexes et leurs modules $|r_p|$ et $|r_s|$ caractérisent les modifications d'amplitude des champs électriques pour les deux polarisations. Les valeurs de r_p, r_s, δ_p et δ_s dépendent de la constitution de la surface sondée. Les valeurs de r_p, r_s, δ_p et δ_s dépendent de la nature de la surface irradiée.

On définit les angles ellipsométriques par $\tan\Psi=|r_p|/|r_s|$ et $\Delta=\delta_p-\delta_s$. Pour des films ultra-mince non absorbant sur un substrat non absorbant, cas de nos expériences, l'angle Ψ varie peu avec l'épaisseur de la couche par contre l'angle Δ est très sensible à cette épaisseur.

Comme le montre la **Figure A - 5**, la différence par rapport à l'angle Δ_0 du substrat nu, $\delta\Delta=\Delta_0-\Delta$, varie linéairement avec l'épaisseur d'une couche d'indice n constant. Il est donc assez facile de suivre les variations d'épaisseurs de la couche par mesure des variations de $\delta\Delta$.

La précision sur les mesures angulaires permet de suivre avec l'ellipsométrie des modifications d'épaisseur de l'ordre de 1 à 2 Å. Ce qui permet de détecter localement pour une surface du micron carré des quantités de matière inférieure au femto gramme.

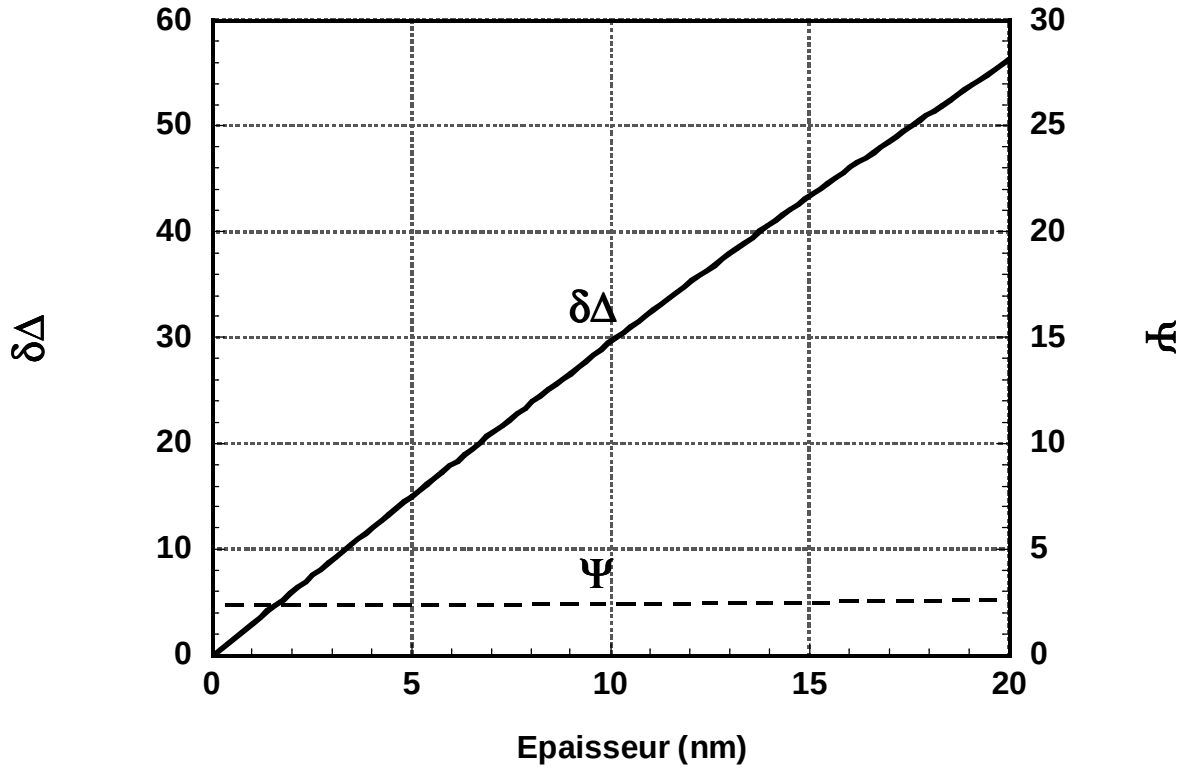


Figure A - 5: Variation des angles ellipsométriques d'une couche mince, d'indice 1,45, déposée sur une surface d'eau (n=1,333) et observée avec un angle d'incidence de 54°58.

II.1.2. **Montage expérimental**

Il existe plusieurs méthodes qui permettent de mesurer les angles ellipsométriques. Notre appareil (IElli2000) effectue les mesures de Δ et Ψ en utilisant la méthode du zéro, c'est-à-dire par annulation du signal réfléchi. Notre montage optique, **Figure A - 6**, comprend : une source monochromatique (laser à 532 nm), un polariseur linéaire à l'angle P, une lampe compensatrice à 45° servant à convertir la lumière polarisée elliptique (après la réflexion sur la surface) en une polarisation linéaire avant atteindre l'analyseur qui est orienté (angle A) de manière à être croisé avec la polarisation linéaire venant du compensateur, pour l'extinction du signal et une caméra qui sert de détecteur. Les angles azimutaux (P et A) qui donnent l'annulation de la réflexion sur un domaine donné, permettent de calculer les angles Δ et Ψ du domaine considéré : Δ=450°-2P; Ψ=-A.

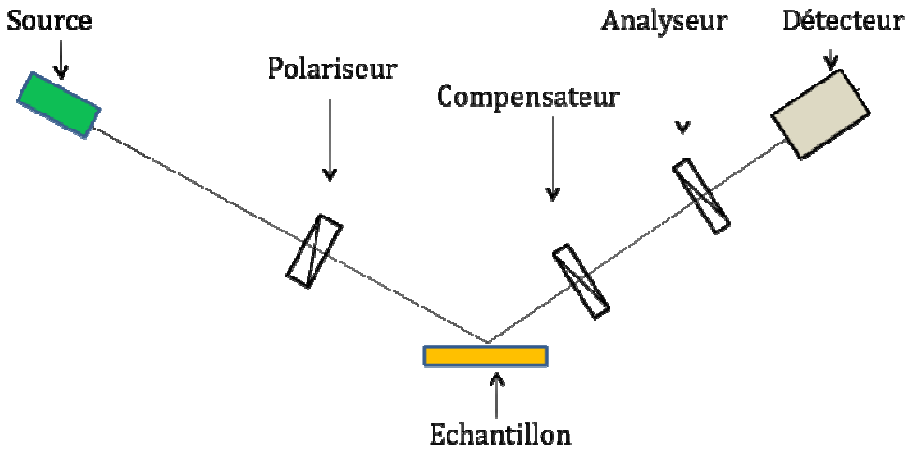


Figure A - 6: Ellipsomètre à annulation

A l'aide d'un modèle mathématique, inclus dans le logiciel de l'ellipsomètre, et en se donnant une valeur raisonnable pour l'indice de réfraction des couches formées à l'interface air-eau, on peut évaluer leur épaisseur. L'ellipsométrie présente l'avantage pour l'étude *in situ* des interactions entre des protéines et les monocouches lipidiques à l'interface air-eau de permettre le suivi en temps réel des modifications induites par l'interaction. Les images sont analysées microscopiquement avec une résolution latérale de l'ordre de 2 microns, ainsi on obtient des informations locales sur l'épaisseur et la morphologie des couches présentes à l'interface. Avec l'objectif x10, nous analysons un champ de 450x670 µm. Les images présentées dans ce manuscrit sont corrigées de la déformation provenant de l'angle d'incidence d'observation.

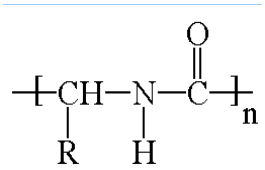
II.2. **La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-FT)**

II.2.1. **Bref rappel théorique**

La spectroscopie infrarouge met en jeu les énergies de vibration d'une molécule. Une molécule à N atomes possède 3N-6 degrés de vibrations qui proviennent des mouvements des atomes les uns par rapport aux autres. Une vibration n'est active que lorsque l'énergie de l'onde excitatrice est égale à la différence d'énergie entre 2 niveaux d'énergie séparés par un quantum et si la vibration entraîne une variation du moment dipolaire de la molécule. Dans une molécule, on distingue deux types de vibration :

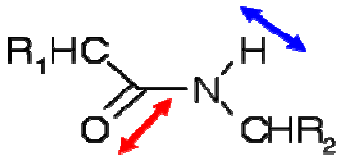
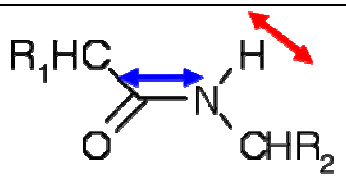
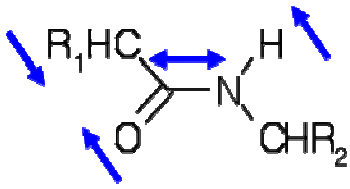
- les vibrations d'élongations (ν) qui affectent les longueurs des liaisons
- les vibrations de déformations (δ) qui affectent les angles entre liaisons

Pour les protéines, les principales vibrations sont dues aux liaisons amides du squelette peptidique.



Les plus importantes sont reportées dans le **Tableau A - 2**:

Tableau A - 2: Principales vibrations des bandes amides

Amide I	1700-1600 cm^{-1}	élongation C=O (78%)	
Amide II	1540-1520 cm^{-1}	élongation CN (44%) déformation NH (63%) ➔ sensible à l'échange isotopique NH➔ND	
Amide III	1300-1250 cm^{-1}	déformation NH (29%) de phase opposée au mode amide II élongation C-N (35%)	

A plus haute fréquence, existent également les bandes amide A (3300 cm^{-1}, élongation NH) et amide B (3080 cm^{-1}, 2 fois la déformation NH).

En terme d'analyse structurale, la bande amide I est la plus utilisée en raison de son intensité et de sa sensibilité à la structure secondaire (voir **Tableau A - 3**).

Tableau A - 3: Nombre d'onde de la bande amide I de différentes structures secondaires

Structure secondaire	**Amide I (cm^{-1})**
Feuillets β antiparallèles ou parallèles	1618-1630 (forte) 1630-1633 (forte)
Structure désordonnée (random/random coil)	1645-1652 (large)
Hélice α	1651-1662 (forte)
Coudes β et hélices 3_{10}	1665-1678
Feuillets β antiparallèles	1685-1695 (faible)

Les groupes caractéristiques des chaînes latérales ne sont observés que lorsqu'ils sont en grande proportion dans le peptide ou la protéine. On peut trouver leurs attributions correspondant aux vibrations principales des différents acides aminés dans les revues(Goormaghtigh et al. 1994a; Barth and Zscherp 2002).

Dans le cas des spectres en transmission en présence d'un tampon aqueux, on observe dans le même domaine que l'amide I la bande δOH_2 de l'eau à ~1640cm^{-1}. Cette bande rend

difficile la détection et l'analyse des structures pour des protéines à faible concentration. Dans ce cas, l'échange isotopique H/D est une possibilité.

Par ailleurs, pour les études aux interfaces hydrophiles/hydrophobe, il est possible d'appliquer les techniques de réflexion IRRAS (Infrared Reflexion Absorption Spectroscopy) ou PMIRRAS (Polarized Modulation - Infrared Reflexion Absorption Spectroscopy).

II.2.2. **Etude in-situ des couches minces orientées à l'interface air-eau par PM-IRRAS**

II.2.2.1. ***Principe et avantages du PM-IRRAS***

La spectroscopie PM-IRRAS (Polarization Modulation InfraRed Reflexion-Absorption Spectroscopy) est utilisée pour réaliser des mesures de spectroscopie infrarouge sur des monocouches à l'interface air-eau (Buffeteau et al. 1991; Blaudez et al. 1996; Calvez et al. 2001). Cette technique a été mise au point pour la première fois en France au Laboratoire de Physico-Chimie Moléculaire de l'Université Bordeaux 1 dans les années 90 (Blaudez et al. 1993). Son principe est basé sur l'anisotropie du champ électrique E à la surface d'une interface (épaisseur <100Å). Cette spectroscopie combine trois techniques (Ferraro and Basile 1982):

- La spectroscopie IRRAS développée par Greenler dans les années 60 (Greenler et al. 1966)
- Un modulateur photoélastique pour moduler rapidement la polarisation du champ électrique incident entre les polarisations *p* et *s*.
- Un traitement électronique qui permet de filtrer, démoduler et de traiter mathématiquement le signal reçu par le détecteur : on obtient ainsi un signal de réflectivité différentiel normalisé :

$$S(d) = \frac{\left|(R_p(d) - R_s(d)) \cdot J_2(\varphi_0)\right|}{(R_p(d) + R_s(d)) \pm (R_p(d) - R_s(d)) \cdot J_0(\varphi_0)} \qquad \text{(A.1)}$$

Avec R_p et R_s les réflectivités polarisées, J_0 et J_2 les fonctions de Bessel à l'ordre zéro et 2, *p* la polarisation parallèle au plan d'incidence, *s* la polarisation perpendiculaire au plan d'incidence et *d* l'épaisseur de la couche.

Avec la normalisation en temps réel du signal, la spectroscopie PM-IRRAS s'affranchit des fluctuations temporelles du montage optique et de l'échantillon. De plus, en discriminant les absorptions anisotropes de la couche à l'interface des absorptions isotropes de l'environnement, elle permet d'améliorer la détectivité du signal. Elle permet ainsi une analyse *in situ*, car le montage est installé à l'air libre.

Sur un diélectrique, la simulation du signal PM-IRRAS en fonction de l'angle d'incidence normalisé par le spectre PMIRRAS de la sous-phase montre que, quelque soit l'orientation du moment de transition (x,y,z), il existe deux angles d'incidence pour lesquels le signal PM-IRRAS est maximum.

Expérimentalement, c'est l'angle d'incidence rasant proche de 75° qui donne le meilleur rapport signal sur bruit. A cet angle la règle de sélection est la suivante:

- un moment de transition d'un groupement moléculaire perpendiculaire à la normale à la surface produit une bande d'absorption positive.

- un moment de transition d'un groupement moléculaire parallèle à la normale à la surface, produit une bande d'absorption orientée négative.

- pour une orientation particulière du moment de transition par rapport à la normale à l'interface ($\theta \approx 39°$, angle magique), il y a une extinction de la bande d'absorption.

La **Figure A - 7** présente les simulations des spectres PMIRRAS normalisés d'une vibration dont le moment de transition varie de 0 à 90°.

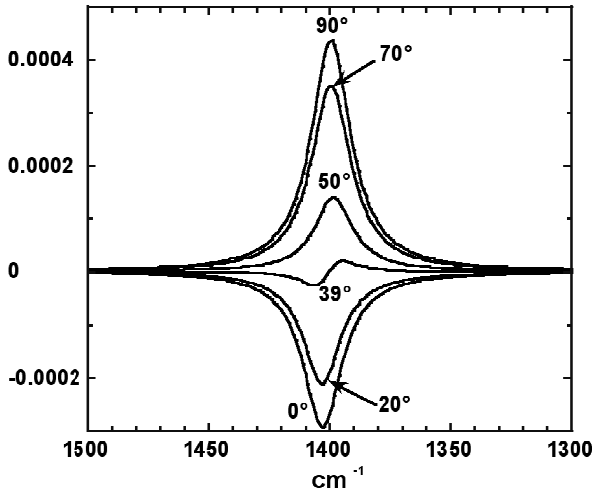


Figure A - 7: Calculs des spectres PM-IRRAS normalisés d'une bande absorption (1400 cm^{-1}) d'une couche mince sur l'eau dont le moment de transition fait un angle variable avec la normale à la surface.

À partir des spectres PM-IRRAS expérimentaux, il est donc possible de remonter à l'orientation des groupements moléculaires constituant les molécules présentes à l'interface. Ce sont ces règles que nous utiliserons pour l'analyse des monocouches de lipides et de protéines à l'interface air-eau. Expérimentalement, pour supprimer la contribution de la sous-phase et la dépendance de la fonction de Bessel, les spectres des films interfaciaux sont normalisés par celui de la sous-phase. De plus, la contribution résiduelle de la vapeur d'eau est supprimée par soustraction d'un spectre de vapeur d'eau.

Dans ce travail nous nous sommes particulièrement intéressés aux bandes amides des protéines, donnant accès à la nature et à l'orientation des structures secondaires des protéines ainsi qu'aux vibrations des phospholipides.

II.2.2.2. ***Montage expérimental***

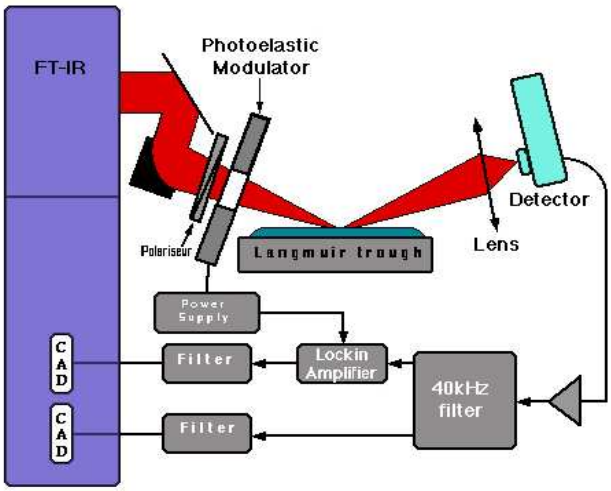


Figure A - 8: Montage expérimental de la spectroscopie PM-IRRAS à l'interface air-eau.

Le montage optique présenté sur la **Figure A - 8** est composé d'un spectromètre à transformé de Fourier ThermoOptek, Nexus 870, d'un modulateur photoélastique à cristal ZnSe (Hinds) d'un détecteur photovoltaïque de type MCT (SAT) refroidi à l'azote liquide (77°K), d'une détection synchrone numérique Stanford et deux filtres passe-bas passe-haut Stanford. Les spectres obtenus résultent de l'accumulation de 600 spectres à une résolution de 8 cm^{-1}, soit environ 7 minutes d'acquisition.

La spectroscopie PMIRRAS permet donc d'obtenir des informations structurales ainsi que l'orientation des groupements moléculaires formant les monocouches à l'interface air-eau.

II.2.3. **Etude de la structure et orientation des couches par la spectroscopie ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared spectroscopy)**

Les bicouches de lipides sont réalisées par éclatement de SUV sur un cristal de germanium à une seule réflexion (cellule *Miracle, Spike Technology*) afin de pouvoir les observer en présence des protéines par la spectroscopie ATR-FTIR polarisées.

La spectroscopie ATR-FTIR fonctionne sur le principe de la réflection interne: Lorsqu'une onde se propage dans un milieu indice n_1 puis se réfléchit à l'interface d'un autre milieu d'indice plus faible n_2, la réflexion est totale si l'angle incident est plus grand qu'une valeur limite θ_t, **Figure A - 9**.

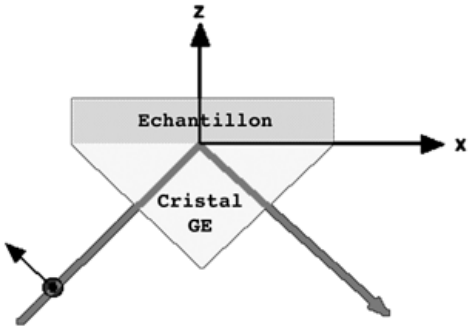


Figure A - 9: Réflexion totale sur le cristal ATR d'indice n_1 (>n_2).

Cette réflexion crée une onde évanescente (dans le milieu 2) qui peut interagir avec les moments de transition des vibrations des molécules se trouvant au voisinage de l'interface. Dans le cas d'un cristal de germanium utilisé avec un angle d'incidence de 45° la profondeur de pénétration de l'onde évanescente est de l'ordre de 1 micron et l'essentiel du signal est donné par les 300 premiers nm. L'utilisation successive des polarisations linéaires *p* et *s* permet de créer respectivement les champs électriques suivant (z,x) et y. Connaissant la valeur des champs électriques suivant x, y, z, le rapport dichroïque r_d=Ap/As permet de remonter aux orientations des moments de transitions des groupes moléculaires principaux des lipides et protéines (Tamm and Tatulian 1997).

De plus, nous présentons dans l'annexe III une méthode originale mise au point au cours de ce travail qui permet d'éliminer la composante isotrope de l'eau de la composante anisotrope des films ultraminces ce qui facilite l'analyse de l'interaction des protéines avec les lipides.

Déconvolution des spectres ATR-FTIR

Avant toute décomposition les spectres ATR ont été corrigés du phénomène lié à la profondeur de pénétration à l'aide de l'algorithme de correction du logiciel OMNIC faisant intervenir l'indice du cristal. Les positions essentielles des composantes ont été obtenues à l'aide de la fonction dérivée seconde (OMNIC software, Thermo Fisher Scientific) et du jeu de paramètres précédemment utilisés par Berthelot et al. (Berthelot et al. 2011) pour la déconvolution de spectres de WT et M8. La déconvolution a été réalisée entre 1750 et 1500 cm^{-1} à l'aide du logiciel GRAMS32 (Thermo Fisher Scientific) à l'aide d'un jeu de paramètres dans lequel les largeurs étaient fixées et les formes spectrales (Gaussian (90%)-Lorentzian (10%) et/ou les positions en fréquence ne pouvaient effectuer que de petits déplacements (**Tableau A - 4**).

Tableau A - 4: Attribution spectrale des bandes d'amides I pour les protéines WT et M8

Structure secondaire		Nombre d'onde (cm^{-1})		Largeur à mi-hauteur des bandes (cm^{-1})	Profil
Bande	**Structure**	**WT**	**M8**		
1	Feuillets β antiparallèles	1692	1692	15	10% Lorentzian
2	Turns β	1684	1684	30	10% Lorentzian
3	Turns β	1666	1667	29	10% Lorentzian
4	Random coil	1649	1645	35	10% Lorentzian
5	Feuillets β parallèles	1638	1632	20	10% Lorentzian
6	Feuillets β antiparallèles	1626	1625	21	10% Lorentzian

Nous avons attribué les bandes à l'aide des données de Goormaghtigh et al. (Goormaghtigh et al. 1994b). La contribution relative des différentes bandes (aire) a été déterminée à partir des meilleurs ajustements obtenus pour la bande amide I avec des erreurs standards de moins de 1,5%.

II.3. **La spectroscopie PWR (Plasmon Waveguide Resonance spectroscopy)**

II.3.1. **Principe général**

La spectroscopie PWR est basée sur le couplage de la résonance plasmon de surface de films métalliques minces avec l'onde dirigée d'une couche diélectrique adjacente. Ce couplage résulte dans l'excitation des deux résonances différentes suivant les deux polarisations de la lumière incidente (Salamon et al. 1997). La résonance est obtenue en variant l'angle d'incidence grâce à une table tournante supportant le prisme. Le montage PWR que nous avons utilisé est constitué d'un film mince d'Ag déposé sur un prisme, l'ensemble est ensuite couvert par une couche diélectrique (SiO_2) (**Figure A - 10 A**).

Les principaux avantages du PWR par rapport à la technique classique de SPR sont : (1) l'amplification des intensités électromagnétiques au niveau de la surface diélectrique avec une augmentation de la sensibilité et de la résolution; (2) l'excitation de la résonance pour les deux polarisations *s* et *p* de l'onde incidente ce qui permet de mesurer l'anisotropie de l'indice de réfraction et du coefficient d'absorption du film déposé à la surface du cristal (**Figure A - 10 B**) et (3) le dépôt de la couche SiO_2 sert de collage mécanique et chimique pour le film métallique.

Les paramètres mesurés sont : les angles de résonance, la largeur des spectres et la profondeur des spectres. Ces paramètres sont directement liés à l'indice de réfraction, au

coefficient d'extinction à la longueur d'onde utilisée et à l'épaisseur des couches présentées à l'interface. Les mesures de PWR permettent de remonter aux changements massiques et structuraux des couches lors d'interactions produites à l'interface.

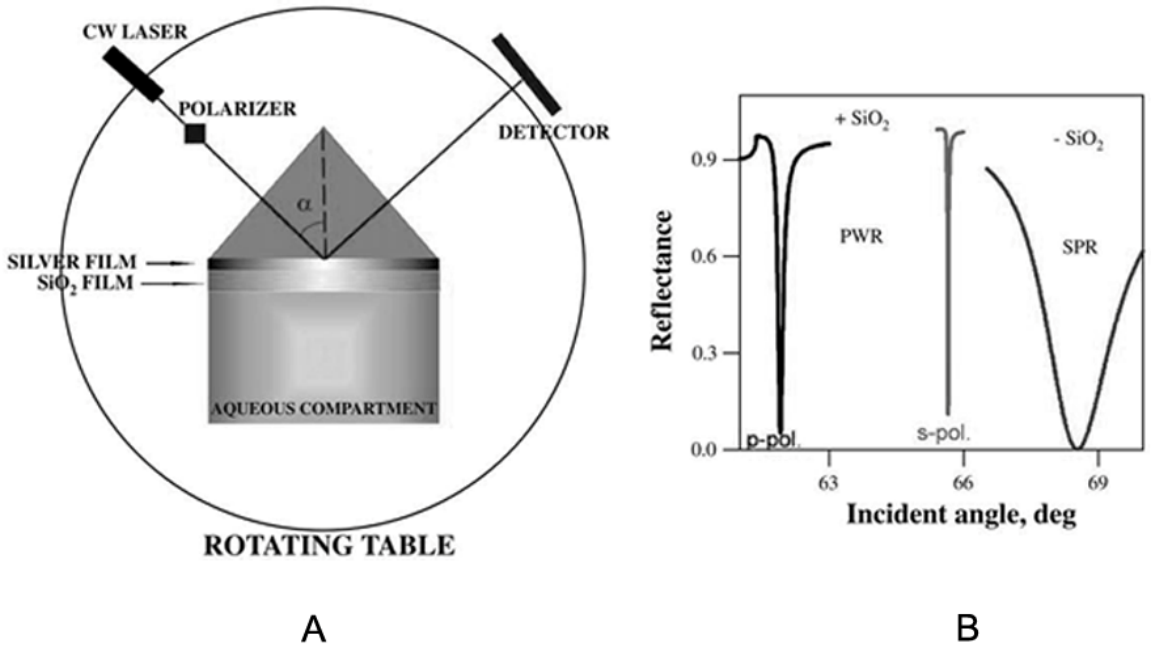


Figure A - 10: Montage d'un spectrophotomètre PWR (d'après (Hruby et al. 2010)

II.3.2. **Application aux études d'interactions protéine-lipide**

Un avantage de la spectroscopie PWR provient de l'utilisation des deux polarisations perpendiculaire et parallèle au plan d'incidence, *s* et *p* ce qui permet d'étudier l'anisotropie des couches déposées à la surface du prisme sans utiliser de molécules marquées (radioactives, fluorescentes..). Cet avantage répond bien aux conditions d'études des membranes protéo-lipides et des interactions protéine-lipide, protéine-protéine, protéine-ligand en permettant de distinguer en temps réel les changements de structure et de masse produite au sein de ou à la surface d'un film anisotropique. Dans le cadre d'une expérience les résultats obtenus peuvent être analysés à trois niveaux :

- Evaluation des constantes d'affinité K_d des interactions en appliquant les modèles d'interactions.

- Analyse graphique (Salamon and Tollin 2004): les déplacements d'angles de résonance en polarisation *s* et *p* lors de l'interaction des protéines avec la bicouche supportée de lipides sont transférés d'une coordonnée *s-p* à une coordonnée masse-structure. Cette dernière permet de déterminer les changements en masse et en structure dues aux interactions protéine-lipide, **Figure A - 11**.

- Un modèle mathématique basé sur les fonctions de Maxwell permet d'ajuster les courbes réflectance-angle d'incidences expérimentales pour en tirer des informations sur

l'indice de réfraction, le coefficient d'extinction et l'épaisseur des couches à la surface résonante.

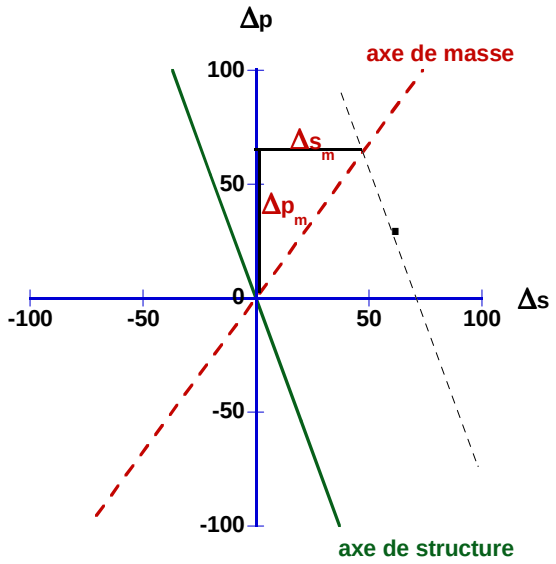


Figure A - 11: Analyse graphique de changement en masse et en structure des couches à l'interface du prisme (adapté de (Salamon and Tollin 2004)).

Cette technique a été largement utilisée pour étudier des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs). Ces études ont permis de conclure sur la spécificité des GPCRs pour ses ligands et également la spécificité conformation/fonction des GPCRs (Salamon et al. 2005; Hruby et al. 2010).

II.4. Expérience de détection de la perméabilisation membranaire (relargage de calcéine)

Nous avons étudié la capacité des protéines WT et M8 au cours de leur processus d'agrégation à induire la fuite d'un marqueur fluorescent, la calcéine, encapsulé dans les liposomes. Ce test est basé sur la forte fluorescence de la calcéine à concentration diluée et sur son extinction de fluorescence à concentration saturée. Les liposomes contenants de la calcéine saturée sont préparés par extrusion comme décrit précédemment.

Les protéines à l'état monomère sont incubées avec des liposomes de compositions lipidiques différents dans du tampon Tris à pH 7,4 dans les puits des plaques de microtitration noires à fond plat (Greiner bio-one). La fluorescence du mélange de protéine, lipide, calcéine dans les puits est suivie dans le temps (F_t). A la fin, 5 µL de 10% Triton X-100 est ajouté dans chaque puits afin d'obtenir la fluorescence maximale correspondant à la lyse de 100% des liposomes (F_f). Le pourcentage de fuite de calcéine (L_t) est calculé selon l'équation:

$$L_t = \frac{F_t - F_0}{F_f - F_0} * 100 \qquad (A.2)$$

où F_0 est l'intensité de fluorescence au temps t=0.

III. Méthode pour déterminer l'anisotropie de structure secondaire des couches organisées sur le cristal ATR

Le rapport dichroïque $R_{ATR} = \frac{A_p}{A_s}$ des spectres infrarouges ATR est égal à 2 pour un échantillon isotrope et épais déposé sur un cristal de germanium ou diamant utilisé à l'angle d'incidence de 45°. Un rapport dichroïque plus grand que 2 indique un moment de transition principalement dans la direction z, inversement, un rapport dichroïque inférieur à 2 correspond à un moment de transition essentiellement dans le plan (x, y) du cristal. A partir de ces observations, la valeur :

$$\Delta_{2s-p} = 2 * A_s - A_p \qquad (A.3)$$

sera positive, négative ou nulle dépendant de l'orientation du moment de transition : dans le plan (x, y), perpendiculaire ou isotrope. On appelle cette valeur $\Delta_{2s\text{-}p}$: la différence dichroïque corrigée.

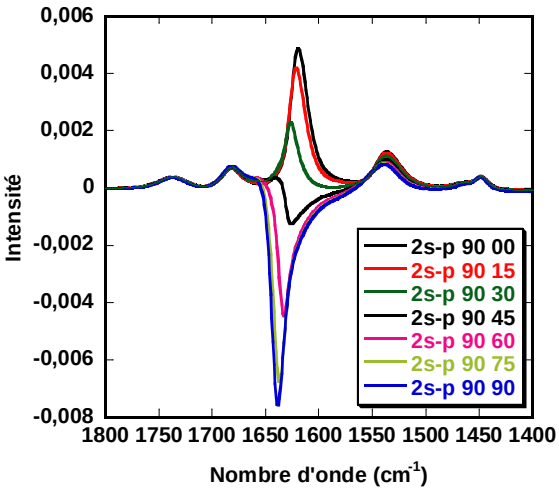


Figure A - 12: Spectres calculés $\Delta = \mathbf{2} * \boldsymbol{A_p} - \boldsymbol{A_s}$ pour les orientations différentes du feuillet β par rapport au plan de surface : θ = 90°; 0 < Ψ < 90° (90°-θ : l'angle entre les chaînes peptidiques et le plan de l'interface ; ψ : l'angle entre les liaisons hydrogènes et le plan de l'interface)

La **Figure A - 12** présente les différences dichroïques corrigées calculées pour différentes orientations par rapport à la surface du cristal ATR d'un feuillet β antiparallèle à 1624 cm^{-1}. Si les feuillets s'orientent parallèlement à l'interface, c'est-à-dire les chaînes peptidiques sont parallèles au plan de l'interface ($\theta = 90°$) et les liaisons hydrogène sont ainsi parallèles au plan de l'interface ($\psi = 0°$), la différence dichroïque corrigée a le profil de la courbe noire. Si les feuillets sont perpendiculaires à l'interface avec les liaisons hydrogène s'orientent perpendiculairement à l'interface ($\theta = 90°$, $\psi = 90°$), la différence dichroïque corrigée a le profil de la courbe bleue.

Bibliographie

Barth, A., and C. Zscherp. 2002. What vibrations tell us about proteins. *Q. Rev. Biophys.* 35 (4):369-430.

Berthelot, K., H. P. Ta, J. Gean, S. Lecomte, and C. Cullin. 2011. In vivo and in vitro analyses of toxic mutants of HET-s: FTIR antiparallel signature correlates with amyloid toxicity. *J. Mol. Biol.* 412 (1):137-152.

Bertie, J. E., and Z. Lan. 1996. Infrared Intensities of Liquids XX: The Intensity of the OH Stretching Band of Liquid Water Revisited, and the Best Current Values of the Optical Constants of H20(I) at 25 °C between 15,000 and 1 cm^{-1}. *Appl. Spectrosc.* 50 (8):1047-1057.

Blaudez, D., T. Buffeteau, J. C. Cornut, B. Desbat, N. Escafre, M. Pézolet, and J. M. Turlet. 1993. Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air-water interface. *Appl. Spectrosc.* 47 (7):869-874.

Blaudez, D., J. M. Turlet, J. Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau, and B. Desbat. 1996. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92:525-530.

Buffeteau, T., and B. Desbat. 1989. Thin-film optical constants determined from infrared reflectance and transmittance measurements. *Appl. Spectrosc.* 43 (6):1027-1032.

Buffeteau, T., B. Desbat, and J. M. Turlet. 1991. Polarization Modulation FT-IR Spectroscopy of Surfaces and Ultra-thin Films: Experimental Procedure and Quantitative Analysis. *Appl. Spectrosc.* 45 (3):380-389.

Calvez, E. L., D. Blaudez, T. Buffeteau, and B. Desbat. 2001. Effect of Cations on the Dissociation of Arachidic Acid Monolayers on Water Studied by Polarization-Modulated Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy. *Langmuir* 17 (3):670-674.

Ferraro, e. J. R., and L. J. Basile. 1982. Fourier Transform Infrared Spectroscopy *L. J.Academic Press* 3.

Goormaghtigh, E., V. Cabiaux, and J. M. Ruysschaert. 1994a. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds. *Subcell. Biochem.* 23:329-362.

———. 1994b. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell. Biochem.* 23:405-450.

Greenler, R. G., K. W. Adolph, and G. H. Emmons. 1966. A compact polarizer for the infrared. *Appl. Opt.* 5 (9):1468-1469.

Hruby, V. J., I. Alves, S. Cowell, Z. Salamon, and G. Tollin. 2010. Use of plasmon waveguide resonance (PWR) spectroscopy for examining binding, signaling and lipid domain partitioning of membrane proteins. *Life Sci.* 86 (15-16):569-574.

Rouser, G., S. Fkeischer, and A. Yamamoto. 1970. Two dimensional then layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5 (5):494-496.

Salamon, Z., H. A. Macleod, and G. Tollin. 1997. Coupled plasmon-waveguide resonators: a new spectroscopic tool for probing proteolipid film structure and properties. *Biophys. J.* 73 (5):2791-2797.

Salamon, Z., and G. Tollin. 2004. Graphical analysis of mass and anisotropy changes observed by plasmon-waveguide resonance spectroscopy can provide useful insights into membrane protein function. *Biophys. J.* 86 (4):2508-2516.

Salamon, Z., G. Tollin, I. Alves, and V. Hruby. 2005. Plasmon resonance methods in membrane protein biolgy: Applications to GPCR signaling. *Methods in enzymology* 461:123-146.

Steunou, S., J. F. Chich, H. Rezaei, and J. Vidic. 2010. Biosensing of lipid-prion interactions: insights on charge effect, Cu(II)-ions binding and prion oligomerization. *Biosens. Bioelectron.* 26 (4):1399-1406.

Tamm, L. K., and S. A. Tatulian. 1997. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* 30 (4):365-429.

Curriculum vitae

TA Ha Phuong

ETUDES et DIPLOMES

2008 – 2011 **Préparation d'un doctorat :** « Etude de la relation structure – toxicité des protéines amyloïdes en interaction avec des membranes modèles » au sein du groupe de spectroscopies vibrationnelles du CBMN (Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets), CNRS, UMR 5248, 33607, Pessac, France

2007 - 2008 **Master 2 Recherche en chimie pharmaceutique**
Option : « Produits naturels : Isolement et Analyse », Université Paris-Sud 11.
3e/10 en Juin 2008, mention assez bien.
(Bourse de l'Ambassade de France au Vietnam pour l'étude de master 2 recherche en France (10mois))

2006 **Diplôme de Pharmacie,** Université de Pharmacie de Hanoi, Vietnam.
7e/245 en juin 2006
Mention très bien.

2001 **Baccalauréat**, Lycée à Option spécifique en physique de l'École Supérieure des Sciences Naturelles, Hanoi, Vietnam.
Mention très bien.

EXPÉRIENCES PROFESSIONNELLES

Expérience Professionnelle

2006 – 2007 Chercheur, Laboratoire de plantes médicinales, Institut National du Contrôle de la Qualité des Médicaments, Hanoi, Vietnam (15 mois).
• Participation à la construction de quelques monographies en Pharmacopée vietnamienne.

Stages

2008 Stage de Master 2 au laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Paris-Sud 11 : *"Criblage bioguidé de Ganoderma capense pour une activité inhibitrice de la P-gp"* (6 mois).

2007 Stage au Laboratoire de produits cosmétiques, Institut National du Contrôle de la Qualité des Médicaments, Hanoi, Vietnam : *"Contribution à l'établissement d'une méthode de dosage des métaux lourds et des caractères microscopiques pour la monographie de Cynara scolymus dans la Pharmacopée vietnamienne"* (4 mois).

2005 Stage de pharmacie à l'Hôpital Saint Paul (Hanoi, Vietnam) (1,5 mois).

PUBLICATIONS

- Ta HP., Berthelot K., Coulary-Salin B., Desbat B., Géan J., Servant L., Cullin C., Lecomte S., Comparative studies of nontoxic and toxic amyloids interacting with membrane models at the air-water interface. *Langmuir*. 2011, 27(8):4797-807.
- Berthelot K., Ta HP., Géan J., Lecomte S., Cullin C., InVivo and In Vitro Analyses of Toxic Mutants of HET-s: FTIR Antiparallel Signature Correlates with Amyloid Toxicity. *J Mol. Biol.* 2011, 412(1):137-52.

- Belbachir K., Lecomte S., Ta H.P., Petibois C., Desbat B., Orientation of molecular groups of fibers in nonoriented samples determined by polarized ATR-FTIR spectroscopy, Anal. Bioanal. Chem., 2011, 401 (10): 3263-3268.
- Ta HP., Berthelot K., Cullin C., Alves I., Lecomte S. A yeast toxic mutant of HET-s disrupts membrane integrity. Article en préparation.
- Ta HP., Desbat B., Petibois C., Lecomte S. A simple method for the determination of the anisotropic orientation in organized molecular system by ATR-FTIR – Application to analyze the interaction of protein with supported phospholipid bilayers in aqueous buffer. Article en préparation.

CONFERENCES INTERNATIONALES

Aug. 2011	8ème Conférence européenne de biophysiques, Budapest, Hungary Poster: **Amyloid protein-membrane interaction studies** *Prix du meilleur poster*
Juillet 2010	13ème Conférence international des films moléculaires organisés, Québec, Canada Poster **: Amyloid proteins: a structure/toxicity relationship study**

CONFERENCES NATIONALES

Oct. 2010	11ème Journée francophone des jeunes physico-chimistes, Autran, France Oral: **Structure/toxicity relationship study of amyloid proteins**
Juillet 2010	Journée scientifique de l'ISM (Institut des Sciences Moléculaires), Talence, France Poster : **Amyloid/membrane interaction studies** *Prix du meilleur poster*
Mai 2010	3ème journée des jeunes chercheurs IECB, Pessac, France Poster : **Amyloid/membrane interaction studies**
Mai 2009	2ème journée des jeunes chercheurs IECB, Pessac, France
Mai 2009	16ème Conférence du groupe français des peptides et protéines (16ème GFPP), Albéville, France Oral: **Structure/toxicity of prion proteins study - an approach by vibrational spectroscopy and ellipsometry**

Résumé

Ce mémoire rapporte les études de protéines amyloïdes en interaction avec des membranes modèle afin d'établir une relation structure toxicité.

Nous avons choisi différents modèles membranaires (monocouches, bicouches) de composition lipidique et charges différentes et utilisé différentes méthodes physico-chimiques afin de caractériser les interactions des protéines amyloïdes avec les membranes.

Nous avons montré l'importance de la contribution électrostatique dans les interactions de la protéine amyloïde HET-s (218-289) et ses mutants avec les membranes modèles.

L'ellipsométrie a démontré que les mutants toxiques de HET-s (218-289) (M8, WT.Y1Y2V2) perturbent fortement les monocouches lipidiques à l'interface air-eau. La structure riche en feuillets β antiparallèles des protéines à l'interface air-eau et dans l'interaction avec les monocouches de lipides a été démontrée par la spectroscopie PM-IRRAS (Polarization Modulation – Infrared Reflection Absorption Spectroscopy). Nous avons établie que l'interface air-eau peut modifier l'agrégation des protéines amyloïdes.

A l'aide de la spectroscopie de fluorescence, la spectroscopie PWR (Plasmon-Waveguided Resonance) et la spectroscopie ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection – Fourier Transform Infrared), nous avons mis en évidence que la protéine toxique M8 adopte une structure riche en feuillets β antiparallèles en altérant fortement l'intégrité des bicouches lipidiques. Au contraire, la protéine non toxique WT se structure en feuillets β parallèles dans ces interactions et elle ne perturbe pas l'homogénéité des membranes. La toxicité de la protéine M8 semble liée à son organisation différente et à sa capacité à réorganiser les membranes.

Nos résultats confortent également l'hypothèse de la toxicité des oligomères amyloïdes.

Une étude sur la fabrication d'une cellule microfluidique pour la séparation de différents types d'auto-assemblage afin de les détecter et de les étudier en interaction avec des liposomes par spectroscopie infrarouge est présentée. Une cellule microfluidique de CaF_2 de 8 µm d'épaisseur de canaux est obtenue et est utilisée pour la détection d'une protéine de test.

Mots clés : Amyloïde, Prion, HET-s (218-289), Ellipsométrie, Tensiométrie, PM-IRRAS, ATR-FTIR, PWR.

Abstract

This manuscript reports the studies of amyloid proteins in interaction with membrane models in order to establish their structure-toxicity relationship.

Membrane models (monolayer, bilayer) of different charge and lipid composition were used. We used various physicochemical methods to characterize the interaction of these amyloid proteins with membranes.

We showed the importance of the electrostatic contribution in the interactions of the amyloid protein HET-s (218-289) and its mutants with model membranes.

Ellipsometry showed that the toxic mutants of HET-s (218-289) (M8, WT.Y1Y2V2) strongly disturbed the lipid monolayers at the air-water interface. The structure rich in antiparallel β sheets of auto-assembled proteins at the air-water interface and in interaction with lipid monolayers at the air-water interface has been demonstrated by the PM-IRRAS spectroscopy (Polarization Modulation - Infrared Reflection Absorption Spectroscopy). We established that the air-water interface can change the aggregation properties of amyloid proteins.

By using fluorescence spectroscopy, PWR spectroscopy (Plasmon Resonance-Waveguided spectroscopy) and ATR-FTIR spectroscopy (Attenuated Total Reflection - Fourier Transform Infrared spectroscopy), we found that the toxic protein (M8) adopted a structure rich in antiparallel β sheets greatly altered the integrity of lipid bilayers. In contrast, the protein non-toxic (WT) organized in a structure rich in parallel β sheets in these interactions and it did not disturb the homogeneity of the membranes. The toxicity of the protein M8 appears to be related to its different organization and its ability to rearrange membranes.

Our results also support the hypothesis of the toxicity of amyloid oligomers.

A study on the fabrication of a microfluidic cell for the separation of different aggregation states of amyloid proteins in order to detect these assemblies and to study their interaction with liposomes by infrared spectroscopy is presented. A CaF_2 microfluidic cell with channels of 8 µm of thickness was obtained and was used for the detection of a tested protein.

Key words: Amyloid, Prion, HET-s (218-289), Ellipsometry, Tensiometry, PM-IRRAS, ATR-FTIR, PWR.