

Université de Franche-Comté

UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques

**Mécanisme d'association de deux protéines amyloïdogènes à
l'héparane sulfate protéoglycane. Rôle du pH et de l'activité
protéasique de la transthyrétine**

THESE

**Présentée à
l'UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques de l'Université de
France Comté
par**

GENESTE Ambre

**Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Franche Comté en Sciences de la
Vie et de la Santé**

Thèse dirigée par Claire André
Soutenue le 26 Novembre 2014

JURY:

TIJANI GHARBI	Professeur-Université de Besançon	Président du jury
Geneviève UBEAD-SEQUIER	Professeur-Université de Strasbourg	Rapporteur
Jean-Marc Millot	Professeur-Université de Reims	Rapporteur
Claire ANDRE	HDR- Maître de conférences Université de Besançon	Examineur
Bernard DO	Professeur-Université Paris Descartes	Examineur

RESUME

L'analyse du mécanisme d'interaction de l'héparane sulfate protéoglycane (HSPG) avec les protéines amyloïdes et l'effet de paramètres physiologiques (pH,...) sur ce mécanisme nous permettent une meilleure compréhension des mécanismes menant à l'amyloïdogenèse.

La transthyrétine (TTR), molécule circulant à la fois dans le plasma et dans le liquide céphalo-rachidien, est une des protéines impliquée dans les amyloses. Elle est responsable des amyloses à la TTR et elle joue un rôle dans la maladie d'Alzheimer en séquestrant la protéine bêta-amyloïde (A β). La biochromatographie est un outil très efficace pour analyser le mécanisme entre un ligand et son récepteur dans des conditions modulables et se rapprochant des conditions biologiques. De plus, les nanotubes de carbones (NTCs) peuvent être utilisés pour détecter ou transporter des molécules qui se lient sur leur surface externe et peuvent interagir avec d'autres composés.

Au cours de ce travail, un support particulière a été utilisé où l'HSPG est immobilisé sur des particules de silice pré-activées par des résidus amines. Ce support remplissant une colonne chromatographique a permis dans un premier temps d'étudier et de comparer les mécanismes d'association entre l'HSPG et une forme sauvage de la TTR et une forme sénile de la TTR extraite d'un patient décédé des suites d'une amylose sénile à la TTR. Cette étude a montré que pour la TTR sauvage, l'association avec l'HSPG est indépendante du pH et implique des interactions faibles. Pour la TTR sénile, cette association est dépendante du pH. A pH<6,5, la protonation d'un résidu histidine est observée. De plus, l'étude des paramètres thermodynamiques et de la compensation enthalpie/ entropie montrent un changement dans le mécanisme de fixation avec l'apparition d'interactions ioniques à pH<6,5. Un pH acide est nécessaire pour dissocier et dénaturer partiellement la TTR. L'affinité de la TTR avec l'HSPG dépend de la structure tétramérique quaternaire de la TTR qui présente alors des résidus capables de créer des interactions. Dans un deuxième temps, cette colonne a permis d'évaluer l'effet de la TTR et du pH sur la liaison A β /HSPG. Comme précédemment, la protonation d'un résidu histidine présent sur la A β est observée à pH<6,5. Ce résultat confirme des études menées auparavant sur le précurseur de la protéine A β . Les résultats thermodynamiques ont mis en évidence que l'affinité de A β avec l'HSPG diminuait avec la concentration croissante en TTR et l'étude des chromatogrammes associés a montré que la TTR ne séquestrait pas seulement A β mais la clivait en fragments plus courts qui diminuent son affinité avec l'HSPG. Dans la maladie d'Alzheimer, la TTR exerce une activité protéolytique vis-à-vis de A β .

Dans un troisième temps, l'effet de la fonctionnalisation de la TTR par des nanotubes de carbone sur la liaison TTR/HSPG a été étudié. Les résultats obtenus montrent que les interactions entre l'HSPG et la TTR-NTC sont de type van der Waals et hydrogène. Les paramètres thermodynamiques des liaisons TTR/HSPG et TTR-NTC/HSPG sont similaires pour des $\text{pH} > 6$. A $\text{pH} < 6$, il n'existe quasiment pas de différences entre les valeurs obtenues à $\text{pH} > 6$ et celles obtenues à $\text{pH} < 6$. Les NTCs empêcheraient la formation de liaisons ioniques .

The analysis of the heparan sulfate proteoglycan (HSPG) association mechanism with amyloid proteins and the effect of physiological parameters (pH,...) on this mechanism allow a better understanding of the mechanisms leading to amyloidogenesis.

Transthyretin (TTR), which circulates in both plasma and cerebrospinal fluid, is one of the proteins involved in amyloidosis. It leads to TTR amyloidosis and plays a role in Alzheimer's disease in sequestering the beta-amyloid (A β) protein. Biochromatography is an effective tool for the analysis of the mechanism involved between a ligand and its receptor in adjustable conditions which could be close to biological conditions. Moreover, carbon nanotubes can be used to detect or to carry molecules which bind on its external surface and could interact with other molecules.

In this work, a particulate support was used where the HSPG was immobilized on the silica particles preactivated by amine residues. This support filling a column was used to study and compare association mechanisms between HSPG and a wild type TTR form and a senile form of the TTR which was extracted from a patient who died of cardiac failure with a senile systemic amyloid. This study showed that the association between wild type TTR and HSPG was independent of the pH and involved weak interactions.

For the senile TTR, this association was dependent on pH. At pH<6,5, a histidine residue was protonated. Moreover, the study of both thermodynamical parameters and enthalpy-entropy compensation showed a change in the association mechanism with involvement of more ionic interactions at pH<6,5. An acidic pH was necessary to dissociate and partially denaturate the TTR. The affinity of the TTR with HSPG depends on the tetrameric quaternary structure of the TTR which presents some residues which are able to create interactions.

In a second time, this column was used to evaluate the effect of both the TTR and the pH on A β /HSPG binding. As previously, the protonation of a histidine residue present on A β was observed at pH<6,5. This result confirmed studies on the A β precursor. Thermodynamical values highlighted that the affinity of A β for l'HSPG decreased with the increase of TTR concentration, and the study of the chromatograms associated showed that TTR sequestered A β and cut A β in smaller fragments which decreased its affinity for HSPG. In Alzheimer's disease, TTR has a proteolytic activity on A β .

In a third time, the effect of the carbon nanotubes (CNTs), immobilized on TTR, on the TTR/HSPG binding was studied. Results showed that interactions between TTR-NTC and HSPG are van der Waals and hydrogen. Thermodynamical data of TTR/HSPG et TTR-NTC/HSPG bindings are similar at pH>6. At pH<6, no differences between values obtained at all pH values for TTR-NTC. NTCs would avoid ionic interactions formations.

Remerciements

Ce travail de recherche a été effectué au sein du Laboratoire de Chimie Analytique et Pharmaceutique de la faculté de Médecine et Pharmacie de Besançon, sous la direction et la supervision de Monsieur le professeur Yves Guillaume, Madame le docteur Claire André et de Madame le professeur Nadine Magy-Bertrand.

Mes directeurs de thèse :

Merci pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse. Merci de votre amitié et de votre soutien tout au long de ma thèse ainsi que pour votre encadrement. Vos conseils me serviront toujours, j'ai énormément appris à vos côtés.

M. Benson :

Vous m'avez transmis votre amour pour ces maladies, et vous m'avez permis de les comprendre. Vous m'avez accueillie vous et votre équipe et vous avez été d'une incroyable gentillesse. Une pensée très particulière et chaleureuse pour Joyce Hardwick pour ces trois mois extraordinaires passés à Indianapolis.

Les membres du Jury :

Merci d'avoir fait l'honneur de juger ce travail et pour votre présence.

Les autres personnes :

Je tiens à remercier tous les membres ou anciens membres du laboratoire de chimie analytique :

-Lydie : tu es la meilleure et la plus gentille des ASI !!

-Mireille : merci pour tes supers conseils en chromatographie quand ma colonne était bouchée sans toi j'aurais vraiment galéré !

-Anne-Marie : merci pour vos cafés, vos gâteaux au spéculos et tous les services que vous m'avez rendus,

- Fatimata, Anne, Iva, Danaé, Firas : merci pour votre bonne humeur et pour m'avoir supportée !

- Rania : merci d'avoir été là et merci pour tout ce que tu sais, tu as été LE rayon de soleil de ma thèse.

Je tiens à remercier aussi les autres personnes de la faculté : Marc, Vince, Lhassane, ...

Une mention spéciale pour mes collègues de bureau qui sont devenues des amies très chères : Rita et Céline, ma péruvienne et ma râleuse adorées : j'espère que je ne vous ai pas trop saoulées ! En tout cas j'ai passé de supers moments avec vous au bureau et en dehors. Merci pour tout ! Céline ne change jamais stp !

Merci Adrian pour m'avoir poussé à faire cette thèse et à avoir cru en moi.

Merci à tous mes colocs (Nico, Alexis, Antoine et Laure) et mes amis (joueurs de coinche et les autres...) pour m'avoir soutenue et m'avoir fait ADORER la vie bisontine (ce n'était pas gagné à la base !).

Mes derniers remerciements vont bien sûr à ma famille : merci pour votre soutien, votre patience, votre amour. Sans vous je n'en serais pas là. Et un remerciement sans fin pour mes parents : cette thèse je vous la dédie. Je vous aime.

A mes parents adorés,

Principales abréviations

A : aire
AA: *acide amine*
 α : *polarisabilités électriques*
A β : *β -amyloïde*
Ach: *acétylcholine*
APP: *amyloid protein precursor*
ARN: *acide ribonucléique*
ASO: *oligonucléotides antisens*
ATTR: *amyloses à la transthyrétine héréditaires*
CAF: *cardiac amyloid familial*
CEE : *compensation enthalpie entropie*
CLHP : *Chromatographie Liquide Haute Performance*
Da: *Dalton*
D.O : *densité optique*
EDTA : *acide éthylène diamine tétraacétique*
E_{Debye} : *Energie de Debye : effets d'orientation*
E_{Keesom} : *Energie de Keesom : effets d'orientation*
E_{London} : *Energie de London : effets de dispersion*
 ϵ_0 : *Constante diélectrique du vide*
FAP: *familial amyloid polyneuropathy*
GAG: *glycosaminoglycane*
 ΔG° : *enthalpie libre standard ΔG° du processus de fixation du xénobiotique sur la phase stationnaire*
 ΔG°_β : *enthalpie libre standard ΔG° du processus de fixation du xénobiotique sur la phase stationnaire à la température β*
 ΔH° : *variation d'enthalpie libre*
 $\Delta H^\circ_{A\beta}$: *variation d'enthalpie libre de A β*
 $\Delta H^\circ_{NTC-TTR}$: *variation d'enthalpie libre de la TTR fonctionnalisée sur des NTCs*
 ΔH°_{sTTR} : *variation d'enthalpie libre de sTTR*
 ΔH°_{wtTTR} : *variation d'enthalpie libre de wtTTR*
His: *histidine*
HSPG : *héparane sulfate protéoglycane*
IDOX : *4'-iodo-4'-déoxydoxorubicine*
 k' : *facteur de rétention*
 $k'_{A\beta}$: *facteur de rétention de A β sur HSPG*
 k'_L : *facteur de rétention du ligand sur la macromolécule*
 k'_{sTTR} : *facteur de rétention de la sTTR sur HSPG*
 k'_{wtTTR} : *facteur de rétention de la wtTTR sur HSPG*
k ou h : *constante de Planck*
 K_L = *constante d'association ligand/macromolécule*
L : *ligand*
LCR: *liquide céphalo-rachidien*
Leu: *leucine*
M : *macromolécule*
 μ : *moments dipolaires des molécules considérées*
MA: *maladie d'Alzheimer*
Met: *méthionine*

Min: *minute*
MWNT : *multi-wall carbon nanotube*
NTC : *nanotube de carbone*
O.N : *overnight*
PBS: *phosphate buffer sodium ou tampon phosphate*
PITC : *phénylisothoniocyanate*
RPM : *rotations par minute*
RT(room temperature) : *température ambiante*
 ΔS : *variation d'entropie*
 $\Delta S_{A\beta}$: *variation d'entropie de $A\beta$*
 $\Delta S_{NTC-TTR}$: *variation d'entropie de la TTR fonctionnalisée sur les NTCs*
 ΔS_{sTTR} : *variation d'entropie de sTTR*
 ΔS_{wtTTR} : *variation d'entropie de wtTTR*
SAP: *serum albumin protein*
Sec: *seconde*
SSA: *senile systemic amyloidosis*
SSO : *oligonucléotides simples brins*
sTTR: *senile transthyretin*
SWNT : *single-wall carbone nanotube*
T.A : *température ambiante*
T : *température*
 t_0 : *temps mort de la colonne ou temps que met un soluté n'ayant aucune affinité pour la phase stationnaire*
 $t_{A\beta}$: *temps de rétention de $A\beta$ sur HSPG*
 t_{sTTR} : *temps de rétention de la sTTR sur HSPG*
 t_{wtTTR} : *temps de rétention de la wtTTR sur HSPG*
 tr : *temps de rétention ou temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué*
 t_L : *temps de rétention du ligand sur la macromolécule*
TTR: *transthyréine*
R : *constante des gaz parfaits*
 ν : *Fréquence électronique d'absorption*
Val: *valine*
wtTTR: *wild-type transthyretin*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	17
------------------------------------	-----------

BIBLIOGRAPHIE	23
----------------------------	-----------

I LES AMYLOSES	25
-----------------------------	-----------

I.1 Généralités	25
I.1.1 Introduction	25
I.1.2 La substance amyloïde	25
I.1.2.1 Diagnostic de l'amylose	25
I.1.2.2 Les protéines amyloïdes	26
I.1.2.3 Les autres composants de l'amylose	28
a) Les composants de la matrice extracellulaire	28
b) Les autres composants	28
I.1.3 Fibrillogenèse	29
I.1.3.1 Les fibrilles amyloïdes	30
a) Méthode d'étude	30
b) Morphologie des fibrilles amyloïdes	30
c) Modèle β -plissé antiparallèle de la fibrille amyloïde	30
d) Structure non β -plissée de la fibrille amyloïde	32
I.1.3.2 Les protéines précurseurs des fibrilles amyloïdes	32
I.2 Les amyloses à la transthyréine	34
I.2.1 La transthyréine	34
I.2.1.1 Généralités	34
I.2.1.2 Structure	35
I.2.1.3 La transthyréine dans les amyloses: formation des fibres amyloïdes	36
I.2.2 Les différents types d'amylose à la transthyréine	38
I.2.2.1 Les ATTR	38
I.2.2.2 Les amyloses à la transthyréine sénile (SSA)	39
I.2.3 Traitement actuel des amyloses	40
I.2.3.1 La greffe de foie (transplantation hépatique)	40
I.2.3.2 Les molécules synthétiques	40
I.2.3.3 Les autres stratégies	44
I.3 La maladie d'Alzheimer (MA)	46
I.3.1 Généralités	46
I.3.2 Mécanismes pathologiques	46
I.3.2.1 La dégénérescence neurofibrillaire	47
I.3.2.2 Les plaques amyloïdes	47
I.3.2.3 Traitements de la maladie d'Alzheimer	49
I.3.2.4 La transthyréine dans la MA	50
I.4 L'héparane sulfate protéoglycane	51
I.4.1 Structure	52
I.4.2 Spécificité des interactions HSPG/protéines	53
I.4.2.1 Les séquences consensus	53
I.4.2.2 Les acides aminés communément impliqués dans les domaines de liaison	53
I.4.3 L'HSPG dans les amyloses	53

II Structure des protéines	55
---	-----------

II.1 Structure primaire	55
II.2 Structure secondaire	55
II.2.1 Définition	55
II.2.2 Motifs présents dans les structures secondaires	55
II.2.2.1 L'hélice α	55

II.2.2.2 Feuillet β	56
II.2.2.3 Coudes et tours (turn)	56
II.2.2.4 Pelote statistique (random coil)	57
II.3 Structure tertiaire	57
II.4 Structure quaternaire	58
III Les nanotubes de carbones	59
III.1 Généralités	59
III.1.1 Définition	59
III.1.2 Historique	59
III.1.3 Structure	59
III.2 Propriétés	60
III.2.1 Les propriétés mécaniques	60
III.2.2 Les propriétés électriques	61
III.2.3 Les propriétés chimiques	61
III.3 Applications	61
III.3.1 Applications technologiques chimiques et physiques	61
III.3.2 Applications biologiques	62
III.4 Limites biologiques de l'utilisation des NTCs	63
III.4.1 Insolubilités des NTCs	63
III.4.2 Toxicité et biodistribution des NTCs	64
 IV Modèle d'étude	 67
IV.1 La chromatographie liquide haute performance-CHLP	67
IV.1.1 Principe de base	67
IV.1.2 La Biochromatographie	68
IV.2. Les grandeurs chromatographiques	69
IV.2.1 Equilibre chimique entre une macromolécule M et un ligand L	69
IV.2.2 Effet du pH sur l'interaction macromolécule M et ligand L	70
IV.2.3 Effet de la température sur l'interaction macromolécule M et le ligand L : courbes de Van't Hoff	71
IV.2.4 Compensation enthalpie-entropie (CEE)	72
IV.3. Les interactions mises en jeu dans les phénomènes d'interaction et de complexation	73
IV.3.1 Les interactions hydrophobes	73
IV.3.2 Les forces coulombiennes	74
IV.3.3 Les liaisons hydrogène	75
IV.3.4 Les forces de Van der Waals	75
IV.3.5 Répulsion stérique	77
 MATERIELS ET MODE OPERATOIRE	 79
I Extraction et caractérisation de la TTR sénile	81
I.1 Extraction des fibres amyloïdes	81
I.1.1 Détection des fibres amyloïdes	81
I.1.2 Extraction des fibres amyloïdes	81
I.2 Isolation de la protéine amyloïde	82
I.3 Caractérisation de la protéine amyloïde : identification de la protéine impliquée dans l'amylose	83
I.3.1 SDS-PAGE	83
I.3.2 Transfert sur membrane PVDF	84
I.3.3 Détermination de la séquence protéique	84
I.3.3.1 Préparation à la dégradation d'Edman	84
I.3.3.2 Dégradation d'Edman	84

1.3.4 Analyse directe de la séquence d'ADN.....	85
<u>II Fonctionnalisation de la transthyréine par les nanotubes de carbone</u>	87
<u>III Etude chromatographique</u>	89
III.1 Appareillage.....	89
III.2 Réactifs et protéines utilisées.....	89
III.3 Effet du pH sur les interactions TTR/HSPG et A β /HSPG.....	90
III.4 Effet de la TTR sur l'interaction A β /HSPG.....	90
<u>EXPERIMENTATION</u>	93
<u>I Comparaison entre deux formes de transthyréine (une sénile, une sauvage) sur la liaison à l'héparane sulfate protéoglycane</u>	95
I.1 Conditions opératoires.....	97
I.1.1 Fixation de l'HSPG sur la silice-NH ₂ par la méthode « in situ ».....	97
I.1.2 Stabilité de la colonne	98
I.2 Association de la TTR (wtTTR et sTTR) avec l'HSPG à pH=7.4	99
I.3 Effet du pH sur la fixation des 2 TTR sur l'HSPG.....	103
I.4 Conclusion.....	113
<u>II Effet de la transthyréine et du pH sur la liaison Aβ/HSPG</u>	115
II.1 Résultats.....	117
II.1.1 Effet du pH sur la liaison A β /HSPG	117
II.1.2 Etude des paramètres thermodynamiques de la liaison A β /HSPG	118
II.1.3 Conclusion et discussion.....	121
II.2 Effet de la TTR sur la liaison A β /HSPG	123
II.2.1 Effet du pH	123
II.2.2 Analyses des données thermodynamiques	124
II.2.3 Analyses des chromatogrammes et des données associées.....	128
II.3 Conclusion	131
<u>III Effet de la fonctionnalisation de la TTR par des nanotubes de carbone (NTCs) sur la liaison TTR/HSPG</u>	133
<u>DISCUSSION GENERALE</u>	139
<u>REFERENCES</u>	147
<u>ANNEXES</u>	165

INTRODUCTION GENERALE

La maladie amyloïde est une maladie rare (moins d'un cas sur 2000) et orpheline sur le plan thérapeutique. L'amylose ou amyloïdose, est un terme générique qui s'applique à de nombreuses protéines qui ont la capacité de former des dépôts protéiques extracellulaires insolubles avec en commun uniquement une biréfringence jaune-verte caractéristique en lumière polarisée après coloration par le rouge Congo et une ultrastructure fibrillaire avec une configuration bêta-plissée de la protéine en diffraction aux rayons X. A l'heure actuelle, vingt-sept protéines ont été recensées comme précurseurs des amyloses soient systémiques soient localisées. Les principaux organes concernés sont le rein, le cœur, le tube digestif, le foie, la peau, le nerf périphérique et l'œil. L'évolution est le plus souvent sévère, avec destruction des organes atteints. Les amyloses regroupent une large gamme de maladies comprenant des formes : primitives (les amyloses AL), secondaires (réactionnelles ou inflammatoires : les amyloses AA), et héréditaires (les amyloses à la transthyrétine sont les plus fréquentes). Outre ces formes systémiques, il existe des amyloses localisées, limitées à un seul organe (cœur, reins...) ou un seul type de tissus (muqueuses, ...), et des « maladies amyloïdes » spécifiques qui comprennent l'amylose associée à la fièvre familiale méditerranéenne, la maladie d'Alzheimer, les maladies dues au prion (et notamment l'encéphalopathie spongiforme bovine = maladie de la vache folle). Ces maladies amyloïdes sont beaucoup plus répandues que les autres types d'amylose. Bien que les amyloses soient des maladies rares, la recherche sur ces pathologies a été très importante et a également conduit à une meilleure compréhension de nombreuses autres maladies. Cependant il n'existe à présent aucun traitement spécifique pour traiter les amyloses. Le mécanisme de la fibrillogénèse présente encore des zones d'ombres, cependant *in vitro* il est possible de reproduire la fibrillogénèse en modulant le pH (Lashuel *et al.*, 1998)¹ ; donc le pH jouerait un rôle prépondérant dans ce mécanisme. La composition des dépôts amyloïdes est en grande partie connue, *in vivo*, ces dépôts sont composés de nombreuses autres substances qui sont liés à la protéine amyloïde.

Un des ligands moléculaires ubiquitaires est l'héparane sulfate protéoglycane (HSPG). *In vitro*, il a été démontré qu'il interagissait avec de nombreuses protéines amyloïdes promouvant leur fibrillation et leur cytotoxicité. Cependant, nous disposons que de peu d'informations sur les mécanismes *in vivo* médiant la codéposition de l'HSPG avec les protéines amyloïdes et les protéines associées aux dépôts amyloïdes. Les expériences menées sur des modèles animaux (Elimova *et al.*, 2004 ; Vilasi *et al.*, 2011)^{2,3}, en particulier les modèles de souris transgéniques (Zcharia *et al.*, 2004)⁴ où la structure de l'HSPG est modifiée, supportent un rôle actif et principal de l'HSPG dans l'amyloïdogénèse. La liaison

des protéines amyloïdes à l'HSPG serait responsable de l'insensibilité à la protéolyse des dépôts amyloïdes (Bruinsma *et al.*, 2010)⁵. Ainsi, des recherches ont été menées afin de trouver des inhibiteurs de la liaison ou des molécules pouvant se lier aux protéines amyloïdes et empêcher leurs dépôts (séquestrer). Une des molécules trouvées pouvant séquestrer une protéine amyloïde est la transthyrétine dans la maladie d'Alzheimer. En effet, il a été démontré que cette protéine se liait à la fois au précurseur de la protéine β -amyloïde et à la protéine β -amyloïde elle-même (Schwarzman *et al.*, 1994)⁶. Par ailleurs, la transthyrétine est également la protéine amyloïde dans les amyloses à la transthyrétine. Ainsi, cette protéine que l'on retrouve à la fois dans le plasma ainsi que dans le liquide céphalo-rachidien aurait un double rôle dans les amyloses : dans le sang, elle est responsable des amyloses à la transthyrétine; dans le cerveau, les études *in vitro* supposent un rôle dans la maladie d'Alzheimer notamment un rôle de biomarqueur (Han *et al.*, 2011 ; Velayudhan *et al.*, 2012)^{7,8} mais également un effet protecteur sur la fibrillation de protéine β -amyloïde qui reste encore à élucider.

Malgré le nombre important d'études sur ce sujet, les mécanismes moléculaires conduisant aux interactions entre les protéines amyloïdes qui adoptent une structure en feuillet β caractéristique avec leur ligand moléculaire et cellulaire ne sont pas encore connus. Une connaissance de ces mécanismes permettrait à terme de proposer un traitement spécifique de cette pathologie.

Un des moyens d'étude de ces interactions est la biochromatographie. En effet, cette technique de biorecognition moléculaire permet de déterminer les interactions mises en jeu entre deux espèces avec des conditions opératoires qui peuvent être très facilement modulables permettant d'étudier les effets de différents paramètres sur cette liaison.

Comme il n'existe pas de phase stationnaire greffée avec de l'HSPG, l'objectif principal de notre travail de recherche est la mise au point de colonnes chromatographiques en immobilisant l'HSPG sur de supports chromatographiques de type silice-NH₂ par liaison covalente. Ces colonnes sont utilisées pour étudier :

- dans un premier temps, l'effet du pH sur la liaison transthyrétine/HSPG et effectuer une comparaison entre une transthyrétine de forme sauvage et une transthyrétine extraite d'un patient atteint d'amylose sénile à la transthyrétine. L'effet du pH permet de donner des informations sur le type de liaisons impliquées dans les interactions.
- dans un deuxième temps, l'effet de la transthyrétine et du pH sur la liaison β -amyloïde/HSPG.

Dans un troisième temps, l'effet de nanotubes de carbone greffés avec de la transthyréline sur la liaison transthyréline/HSPG.

Notre travail de recherche est subdivisé en trois grandes parties :

- La première partie de ce travail est consacrée à une synthèse de la littérature
- La deuxième partie présente les méthodes d'extraction et d'analyse des protéines, les méthodes d'immobilisation d'enzymes notamment l'immobilisation covalente, et la fonctionnalisation de la transthyréline par les nanotubes de carbone.
- La troisième partie présente les travaux personnels effectués durant cette thèse.

BIBLIOGRAPHIE

I LES AMYLOSES

I.1 Généralités

I.1.1 Introduction

L'histoire des amyloses remonte à l'antiquité, mais les premiers cas réellement décrits à proprement parlé datent du XVII^{ème} siècle où les pathologistes parlaient de foies lardacés ou gras et de rates « blanches comme pierre ». Les amyloses n'étaient alors ni définies ni décrites avec précision. Rudolf Virchow en 1854 (Rokitansky, 1842 ; Virchow, 1854)^{9,10} fut le premier à créer le terme d'amylose pour définir ces maladies du latin : *amylum* ou en grec : *amylon* pour amidon car il pensait que les dépôts étaient constitués de cellulose due à une coloration violette par l'acide iodo-sulfurique (Virchow, 1854)¹⁰.

En 1859, Friedrich et Kekule (Friedrich & Kekule, 1859)¹¹ ont démontré l'absence de composant glucidique et désormais l'amylose fut considérée comme une substance protéique. Cependant, même si les protéines amyloïdes ne sont pas glycosylées, les dépôts amyloïdes sont largement constitués de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes qui ont un rôle prépondérant *in situ* dans la formation des dépôts et dans la transformation des protéines en structure β -plissée.

I.1.2 La substance amyloïde

I.1.2.1 Diagnostic de l'amylose

La coloration à l'acide iodo-sulfurique resta pendant très longtemps la technique de diagnostic la plus employée (Cornil, 1875 ; Heschl, 1875)^{12,13}

En 1922, Bennhold (Bennhold, 1922)¹⁴ utilisa le rouge Congo comme marqueur histologique. La microscopie à lumière polarisée a permis aussi sa détection avec une biréfringence caractérisée par une couleur apparaissant vert pomme en 1927 par Divry (Divry & Florkin, 1927)¹⁵. La coloration au rouge Congo combinée à la microscopie à lumière polarisée

constitue la technique la plus simple, la plus rapide et la plus utilisée encore de nos jours pour le diagnostic de confirmation de la nature amyloïde des dépôts observés en coloration standard Hémalun-Erythrosine-Safran ou HES.

I.1.2.2 Les protéines amyloïdes

Les différentes amyloses sont caractérisées par la protéine précurseur. Il existe une vingtaine de protéines amyloïdes. Ces protéines sont généralement constituées d'un fragment d'un précurseur protéique plus grand et rarement, la protéine correspond au précurseur entier. Le nom du précurseur donne le nom de la maladie (Cf Tableau.1).

Tableau 1 : Les protéines amyloïdes et leurs précurseurs chez l'homme. (D'après Westermark P, Araki S, Benson MD et al. Nomenclature of amyloid fibril proteins – Report of the meeting of the International nomenclature committee on amyloidosis, August 8-9, 1998. Amyloid, 1999, 6: 63-67.) G: amylose généralisée; L: amylose localisée (Westermark et al., 1999)¹⁶.

Protéine amyloïde	Précurseur	Diffusion	Syndromes ou tissus atteints
AL	Chaîne légère d'Ig (κ, λ)	G, L	(primitive) isolée ou associée au myélome
AH	Chaîne lourde d'IgG	G, L	Isolée
AA	(Apo)SAA	G, L	(secondaire) infection, inflammation chronique, tumeur, FMF, syndrome de Muckle et Wells
ATTR	Transthyrétine mutée	G	Héréditaire
	Transthyrétine normale	G	Sénile
A β 2M	B2-microglobuline	G	Associée à l'insuffisance rénale chronique terminale
AApoAI	Apolipoprotéine AI	G	Héréditaire
		L	Aortique
AGel	Gelsoline	G	Héréditaire
ALys	Lysozyme	G	Héréditaire
AFib	Fibrinogène	G	Héréditaire
ACys	Cystatine C	L	Hémorragie cérébrale héréditaire de type islandais
A β	Précurseur de la protéine A β : (A β PP)	L	Maladie d'Alzheimer, trisomie 21, angiopathie amyloïde cérébrale ; héréditaire ou sporadique
APrP ^{sc}	Protéine prion	L	Encéphalopathies spongiiformes
ACal	(Pro) calcitonine	L	Cancer médullaire de la thyroïde
AANF	Facteur atrial natriurétique	L	Amylose auriculaire isolée
AIAPP	Amyline	L	Ilots de Langerhans du diabète de type 2, insulinome
AIns	Insuline	L	Iatrogénique
APro	Prolactine	L	Prolactinome, hypophyse sénile
ALact	Lactoferrine	L	Dystrophie cornéenne sous-épithéliale

I.1.2.3 Les autres composants de l'amylose

Ces composés sont identifiés de manière ubiquitaire dans n'importe quel type d'amylose.

a) Les composants de la matrice extracellulaire

- Le composant P (également appelé en anglais SAP : serum albumin P protein):

Cette glycoprotéine a été identifiée pour la première fois en 1966 par Bladen (Bladen *et al*, 1966)¹⁷. C'est une protéine de forme pentagonale fortement associée à la substance amyloïde qui représente environ 20% d'une préparation de fibrille purifiée. Le rôle de ce composant P reste toujours indéterminé. Il interagit fortement avec l'héparane sulfate et le dermatane sulfate en présence de calcium, ce qui suggère que les glycosaminoglycanes pourraient être un médiateur de la fixation du composé P aux fibrilles *in vivo*. Cependant un chélateur doux du calcium est capable de le dissocier des fibres (Skinner *et al*, 1983)¹⁸. Le composant P interagirait avec les fibrilles amyloïdes insolubles composées des chaînes polyanioniques sulfatées de l'HSPG via des interactions électrostatiques avec le calcium. Le composant P est retrouvé dans tous les dépôts amyloïdes et constitue ainsi un marqueur de l'amylose (Pepys *et al*, 1997)¹⁹.

- Glycosaminoglycanes (GAG)/ Protéoglycanes (PG):

Dans les amyloses, des GAG (dermatane sulfate) (Hamazaki, 1987; McLaughlin *et al*, 2006)^{20,21} sont retrouvés dans les dépôts amyloïdes mais aussi des PG tels que l'héparane sulfate (HS) (Ancsin, 2007 ; Lindahl & Li, 2009 ; Kisilevsky *et al*, 2007)²²⁻²⁴. Les variations de la distribution des GAG en fonction de l'âge et du tissu pourraient influencer le type biochimique et le site anatomique des dépôts (Athanasou *et al*, 1995 ; Magnus *et al*, 1989)^{25,26} mais les données sont encore bien limitées. Il a été démontré que ces molécules accélèrent la formation des fibres *in vitro* (Martin & Ramirez-Alvaro, 2011)²⁷. Cependant leur rôle précis n'a toujours pas été résolu. Il semblerait que les GAG et les PG pourraient servir de matrice à laquelle se fixeraient les précurseurs de la fibrille et le composant P recrutés à partir de la circulation ; cette matrice servirait de nid la formation et la croissance des fibrilles du dépôt amyloïde (Kisilevsky *et al*, 2007)²⁴. L'héparane sulfate protéoglycane (HSPG) est le PG le plus fréquemment retrouvé.

b) Les autres composants

- Le facteur de renforcement de l'amylose (AEF) :

L'AEF a été découvert par Teilum en 1964 (Teilum, 1964)²⁸. Il permet de raccourcir la phase pré-amyloïde de plusieurs semaines à moins de 18 heures après addition d'un stimulus amyloïde (principalement le nitrate d'argent) (Kisilevsky *et al*, 1995)²⁹. Il possède également une activité sérine protéasique (Abankwa & Ali-Khan, 1988)³⁰. Cette substance serait un composant universel des dépôts et il n'est pas certain qu'il corresponde à une seule entité moléculaire.

- L'Apolipoprotéine E (ApoE) :

C'est une protéine polymorphe (3 allèles) qui est dans les dépôts amyloïdes de la maladie d'Alzheimer (MA) (Saunders *et al*, 1993)³¹ les amyloses de type AA et les amyloses à la TTR (Gallo *et al*, 1994)³². Elle pourrait interagir avec d'autres lipoprotéines (apoSAA, apoAI, apoAII) amyloïdes (Sipe, 1992)³³. L'interaction de l'ApoE avec Aβ est reconnue comme représentant un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer en termes d'incidence et d'âge au début de la maladie. Ainsi, l'ApoE est le facteur de risque le plus important vis-à-vis de la MA à début tardif (Kim *et al*, 2009)³⁴.

- Autres composants :

D'autres composants peuvent être identifiés tels que : le calcium, les sulfates, les phosphates, la fibronectine, le collagène de type IV, la laminine, l'entactine, des fragments d'histones, des acides nucléiques, l'ubiquitine et des protéines basiques de la myéline (Husby *et al*, 1994)³⁵.

1.1.3 Fibrillogenèse

La caractéristique principale des amyloses est la nature fibrillaire et insoluble des dépôts amyloïdes extracellulaires (Rambaran & Serpell, 2008)³⁶. Quelques données structurales (Murakami, 2009; Adamcik & Mezzenga, 2012)^{37,38} nous permettent de comprendre plus ou moins la nature des fibrilles amyloïdes, cependant à l'heure actuelle, beaucoup de zones d'ombre subsistent sur le mécanisme conduisant une protéine de l'état soluble à un état insoluble. Bien que le type d'amylose soit défini par la protéine soluble précurseur des fibrilles, de nombreuses autres substances sont impliquées dans la formation des dépôts amyloïdes (SAP, ApoE, HSPG...), et leur participation dans la constitution et la formation des fibrilles n'est dans la plupart des cas pas encore connue.

I.1.3.1 Les fibrilles amyloïdes

a) Méthodes d'étude

La microscopie optique et électronique ont été les méthodes les plus utilisées pour la détection et la caractérisation morphologique des fibrilles amyloïdes. Cependant la plupart des informations détaillées sur la structure provient de la cristallographie aux rayons X (Makin & Serpell, 2005; Briki et al, 2011)^{39,40}. En plus de ces méthodes, les techniques de microscopie à force atomique (Adamcik & Mezzenga, 2012)³⁸ et de résonance magnétique nucléaire (Tycko, 2011)⁴¹ s'ajoutent et permettent une identification et donnent de informations encore plus détaillées.

b) Morphologie des fibrilles amyloïdes

La caractéristique principale des amyloses est la structure fibrillaire. L'affinité des fibrilles au rouge Congo et la biréfringence vert-pomme en lumière polarisée sont dues à la structure originale et ordonnée des fibrilles amyloïdes. En effet le rouge Congo se lie aux feuillets β -plissés ce qui entraîne ainsi une déflexion de la lumière polarisée avec une extinction simultanée de la composante rouge du spectre lumineux qui conduit à la biréfringence caractéristique.

En microscopie électronique, les fibrilles amyloïdes sont formées de deux ou plusieurs sous-unités filamenteuses parallèles, normalement arrangées sous forme d'hélice α dont l'axe est parallèle à la fibrille qui a un diamètre de 75 à 100 Å et une longueur indéfinie (Cohen & Calkins, 1959)⁴².

c) Modèle β -plissé antiparallèle de la fibrille amyloïde

Les études notamment menées par Glenner (Glenner, 1980)⁴³ ont montré un profil de diffraction aux rayons X caractéristique d'une structure β -plissée antiparallèle dans laquelle les chaînes polypeptidiques ont une conformation β -plissée perpendiculaire à l'axe de la fibrille et forment des feuillets β stabilisés par des liaisons hydrogènes parallèles à l'axe de la fibrille (fig.1).

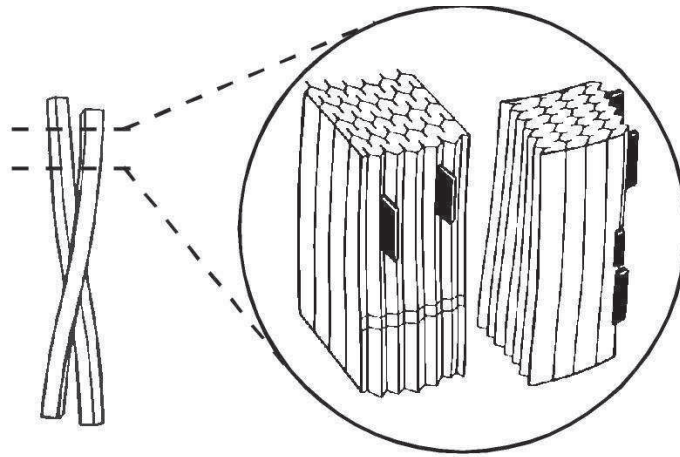


Fig.1. Modèle de la fibrille amyloïde β -plissée et antiparallèle décrite par Glenner (Glenner, 1980)⁴³. En noir la fixation des molécules de Rouge Congo à la fibrille.

L'analyse par diffraction aux rayons X avec le synchrotron montre des directions multiples méridionales et équatoriales. Un nouveau modèle cohérent correspondant à ces observations est celui d'une hélice β -plissée dans laquelle les feuillets β forment une hélice α (Blake & Serpell, 1996)⁴⁴ (fig.2). L'axe d'une telle hélice est parallèle à l'axe du protofilament et les feuillets β sont orientés perpendiculairement en accord avec l'aspect β -plissé antiparallèle. Cet arrangement en feuillets β plissés antiparallèles se retrouve dans la transthyrétine native.

Cependant bien que le modèle β -plissé antiparallèle soit couramment admis avec de forts arguments en faveur de ce modèle, des différences dans le nombre, dans l'arrangement et dans la dimension des protofilaments fibrillaires subsistent. Des fragments en hélice α ou sans structure bien définie doivent exister au sein de la formation des fibrilles amyloïdes.

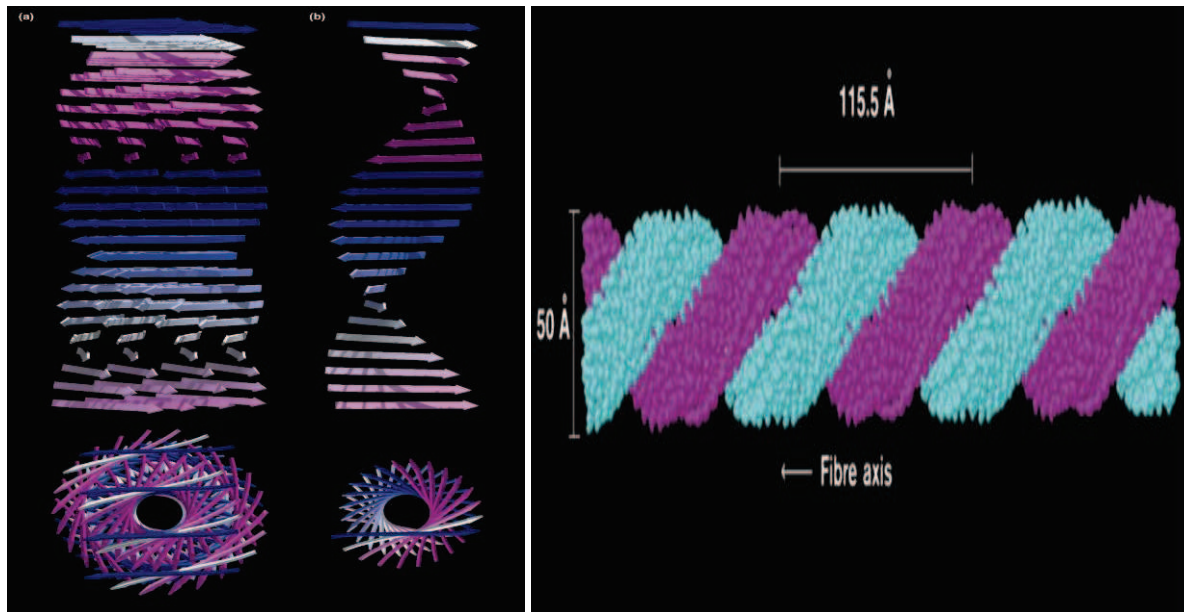


Fig.2. Modèle établi par Blake et al., (Blake et Serpell, 1996⁴⁴) de l'hélice β -plissée.

d) Structure non β -plissée de la fibrille amyloïde

Des études en spectroscopie à infrarouges ont montré qu'il existait dans certains cas une participation importante des domaines coils et coudes et aussi la formation d'hélice α au cours de la fibrillogenèse (Wille *et al.*, 1996)⁴⁵. Ces données suggèrent que même si la structure β -plissée est nécessaire à l'assemblage des fibrilles, des fragments non β -plissés peuvent influencer de façon significative les propriétés des fibrilles.

I.1.3.2 Les protéines précurseurs des fibrilles amyloïdes

Quelles que soient l'origine, la structure et la solubilité des précurseurs protéiques, ils doivent avoir en commun leur propension à former des feuillets β -plissés. Le tableau regroupe les protéines précurseurs en fonction de leur contenu en feuillets β (Tableau.2) (Kelly, 1998)⁴⁶.

Tableau.2. Configuration des précurseurs des protéines amyloïdes

Protéine avec un fort contingent de structures β -plissées	Transthyréline Chaînes légères d'immunoglobuline B2-microglobuline
Protéines contenant des hélices α et des feuillets β	Gelsoline lysozyme
Protéines essentiellement formées d'hélice α	Apolipoprotéine AI
Protéines dont la structure cristallographique est inconnue	Précurseur de la protéine amyloïde β Protéines prion Protéine SAA Cystatine C

I.2 Les amyloses à la transthyréline

I.2.1 La transthyréline

I.2.1.1 Généralités

La protéine d'intérêt dans les amyloses à la transthyréline (ATTR) est la transthyréline.

La transthyréline (TTR), également appelée préalbumine du fait de sa migration électrophorétique plus rapide que l'albumine (Blake *et al*, 1971)⁴⁷ (poids moléculaire TTR = 56 kDa, poids moléculaire albumine = 65 kDa), est une protéine localisée soit dans le plasma soit dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Sa concentration plasmatique est d'environ 21 à 31 mg/dL soit environ 3-7 μ M et cérébrale de 0,3 μ M (Schwarzman *et al*, 1994)⁶. Le gène codant sa synthèse est situé sur le chromosome 18. Sa synthèse est assurée par le foie principalement et au niveau cérébral par les cellules épithéliales des plexus choroïdes. Le nom transthyréline dérive des deux principales fonctions de la protéine: **trans**porteur de la **thy**roxine (T4) (mais aussi de la triiodothyronine =T3) et transporteur du **retinol** binding protein (RBP) (fig.3). Ainsi, au niveau clinique, la préalbumine est utilisée comme un marqueur de la malnutrition mais aussi de l'inflammation car son taux sérique chute lors de ces deux pathologies (Magy-Bertrand, 2007)⁴⁸.

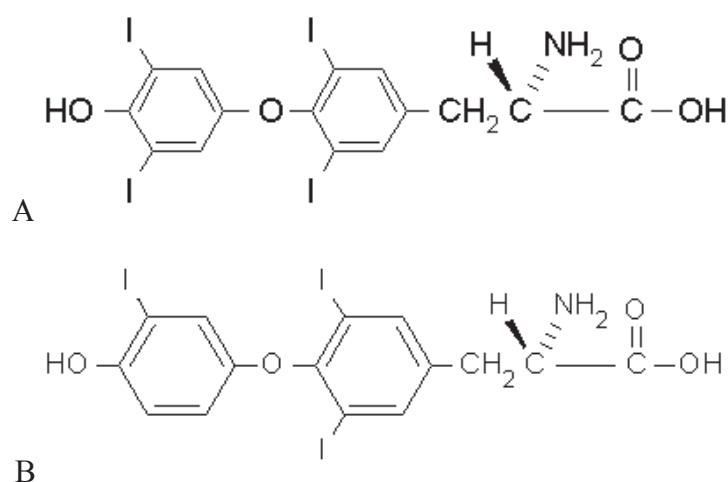


Figure.3. Structures de A) 3,5,3',5'-tétraiodothyronine (thyroxine, T4) et B) 3,5,3'-triiodothyronine (T3).

I.2.1.2 Structure

La TTR possède une structure quaternaire tétramérique (fig.4) (Blake *et al.*, 1971)⁴⁷, avec quatre monomères identiques de 14 kDa chacun arrangés en dimères. Ces monomères sont composés de 127 acides aminés (AA) (fig.5) (Kanda *et al.*, 1974)⁴⁹, et la conformation spatiale décrite par diffraction cristallographique induite aux rayons X à 1,8 Å publiée par Blake *et al* (Blake *et al.*, 1978)⁵⁰ fait apparaître une organisation principale sous forme de feuillets β (fig.6). Le tétramère définit un canal central doté de deux sites potentiels de fixation pour T4 et pour T3 (fig.4). Les ligands de la TTR permettent de stabiliser la TTR sous forme tétramérique.

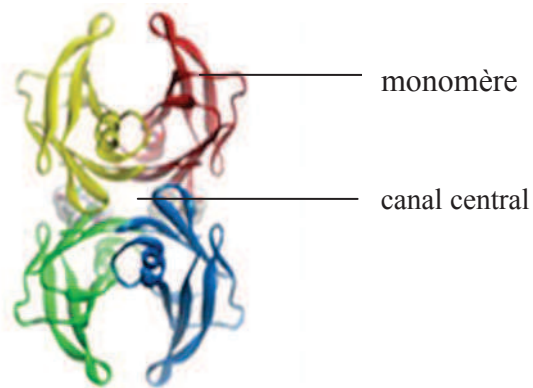


Fig.4. Structure quaternaire de la transthyréine (Blake *et al* et Kanda *et al*)⁴⁹⁵⁰

```

GPTGTGESKCP LMKVLD A V R G S P A I N V A V H V F R K A A D D T W E P F A
 1          10          20          30          40

S G K T S E S G E L H G L T T E E E F V E G I Y K V E I D T K S Y W K A L G I S P F H E H A E
 50          60          70          80          90

W V F T A N D S G P R R Y T I A A L L S P Y S Y S T T A V V T N P K E
100         110         120         127

```

Fig.5. Séquence primaire d'un monomère de la transthyréine

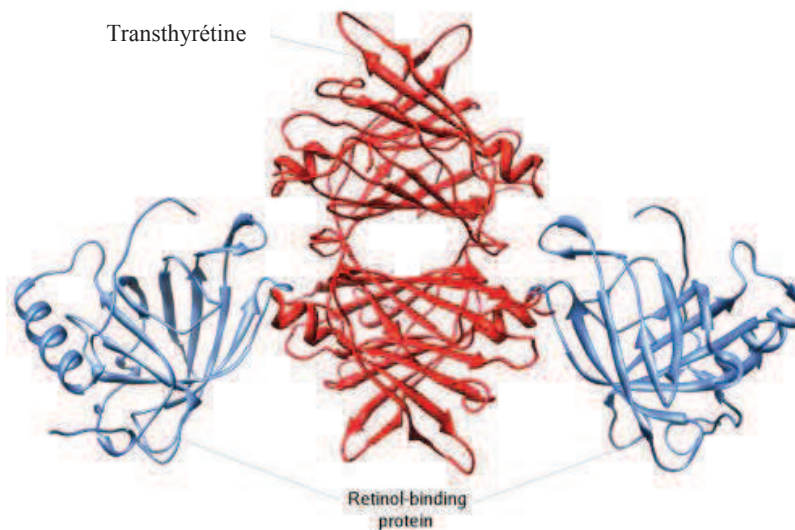


Fig. 6. Structure de la TTR en feuillets β plissés avec le RBP qui stabilise la structure de la TTR (PDB ID: 1rlb, H.L. Monaco et al.1995)⁵¹.

I.2.1.3 La transthyréline dans les amyloses: formation des fibres amyloïdes

- **Mécanismes pathologiques probables de formations des fibrilles amyloïdes**

Le mécanisme de formation des fibrilles de TTR amyloïdes n'a pas encore été tout à fait résolu. Le mauvais repliement de la transthyréline avec perte de sa structure quaternaire originelle est le facteur conduisant aux ATTR. La TTR est alors partiellement dénaturée. Il a été démontré que cette dénaturation était pH dépendante. En effet, Lai *et al* et Shinohara *et al* (Lai *et al.*, 1996 ; Shinohara *et al.*, 2003)^{52,53} ont montré que la dénaturation de TTR sauvage avait lieu à pH inférieur à 5 alors que dans les FAP, la TTR se dissocie et se dénature à pH $\pm 5,5-6$. Une des hypothèses les plus répandues, la plus acceptée, est la théorie endosome/lysosome. En effet, en conditions physiologiques, la TTR passe dans le système endosome/lysosome où des enzymes dégradent la protéine à pH acide (pH=6,5 pour les endosomes et $3,5 < \text{pH} < 5$ pour les lysosomes). Dans les ATTR, la TTR ne se trouve pas dans la bonne conformation (mutation dans les FAP et mauvaise structure probable dans la SSA). La protéine ne pouvant donc pas être dégradée totalement est alors relâchée dans le compartiment extracellulaire, sous forme d'agrégats, partiellement dénaturée qui va alors pouvoir se fixer sur l'HSPG et former les fibrilles amyloïdes avec les autres protéines associées.

- **Modèles proposés de la formation des fibrilles amyloïdes**

De nombreux modèles pour la formation de fibrilles amyloïdes de TTR existent, et le plus largement accepté est celui où le tétramère de TTR se dissocie en monomères (Kelly, 1998; Lai *et al.*, 1996; McCutchen *et al.*, 1993; Nettleton *et al.*, 1998; Quintas *et al.*, 2001)^{46,52,54,55,56}. Il est suggéré qu'en conditions dénaturantes, et plus lentement en conditions physiologiques, la TTR peut se dissocier en monomères qui sont alors amyloïdogènes et se déplient avec une perte significative de la structure secondaire permettant le début du processus amyloïde (fig.7). Il existe aussi d'autres modèles dans lesquels le tétramère ne se dissocie pas en monomères mais en dimères (Serag *et al.*, 2003; Olofsson *et al.*, 2004)^{57,58} ou bien que la TTR reste sous forme tétramérique (Eneqvist *et al.*, 2000; Ferrão-Gonzales *et al.*, 2000)^{59,60}.

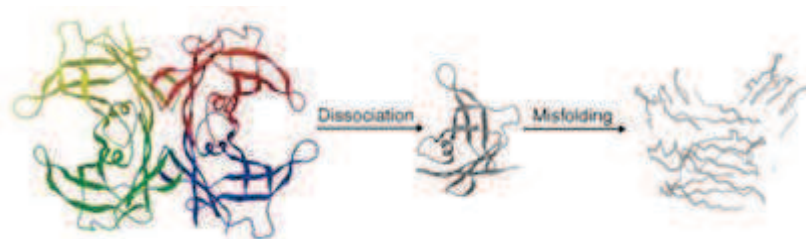


Fig.7. Mécanisme de dissociation de la transthyréline établi par Foss *et al.*⁶¹.

- **La stabilisation du tétramère inhibe la formation des fibres amyloïdes**

Quelle que soit la forme de la TTR (monomère, dimère ou tétramère) impliquée dans la formation des fibrilles amyloïdes, il existe clairement une connexion entre la stabilisation du tétramère et l'inhibition de l'amyloïdogénèse (Klabunde *et al.*, 2000; Hammarström *et al.*, 2002)^{62,63}. Ainsi la stabilisation du tétramère conduirait à une protéine moins prompte à s'agréger en fibrilles (Hammarström *et al.*, 2002)⁶³.

Les études *in vitro* ont démontré qu'une dissociation ainsi qu'une dénaturation partielle de la protéine avaient lieu à pH très acide (pH < 5). En effet, les méthodes les plus couramment utilisées pour mesurer la stabilité de la TTR est la dénaturation de la protéine par augmentation de la concentration en urée ou par diminution du pH (4-5, 5). L'évaluation de la dénaturation est généralement réalisée par méthodes spectroscopiques ou par électrophorèse sur gel de sodium dodécylsulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE). Les courbes de dénaturation obtenues coïncident quasiment parfaitement avec les fractions monomères/dimères (Hammarström *et al.*, 2002)⁶³. La transition tétramère peut donc être

étudiée comme fonction du pH et mesurée par SDS-PAGE (McCutchen *et al.*, 1993; McCutchen *et al.*, 1995)^{54,64}. La diminution du pH est également utilisée pour étudier la formation amyloïde (Lai *et al.*, 1996)⁵². La valeur du pH pour la formation des fibrilles est similaire à celle pour la transition tétramère/monomère (McCutchen *et al.*, 1993; McCutchen *et al.*, 1995)^{54,64}. Généralement, les mutants amyloïdogéniques s'agrègent à pH plus élevé (proche du pH physiologique) et se dénaturent à concentration plus basse d'urée que les précurseurs non mutés de la TTR (Lai *et al.*, 1996; Hammarström *et al.*, 2003)^{52,65}.

1.2.2 Les différents types d'amylose à la transthyrétine

Deux types d'amylose à la TTR existent : une forme rare, familiale, le précurseur en est la transthyrétine mutée, elle est classiquement dénommée l'amylose à transthyrétine (ATTR), et une forme plus commune où le précurseur est la transthyrétine non-mutée, il s'agit de l'amylose sénile (Magy-Bertrand, 2007)⁴⁸.

1.2.2.1 Les ATTR

Les ATTR sont des maladies systémiques. Plus de quatre-vingt mutations du gène de la TTR sont responsables de la maladie (Magy-Bertrand, 2007)⁴⁸. Selon la mutation du gène TTR, les organes principalement touchés sont :

- Le système nerveux périphérique dont le dysfonctionnement est responsable des troubles sensitifs, moteurs et végétatifs
- le cœur dont le tissu de commande du rythme cardiaque peut être altéré ou dont le muscle peut s'épaissir. Selon les mutations, l'atteinte cardiaque peut être au premier plan.

Plus rarement, il s'agit :

- de l'œil avec une baisse de la vue
- du rein avec apparition progressive d'une insuffisance rénale aboutissant exceptionnellement à une dialyse ou exceptionnellement les méninges avec céphalée et confusion.

Mais les deux atteintes les plus courantes sont les atteintes cardiaques et neurologiques.

- L'atteinte cardiaque : la cardiomyopathie amyloïde familiale (CAF) :

La cardiomyopathie amyloïde familiale liée à la TTR est une amylose systémique héréditaire liée à la TTR avec des manifestations cardiaques prépondérantes, dues à des infiltrations myocardiques d'une protéine transthyréline mutée. Les principales mutations conduisant à une CAF sont Thr60Ala et Val122Ile (Rapezzi *et al.*, 2010)⁶⁶. La prévalence n'est pas connue. A l'âge adulte, les patients présentent, généralement vers 30 ans, une cardiomyopathie restrictive (avec divers degrés d'insuffisance cardiaque chronique et de possibles brady/tachyarrythmies).

- L'atteinte neurologique : la neuropathie amyloïde familiale (FAP) :

La FAP a été décrite en premier par Andrade en 1952 (Andrade, 1952)⁶⁷ au Portugal. Elle est retrouvée ubiquitairement dans le monde entier et on distingue 3 foyers principaux: Portugal, Japon et nord de la Suède. C'est une maladie à transmission autosomique dominante et actuellement plus de 73 mutations sont recensées (Connors *et al.*, 2000)⁶⁸. La mutation la plus répandue est la mutation V30M. Les manifestations révélatrices sont très variées et agressives au niveau clinique. Elles traduisent des dérèglements du système nerveux périphérique: sensitifs, moteurs et végétatifs. En l'absence de traitement, la maladie évolue inexorablement vers l'aggravation des déficits sensitifs et moteurs et des troubles végétatifs, la mort survient en une dizaine d'années.

I.2.2.2 L'amylose à la transthyréline sénile (SSA)

La TTR est le principal composant des SSA (autrefois appelées amyloses séniles cardiaques. Cornwell III *et al.* (Cornwell III *et al.*, 1988)⁶⁹ ont démontré que dans la SSA, le précurseur protéique est la forme non mutée de la transthyréline. C'est une des amyloses les plus fréquentes qui affecte ~25 % de la population de plus de 80 ans (Pomerance, 1966; Cornwell III *et al.*, 1983)^{70,69}. Les fibres amyloïdes sont systématiquement localisées dans plusieurs organes, mais sont principalement concentrées dans le cœur (Pitkänen *et al.*, 1984)⁷¹. Normalement les dépôts sont bénins, cependant certaines personnes (principalement les hommes) sont affectées avec des dépôts très abondants dans le cœur conduisant à une insuffisance cardiaque (Pomerance, 1966)⁷⁰. Le diagnostic est difficile et peut se confondre avec une cardiomyopathie AL cardiaque.

I.2.3 Traitement actuel des amyloses à la transthyrétine

A l'heure actuelle, il n'existe pas de véritable traitement spécifique pour ces maladies. De nombreuses approches sont proposées:

I.2.3.1 La greffe de foie (transplantation hépatique)

La greffe de foie a été proposée à partir de 1990 pour traiter la FAP dans le but de supprimer la principale source de production de protéine TTR anormale alors que le foie fonctionne par ailleurs parfaitement bien (Stangou & Hawkins, 2004)⁷².

Il a démontré son efficacité à stopper l'évolution de la maladie dans la très grande majorité. Les résultats sont meilleurs chez les patients avec la mutation V30M de la TTR et les sujets jeunes.

Cependant, la greffe est une intervention lourde qui nécessite d'être réalisée dans un centre expert (équipe de chirurgiens, d'anesthésistes et d'hépatologues) ayant une importante expérience de la greffe de foie et en particulier chez des patients atteints de FAP. De plus, lors de la CAF, une transplantation cardiaque est souvent nécessaire car la forme non mutée de la TTR prend la place de la forme mutée dans le cœur et entraîne la progression de la cardiomyopathie amyloïde.

I.2.3.2 Les molécules synthétiques

Afin de trouver un traitement, de nombreux groupes de recherche essaient de développer des inhibiteurs de la formation amyloïde.

Depuis peu, de nouveaux traitements médicamenteux sont maintenant accessibles ou sont en cours de développement.

Trois types de molécules sont actuellement utilisés :

- Les molécules stabilisant la structure quaternaire de la TTR:

La dissociation du tétramère est l'étape limitante de l'amyloïdogenèse. Le principe de ces molécules est de limiter la formation des dépôts amyloïdes en augmentant la stabilité du tétramère de la transthyrétine.

➤ Le Vyndaqel®

Le Vyndaqel® également appelé Tafamidis méglumine (Fx1006A) (fig.8) est une molécule développée par l'équipe de Kelly au Scripps (San Diégo) (Bulawa *et al*, 2012 ; Johnson *et al*, 2012)⁷³⁷⁴ a obtenu l'autorisation de mise sur le marché auprès de l'agence européenne du médicament en novembre 2011 pour le traitement des FAP. Il est destiné aux patients autonomes à la marche avec une neuropathie amyloïde documentée. Il est actuellement le seul médicament approuvé pour traiter les FAP.

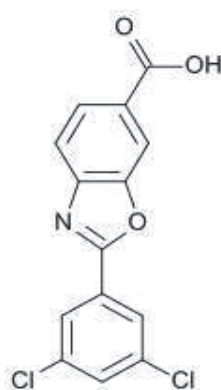


Fig.8. Structure du Vindaquel®

➤ Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS):

Ces AINS se fixent à un ou deux sites sur la T4 avec la TTR et préviennent ainsi les amyloses à la TTR sans les effets secondaires hormonaux de T4. Ils augmentent la barrière cinétique associée à la dissociation du tétramère par une liaison à la fois à la TTR et à son produit l'hormone T4 ce qui renforce la stabilisation du complexe et ainsi de la forme tétramérique. On retrouve comme composés l'acide flufénamique, le diclofénac, le flurbiprofène et le diflunisal qui est le plus connu (fig.9) (Adamski-Werner *et al.*, 2004 ; Kingsbury *et al.*, 2008)⁷⁵⁷⁶

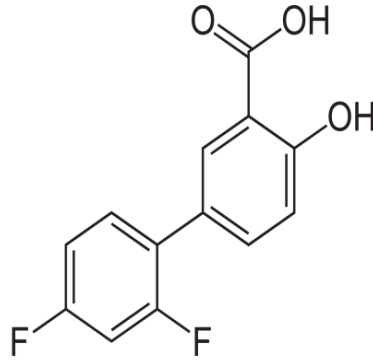


Fig.9. Structure du diflunisal

- Les molécules mimant la structure de l'héparane sulfate HS :

➤ Le Tramiprozate (AlzhemedTM)

Il est surtout utilisé dans la maladie d'Alzheimer (MA) et son action est d'interférer avec les actions de la protéine β -amyloïde ($A\beta$) en amont de la cascade amyloïdogénique (fig.10). Il se lie préférentiellement à la forme soluble de $A\beta$ et la maintient sous forme de pelote statistique/hélice- α ce qui permet de ne pas former de fibrilles amyloïdes et donc d'inhiber la formation des plaques amyloïdes (Gandhi *et al*, 2010)⁷⁷.

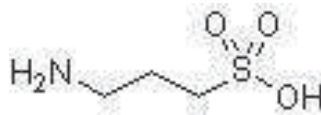


Fig.10. Le Tramiprosate ou acide 3-amino-1-propanesulfonique (ou homotaurine ou NC-531)

➤ L'Eprodinate

Il a été développé par Kisilevsky *et al* (Kisilevsky *et al.*, 1995)⁷⁸ et est surtout utilisé dans l'amylose AA (fig.11).

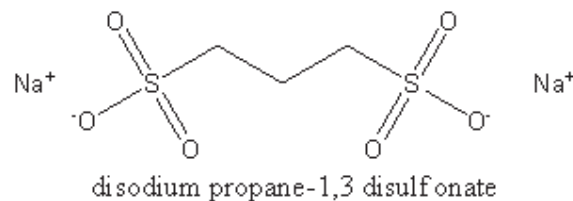


Fig.11. Structure de l'Eprodinate®

- La suppression de la SAP

Une autre approche développée par Pepys *et al* consiste en la suppression de SAP de la circulation sanguine (Pepys *et al.*, 2002)⁷⁹ (fig.12). Les molécules utilisées sont des composés palindromiques basés sur l'acide aminé proline qui lient deux pentamères se SAP donnant un décamère qui est rapidement éliminé par le foie. Comme la SAP est présent dans tous les dépôts amyloïdes, cette approche thérapeutique pourrait être utilisée pour toutes les amyloses. Ce composé est en essais cliniques.

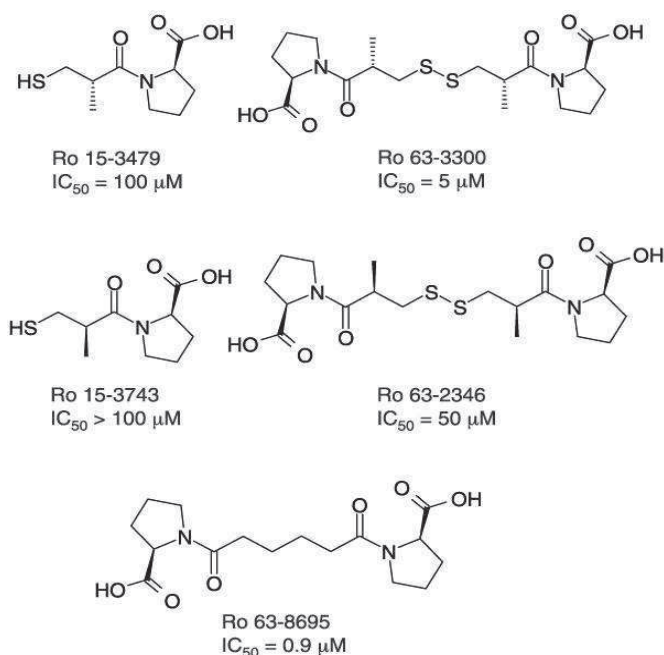


Fig.12. Inhibiteurs de SAP (Pepys *et al.*, 2002)⁷⁹

Cependant les résultats cliniques obtenus avec ces molécules ne sont pas encore concluants. Il faut également prendre en compte que la transthyréline sauvage peut, avec le temps, former des fibres amyloïdes comme dans les SSA où le précurseur protéique est la TTR non mutée.

1.2.3.3 Les autres stratégies (Tableau.3) :

→ Les thérapies géniques :

- Les oligonucléotides antisens (ASO) ciblant la TTR sont une stratégie prometteuse pour le traitement des amyloses à la TTR. ISI-TTR_{RX} (Ackermann *et al*, 2012)⁸⁰ est actuellement en essai clinique en phase I sur volontaires sains.
- Les petits ARN interférents (Coelho *et al.*, 2013)⁸¹
- Les oligonucléotides simples brins (SSO) (Ando, 2005)⁸²
- Les ribozymes (Tanaka *et al.*, 2001)⁸³

Les thérapies géniques sont considérées comme des stratégies thérapeutiques futures très prometteuses pour les amyloses à la TTR.

→ La thérapie immune :

Elle a été développée par Terazaki *et al* (Terazaki *et al.*, 2006)⁸⁴ qui a émis l'hypothèse qu'une immunisation active avec un variant de la TTR déstabilisé pouvait avoir un effet thérapeutique bénéfique sur les amyloses à la TTR.

→ Elimination de la TTR par la circulation sanguine :

Les méthodes utilisées sont : les échanges plasmatiques, les colonnes d'affinités avec un anticorps monoclonal greffé et les colonnes d'affinités pour la TTR (Sekjima *et al.*, 2008)⁸⁵.

Bien que le niveau de TTR baisse significativement immédiatement après le traitement, le niveau revient très rapidement au même niveau qu'avant du au rapide turn-over de la TTR.

→ IDOX :

Le 4'-iodo-4'-déoxydoxorubicine (ou IDOX) (Sekjima *et al.*, 2008)⁸⁵ peut se lier à différents types de dépôts amyloïdes et bien qu'il ait la possibilité de dissoudre les dépôts amyloïdogènes *in vitro* aucun bénéfice n'a été détecté et aucune information existe concernant l'efficacité et la toxicité *in vivo*.

→ La thérapie par radicaux libres piégeurs.

Cette thérapie se base sur l'implication du stress oxydatif dans la le processus de formation des fibres amyloïdes (Sekjima *et al.*, 2008)⁸⁵.

Tableau.3. Stratégies thérapeutiques pour les amyloses à la transthyrétine

Mécanisme pathologique	Stratégie thérapeutique
Mutation du gène de la transthyrétine	Remplacement du gène variant de la TTR par le gène normal de TTR : ▪ Transplantation hépatique ▪ Oligonucléotides ARN/ADN ▪ Oligonucléotides simples brins
Expression du variant ARNm de la TTR	Suppression du variant ARNm de la TTR : ▪ siARN ▪ ASO ▪ ribozymes
Sécrétion du variant de la TTR dans le sérum	Réduction du variant dans le sérum : ▪ échange plasmatique ▪ chromatographie par colonne d'affinité ▪ adsorption de la TTR sur colonne chromatographique
Dissociation du tétramère et mauvais assemblage du monomère de la TTR	Stabilisation de la structure tétramérique de TTR : ▪ liaisons de petites molécules (Diflunisal, Tafamidis ...) ▪ ions chromium trivalent Cr³⁺
Mauvais assemblage ou mauvais repliement du monomère de la TTR	Prévention du mauvais assemblage : ▪ thérapie immune
Formation de fibres amyloïdes	Dissolution des agrégats de TTR/fibres amyloïdes : ▪ thérapie immune ▪ IDOX ▪ thérapie par radicaux libres piégeurs
Cytotoxicité	Réduction de la cytotoxicité : ▪ thérapie par radicaux libres piégeurs

I.3 La maladie d'Alzheimer (MA)

I.3.1 Généralités

La MA est une maladie neurodégénérative entraînant une perte progressive des neurones. Elle a été décrite pour la première fois en 1906 par le médecin allemand Aloïs Alzheimer (Alzheimer, 1907; Bird, 1993)^{86,87}. Les causes exactes restent encore inconnues. Des facteurs génétiques et environnementaux contribueraient à son apparition et à son développement. Il existe cependant des facteurs de risques connus tels que certaines anomalies génétiques, des facteurs de risque cardio-vasculaires ou encore l'intoxication à certains métaux lourds. Elle constitue la forme de démence la plus communément rencontrée (entre 60 et 80 % des cas de démences). Bien que le facteur de risque de cette maladie augmente avec l'âge, et que la plupart des patients atteints ont au moins 65 ans, elle n'est pas forcément liée à l'âge. En effet, environ 5% des cas ont entre 40 et 50 ans (stade précoce de la maladie). En raison du vieillissement de la population, la MA est un véritable problème de santé publique. En effet, selon le World Health Organisation and Alzheimer's Disease International 2013 Dementia Report (Prince *et al.*, 2013)⁸⁸, environ 35.6 millions de personnes à travers le monde étaient atteints de démences incluant la MA en 2010. Il est prévu, que ce nombre double environ tous les 20 ans atteignant 65.7 millions en 2030 et 114.5 en 2050.

I.3.2 Mécanismes pathologiques

La MA est caractérisée par deux types de lésions causées par une accumulation anormale d'une protéine accompagnée d'une diminution de l'acétylcholine (Ach) (Bird, 1998)⁸⁷:

- au niveau extracellulaire, la protéine amyloïde- β ($A\beta$) s'accumule en formant les plaques amyloïdes.
- Au niveau intracellulaire, la protéine Tau s'accumule en formant les enchevêtrements neurofibrillaires.

Une hypothèse a été mise en place par Hardy et Higgins (Hardy & Higgins, 1991)⁸⁹ appelée « la cascade amyloïde » qui suggère que les enchevêtrements neurofibrillaires seraient dus aux dépôts amyloïdes.

L'Ach est un neurotransmetteur localisé dans le système nerveux périphérique (principal neurotransmetteur du système nerveux autonome), et dans le système nerveux central où il constitue avec les neurones associés le système cholinergique avec une action anti-excitatrice.

I.3.2.1 La dégénérescence neurofibrillaire

La fonction principale de la protéine Tau est la stabilisation de la tubuline, protéine essentielle à l'assemblage et au maintien des microtubules constituant le cytosquelette des axones. Physiologiquement, la protéine Tau se détache des microtubules, est dégradée et est ensuite remplacée. Dans la MA, la protéine Tau est non dégradée, elle reste donc dans le milieu intracellulaire et va s'agréger sous forme de paires de filaments hélicoïdaux qui vont aboutir à la formation des neurofibrilles. Cette non dégradation serait due principalement à une hyperphosphorylation de la protéine Tau qui ne permettrait plus l'interaction avec les microtubules. Cette hyperphosphorylation proviendrait de l'action des radicaux libres (Goedert *et al.*, 1993)⁹⁰.

I.3.2.2 Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes correspondent à l'accumulation de la protéine A β . Cette protéine A β provient du clivage d'une glycoprotéine membranaire appelée amyloid protein precursor (APP) (Kang *et al.*, 1987)⁹¹. La protéine APP est impliquée dans la régulation des fonctions synaptiques, la plasticité neuronale, l'exportation du fer... Cette protéine de 365 à 770 AA est clivée par l' α , la β et la γ -sécrétase successivement. Le clivage par l' α - puis par la γ -sécrétase génère A β (fig.13). A β est un peptide de 39 à 43 AA, et les deux formes les plus rencontrées dans le cerveau sont la forme A β (1-40) et la forme A β (1-42) (fig.14). La forme A β (1-40) est la plus répandue mais la forme A β (1-42) serait la plus neurotoxique. Cependant les deux formes sont retrouvées dans les plaques amyloïdes.

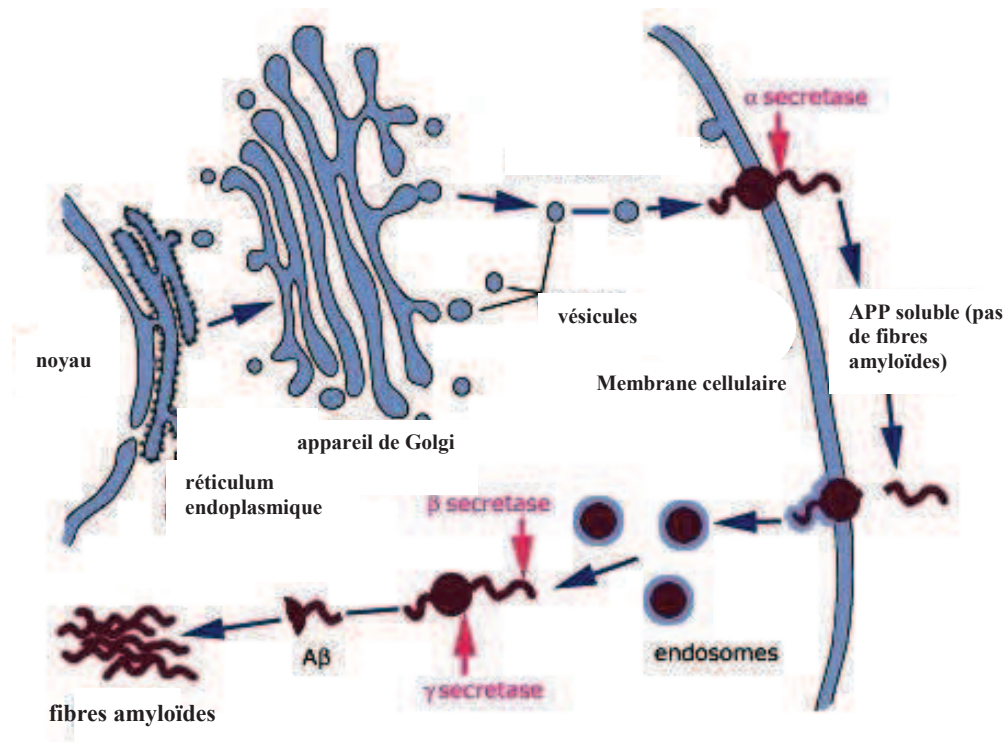


Fig.13. Formation des fibres amyloïdes par clivage successifs de APP (Dean & McEntyre, 1999)⁹²

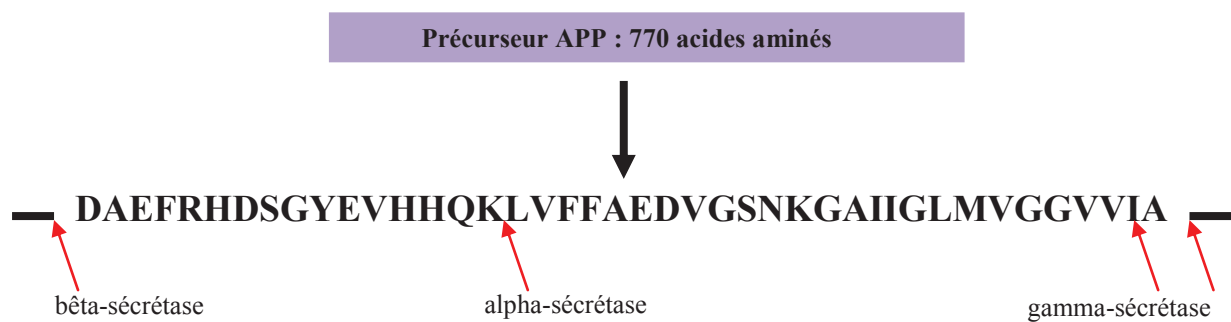


Fig.14. Fabrication de A β à partir du précurseur APP. Séquence entière de la forme A β (1-42)(Puglielli, 2002)⁹³

I.3.2.3 Traitements de la maladie d'Alzheimer

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement spécifique de la MA. Deux stratégies thérapeutiques sont proposées :

- La thérapie la plus courante et la plus ancienne est basée sur l'hypothèse « cholinergique ». La MA serait causée par une réduction de la synthèse de l'Ach. La première molécule mise sur le marché a été la Tacrine (fig.15) en 1984 (Smith et al., 1996)⁹⁴. Cependant elle n'est plus commercialisée en raison de sa très forte hépatotoxicité. Par la suite, des médicaments de deuxième génération sont apparus : les anticholinestérasiques (Pohanka, 2012)⁹⁵ avec le donépézil (Aricept®) (Birks & Harvey, 2006)⁹⁶, la galantamine (Reminyl®) et la rivastigmine (Exelon®). Cependant, ces médicaments présentent des effets secondaires importants notamment au niveau du tube digestif.

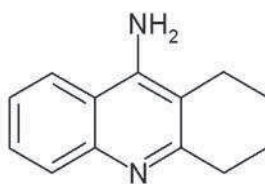


Fig. 15. La Tacrine

- Une classe thérapeutique est apparue en 2002 : les antiglutamates avec un médicament la mémantine (Ebixa®) (Reisberg *et al.*, 2003)⁹⁷. Celui-ci vise à bloquer les récepteurs du glutamate, neurotransmetteur responsable d'une excitation toxique du système nerveux. Ce médicament, bien toléré par les patients, permettrait de retarder la perte des fonctions cognitives.

Cependant, les traitements proposés présentent une efficacité faible, et les effets ne sont pas visibles chez tous les patients. Aucune de ces thérapeutiques ne ralentit l'évolution de la MA, elles améliorent uniquement les conditions de vie. En effet, les études cliniques menées avec le Solanezumab® et le Bapineuzumab®, deux anticorps monoclonaux se liant aux peptides β amyloïdes, ne sont pas efficaces (Doody *et al.*, 2014, Salloway *et al.*, 2014)^{98,99}.

D'autres mécanismes pour traiter la maladie sont en cours d'investigation. Un traitement prometteur serait de viser la transthyréline qui jouerait un rôle dans la formation des plaques amyloïdes (Li & Buxbaum, 2011 ; Ribeiro *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013)¹⁰⁰⁻¹⁰²

I.3.2.4 La transthyréline dans la MA

- **Historique et « hypothèse de séquestration »**

Le rôle probable de la TTR dans la MA a été découvert en 1994 par Schwarzman (Schwarzman *et al.*, 1994)⁶ lors d'un screening de molécules cérébrales qui pouvaient potentiellement se lier à A β . En effet, Goldgaber *et al* (Goldgaber *et al.*, 1993)¹⁰³ ont émis l'hypothèse que A β était séquestrée par des protéines extracellulaires qui préviendraient l'amylose. Les résultats obtenus par Schwarzman ont clairement montré que la TTR n'est pas la seule protéine à pouvoir se lier à A β (ApoE) dans le LCR, mais qu'elle en est la principale. De plus, une fois la protéine A β séquestrée, celle-ci ne peut plus participer à la formation des fibrilles amyloïdes. Physiologiquement, la concentration de TTR (0,3 μ M) dans le LCR est bien supérieure à celle de A β (3 nM) et à celles des autres protéines du LCR (0,1 μ M pour l'ApoE et 0,03 μ M pour l'APP). Une « hypothèse de séquestration » a été émise : physiologiquement, A β produite est séquestrée par certaines protéines extracellulaires ce qui permet de prévenir la formation des fibrilles amyloïdes ainsi que la cytotoxicité de A β . La TTR se lierait non seulement au précurseur APP mais aussi aux deux isoformes de A β (Tsuzuki *et al.*, 2000)¹⁰⁴. Cette interaction et la complexation ont été depuis mises en évidence plusieurs fois. De plus une diminution significative de la concentration en TTR est observée chez la plupart des patients atteints de la MA. Ainsi, la TTR constitue un biomarqueur de la maladie. Egalement, il a été démontré qu'une corrélation négative existait entre le niveau de TTR sérique et la MA, cela suggère donc que la TTR peut être un biomarqueur pour le diagnostic de la MA au niveau sérique (Han *et al.*, 2011 ; Velayudhan *et al.*, 2012)^{7,8}. Par ailleurs, la TTR se lierait aux forme A β (1-42) et A β (1-40) dans le rein et formerait des complexes (Tsuzuki *et al.*, 2000)¹⁰⁴. Une hypothèse d'un rôle préventif de la transthyréline dans la MA a été émise (Schwarzman & Goldgaber, 1996)¹⁰⁵: la transthyréline séquestrerait les peptides A β et préviendrait ainsi la formation des plaques amyloïdes, la formation des plaques amyloïdes et la toxicité conséquentes seraient le résultat de la non séquestration de A β . De nombreuses études sont en faveur de cette hypothèse (Buxbaum *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2008)^{106,107}. Egalement, la TTR est présente dans les plaques amyloïdes chez les souris transgéniques (Stein *et al.*, 2004)¹⁰⁸ et prévient l'agrégation de A β chez *C. Elegans* (Li &

Buxbaum, 2011)¹⁰⁰. De plus les dépôts de A β s'accroissent quand la TTR est délétée chez les souris doubles transgéniques APP/préséniline (APPSwe/PS1 Δ E9) (Choi *et al.*, 2007)¹⁰⁹.

- **La liaison transthyréine/protéine A β :**

Très peu d'informations sont disponibles sur le type d'interactions entre A β et la TTR et la manière dont la TTR agit sur les peptides A β . Les études sont souvent contradictoires. La TTR wild type (i.e. physiologique) est capable de se lier à n'importe quelle forme de A β soluble que ce soit la forme monomérique, oligomérique ou fibrillaire. La plupart des études effectuées sur la liaison TTR/A β ont permis d'identifier des parties de la TTR ou bien de A β susceptible d'être impliquées dans la liaison. Cependant aucune étude n'a été réalisée au sur le type d'interactions impliquées dans la liaison TTR/A β . Du et Murphy (Du & Murphy, 2010)¹¹⁰ ont montré que la protéine A β avait une plus grande affinité pour le monomère de TTR que pour la forme tétramérique. La région 17-24 de A β serait impliquée dans la liaison au monomère. Cette région correspond au domaine hydrophobe de A β .

La compréhension de ces mécanismes pourrait permettre de mettre en place une thérapeutique possible à la formation des plaques amyloïdes dans la MA.

I.4 L'héparane sulfate protéoglycane

L'HSPG est un composé ubiquitaire présent à la surface des cellules animales et il constitue le composant principal des matrices extracellulaires (Lindhal & Li, 2009)²³. Il contribue à l'homéostasie et à la signalisation en interagissant avec une multitude de protéine en dirigeant les signaux cellulaires (ex. dans le cas du Fibroblast growth factor où il constitue un co-récepteur). Bien que l'HSPG permette via ses interactions avec de nombreuses protéines à réguler l'homéostasie et le développement cellulaire, il est également impliqué dans des processus pathologiques. En effet dans les amyloses, il a été démontré que l'héparane sulfate accélère la fibrillation des protéines *in vitro* (Kisilevsky *et al.*, 2007)²⁴. Une altération dans sa structure ou une inhibition de sa synthèse dans les modèles cellulaires et animaux résulte en une atténuation des amyloses ou de la toxicité amyloïde. Il est évident que l'HSPG joue un rôle majeur dans les amyloses, cependant la ou les fonctions exactes d' HSPG dans les différentes amyloses restent encore non élucidées.

I.4.1 Structure

L'HSPG est constitué de l'assemblage d'un GAG (HS), d'un linker et d'une protéine (Tumova *et al.*, 2000)¹¹¹. Cet assemblage est réalisé au niveau de l'appareil de Golgi et il est synthétisé dans quasiment toutes les cellules. Il est présent à la fois à la surface des cellules (Syndécans et glypicans) et dans la matrice extracellulaire (perlécan, agrin, collagène XVIII). L'unité de base de l'HS est un acide hexuronique relié par une liaison 1-4 à une glucosamine (fig.16). La structure est composée d'unités alternées de glucosamine N-acétylées ou N-sulfatées (N-acétylglucosamine ou N-sulfoglucosamine) et d'acides uroniques (acide glucuronique ou acide iduronique).

Les régions chargées négativement, principalement les chaînes sulfatées, fournissent des sites d'interactions pour un très grand nombre de protéines (facteurs de croissance, chemokines, enzymes, protéines de la matrice extracellulaire....). Du fait de ces interactions ioniques, l'HSPG possède un rôle essentiel dans quasiment tous les processus physiologiques. Par ailleurs l'organisation des domaines sulfatés et le nombre de charges présents sur la chaîne de sulfatée paraissent avoir une importance capitale dans les interactions bien plus que la partie carbohydate. Cependant, bien que la plupart des interactions entre l'HSPG et les molécules soient médiées via les chaînes sulfatées, la partie protéique joue également un rôle important dans certaines interactions.

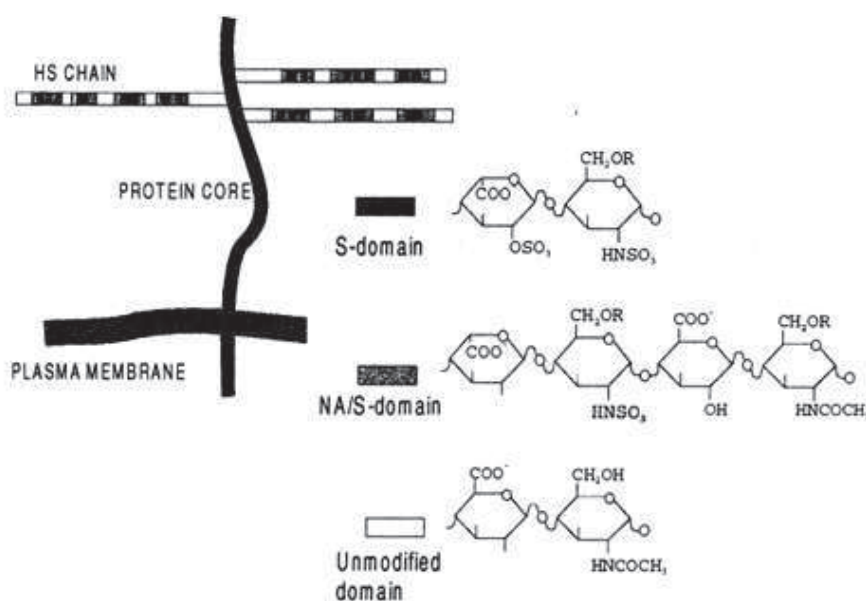


Fig.16. Modèle de structure de l'HSPG. La partie protéique de l'HSPG contient une ou plusieurs chaînes d'HS attachées de façon covalente. (Tumova *et al.*,)¹¹¹

1.4.2 Spécificité des interactions HSPG/protéines

1.4.2.1 Les séquences consensus

Cardin et Weintraub (Cardin & Weintraub, 1989)¹¹² ont mis en évidence des domaines de liaisons à l'HSPG sur des protéines correspondant à des clusters d'AA basiques (lysine, arginine et histidine) caractérisés par deux séquences consensus: « XBBXBX » et « XBBBXXBX » où B est un résidu basique et X un résidu hydrophatique. Ces motifs se retrouvent dans la plupart des protéines qui se lient à l'héparine ou à l'HSPG. De plus, la séquence XBBXBX est en configuration de feuillet β avec les AA basiques alignés sur une face du feuillet et les AA hydrophatiques sont tournés vers la partie protéique. Egalement, la séquence XBBBXXBX se retrouve en configuration d'hélice α .

Par ailleurs, Sobel (Sobel *et al.*, 1992)¹¹³ ont proposé une troisième séquence consensus : « XBBBXXBBBXXBBX » où B représente un résidu cationique.

1.4.2.2 Les acides aminés communément impliqués dans les domaines de liaison

Les peptides enrichis en AA basiques, plus particulièrement en lysine et arginine, présentent une très grande affinité pour l'HSPG ; de même que les peptides riches en AA polaires tel que la sérine (Hileman *et al.*, 1998)¹¹⁴.

Des domaines de liaison à l'héparine sont connus pour contenir des AA capables de créer des liaisons hydrogènes. Ces liaisons hydrogène jouent un très grand rôle dans la spécificité (effet polyélectrolyte). L'asparagine est ainsi communément retrouvée tout comme la glutamine car ces résidus possèdent une chaîne latérale contenant un amide capable de lier un hydrogène. Egalement, la tyrosine est un AA retrouvé car elle peut créer une liaison hydrogène avec le groupement hydroxyle des GAG via son groupement hydroxy phénol.

1.4.3 L'HSPG dans les amyloses

Kisilevsky et Snow (Kisilevsky *et al.*, 2007)²⁴ ont été les premiers à établir une corrélation entre les GAGs et les amyloses. Bien que d'autres GAGs puissent être présents dans les dépôts tel que le chondroïtine sulfate protéoglycane, l'HSPG est le plus largement répandus quel que soit le type d'amylose.

Ainsi, nous retrouvons dans de nombreux précurseurs de protéines amyloïdes des séquences liaison à l'héparine (Tableau.4)

Tableau.4. Séquences des sites de liaison à l'héparine retrouvées dans les précurseurs des protéines amyloïdes.

Aβ	1-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGNKGIIGLMVGGVVIA-42
SAA1	78-ADQEANRHGRSGKDPNYYRPPGLPAKY-104
proIAPP	1-TPIESHQVEKRKCNTATCATQRLANFLVHS-30
β2m	1-IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLN-24
PrP	23-KKRPKPGGWNTGG-35
	23-KKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQ-52
	53-GGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGG-93
	110-KHMAGAAAAGAVVGGLGGY-128
Tau	317-KVTSKCGSLGNIHHKPGGG-335

II Structure des protéines

Généralités

Les protéines sont constituées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques qui se replient plus ou moins fortement sur elles-mêmes dans l'espace pour adopter une structure tridimensionnelle native unique qui leur confère leurs propriétés biologiques.

On distingue quatre niveaux stades structuraux chez les protéines : primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire.

II.1 Structure primaire:

Ordre des acides aminés le long de la chaîne polypeptidique.

I.2 Structure secondaire (Kabsch & Sander, 1983)¹¹⁵

II. 1.1. Définition :

Repliement localisé des acides aminés en hélices, en feuillets, ou en d'autres formes similaires par des liaisons non covalentes.

II.1 .2. Motifs présents dans les structures secondaires :

II.1.2.1. L'hélice (α helix) :

Le squelette principal de la protéine adopte un repliement hélicoïdal périodique.

Trois types d'hélice existent : π , 3_{10} , et α . L'hélice α est la plus fréquente.

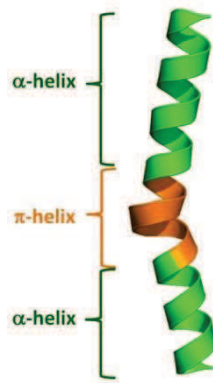


Fig. 17. Hélices α et hélice π . PBD 3QHB

II.1.2.2 Feuillet β (β sheet)

Le brin β est une structure périodique étendue de 5 à 10 résidus. Les feuillets β se forment quand des parties de la longue chaîne polypeptidique se replient et se longent l'une l'autre, côte à côte, en formant des ponts hydrogènes avec la voisine. On parle de feuillets beta parallèles quand les chaînes vont dans le même sens et d'antiparallèles quand elles vont dans des directions opposées.

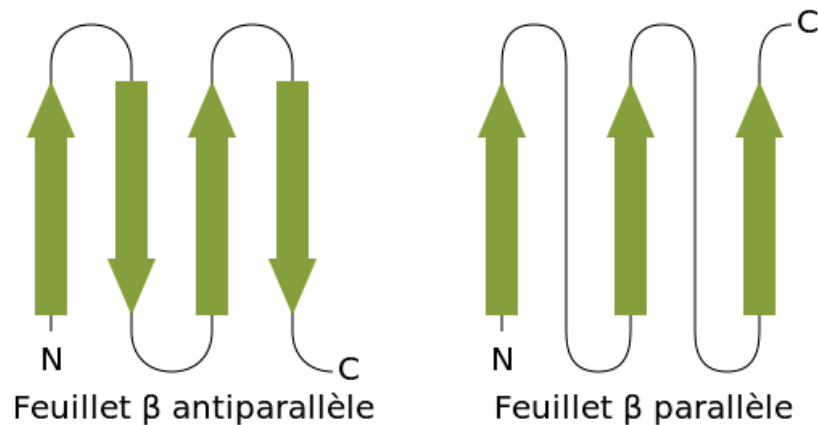


Fig.18. Structure des feuillets β parallèles et antiparallèles.

II.1.2.3 Coudes et tours (turn)

Ces structures sont composées de 2 à 4 résidus et connectent deux brins β antiparallèles. Les coudes ne sont pas des structures périodiques.

Les protéines amyloïdes sont dites bêta-plissées. En effet, les protéines adoptent une forme majoritaire en feuillets β pour former les fibrilles amyloïdes. C'est la structure caractéristique des dépôts amyloïdes (Blake & Serpell, 1996 ; Ferrao-Gonzales *et al.*, 2000)^{44,60} notamment la transthyréline qui est naturellement bêta-plissée (Blake *et al.*, 1971)⁴⁷.

II.2.2.4 Pelote statistique (random coil)

Lorsque la conformation locale d'un segment protéique ne correspond à aucune de ces structures secondaires, on dit qu'il adopte une conformation en pelote statistique non périodique. Ce type de structure est le plus souvent associé aux boucles présentes entre 2 hélices ou feuillets. Pelote statistique ne signifie pas pour autant absence de structuration. Ainsi, certaines protéines ne possèdent aucun élément de structure secondaire régulière (hélice ou feuillet) mais ont une structure parfaitement stable. C'est souvent le cas des hormones et toxines polypeptidiques.

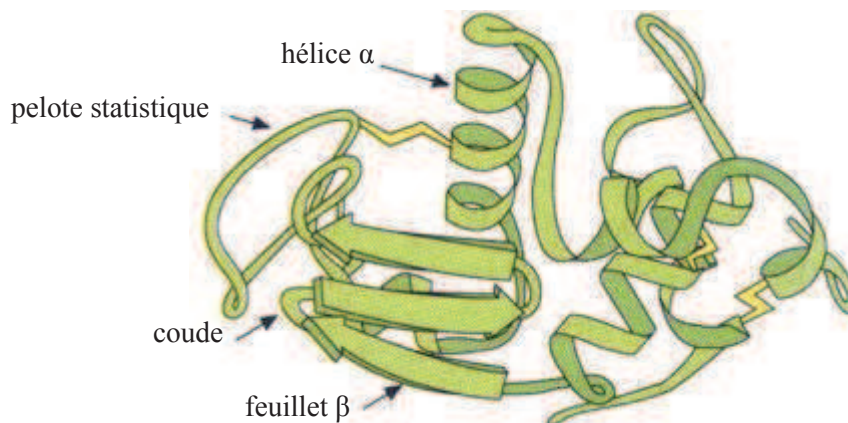


Fig.19. Les différents motifs structuraux formant les structures secondaires (Patneik, 2005)¹¹⁶

II.3 Structure tertiaire

La structure tertiaire d'une protéine correspond au repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace : c'est l'agencement stable dans l'espace des motifs structuraux secondaires (fig.20). On parle plus couramment de structure tridimensionnelle. La structure tertiaire est le résultat de liaisons diverses (hydrogène, hydrophobes, électrostatiques, covalentes,...) entre des acides aminés de la même chaîne peptidique mais non voisins dans la structure primaire.

Les liaisons de la structure tertiaire sont plus ou moins stables : il y a des liaisons faibles de type liaisons hydrogène ou liaisons hydrophobes.

Les liaisons électrostatiques sont dues aux charges électriques des radicaux des acides aminés. Ces charges sont dépendantes du pH. Les acides forts ou les bases fortes dissocient les liaisons électrostatiques de la structure tertiaire entraînant la dénaturation de la protéine.

Des liaisons covalentes enfin établissent des liaisons de forte énergie entre les acides aminés : pont disulfure entre deux cystéines. Les agents oxydants ou réducteurs forts peuvent aussi dénaturer les protéines en oxydant des cystéines ou en réduisant les ponts disulfures. La structure tridimensionnelle d'une protéine est intimement liée à sa fonction.

II.4 Structure quaternaire

La structure quaternaire est le résultat de liaisons diverses (hydrogène, hydrophobes, covalentes,...) entre des acides aminés de chaînes peptidiques différentes mais qui sont unies en une seule molécule (fig.20).

Les liaisons de la structure quaternaire sont les mêmes que celles de la structure tertiaire. Lorsqu'une protéine est constituée de plusieurs protomères, les liaisons de la structure quaternaire exercent d'un protomère à un autre un effet de contrainte qui modifie la structure et donc les propriétés fonctionnelles de l'autre protomère : c'est le fondement de nombreux phénomènes cellulaires : transduction du signal, allostérie, mouvements cellulaires,...(exemple l'hémoglobine).

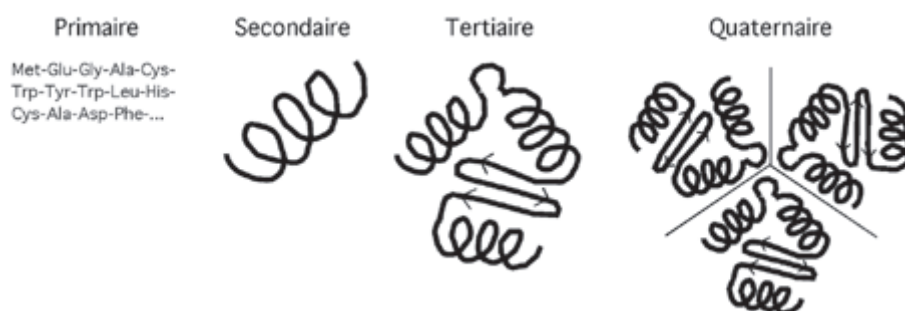


Fig.20. Les quatre niveaux structuraux d'une protéine (Leblanc, 2014)¹¹⁷

III Les nanotubes de carbone (NTCs)

III.1 Généralités

III.1.1 Définition

Un nanotube de carbone peut être décrit comme un feuillet de graphite constitué uniquement d'atomes de carbone placés au sommet d'un réseau hexagonal. Le feuillet est roulé sur lui-même pour former un petit cylindre fermé à ses extrémités par deux demi sphères.

III.1.2 Historique

Les nanotubes ont été découverts par le chercheur japonais Sumio Iijima en 1991(Iijima, 1991)¹¹⁸ alors qu'il s'intéressait à la synthèse de fullerènes (fig.28). Depuis cette date, ils ont fait l'objet de diverses études quant à leurs propriétés et leurs applications envisageables.

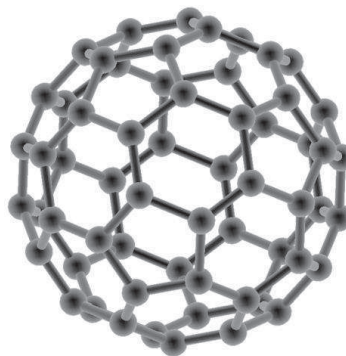


Fig .28. Structure d'un fullerène

III.1.3 Structure

Un nanotube de carbone est un petit cylindre de 0,5 à une dizaine de nanomètres de diamètre et sa longueur ne dépasse pas quelques micromètres. Sa structure est unidimensionnelle et de symétrie axiale. Il est formé à partir de carbone graphène hexagonale hybridé sp^2 (Battigelli *et al.*, 2013)¹¹⁹(fig.29). Il peut être sous forme de mono- (SWNT : single-wall carbon nanotube) double-feuillets (DWCNT : double-wall carbon nanotube) ou multi-feuillets (MWNT :multi-wall carbon nanotube) (fig.30). Le feuillet peut être ouvert ou fermé à son extrémité (capped).

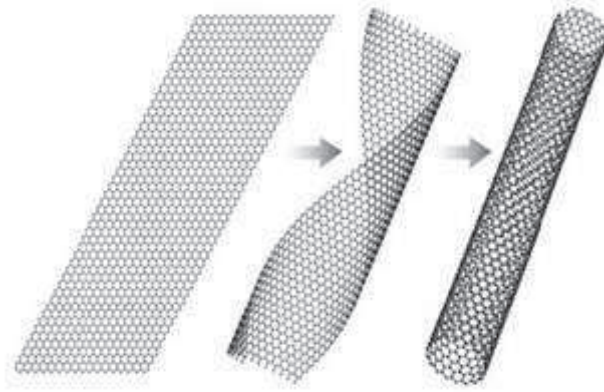


Fig. 29. Formation d'un NTC

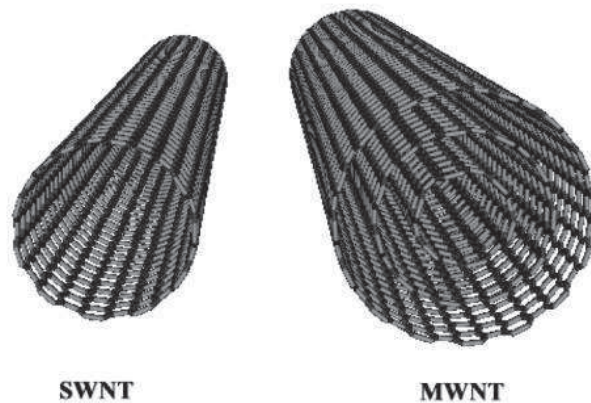


Fig.30. Structure du NTC mono- et du multi-feuillets

III.2 Propriétés

Les NTCs sont le seul matériau connu qui combine des propriétés mécaniques, thermiques et électroniques aussi importantes.

III.2.1 Les propriétés mécaniques

La force des liaisons carbone - carbone hybridée sp^2 donne des propriétés mécaniques incroyables aux NTCs et ils constituent le matériau le plus solide qui existe.

Ils présentent une très grande rigidité, comparable à celle de l'acier, tout en étant extrêmement légers. Les principales caractéristiques sont (Saifuddin *et al.*, 2012)¹²⁰ :

- La dureté : certains nanotubes sont plus durs que le diamant.

- La conductivité thermique : NTC ont une conductivité plus grande que celle du diamant.
- L'élasticité : le nanotube se déforme de façon permanente, ou se casse, bien avant que cette valeur soit atteinte. Les nanotubes de carbone devraient être environ 200 fois plus résistants que l'acier pour un poids 6 fois moindre. Le NTC présente une grande élasticité tel que le silicone et une grande flexibilité.

III.2.2 Les propriétés électriques

Les NTCs ont la particularité toute à fait exceptionnelle de pouvoir être soit métalliques soit semi-conducteurs en fonction de leur géométrie (diamètre du tube et angle d'enroulement de la feuille de graphène) (Saifuddin *et al.*, 2012)¹²⁰. Les nanotubes ont une conductivité supérieure à celle du cuivre (et 70 fois supérieure à celle du silicium). Le NTC a la plus grande mobilité jamais mesurée.

III.2.3 Les propriétés chimiques

Les nanotubes sont des structures creuses, que l'on peut remplir avec d'autres composés chimiques (Battigelli *et al.*, 2013)¹¹⁹, ce qui en fait des récipients clos appelés "nanofils". Les NTCs présentent également des propriétés d'absorption : d'intensité optique, de photoluminescence et génèrent aussi un signal Raman puissant (Wong *et al.*, 2013)¹²¹

III.3 Applications

Les nanotubes de carbone, du fait de leurs nombreuses propriétés, offrent un immense potentiel d'applications. Ces applications pourraient considérablement améliorer la vie quotidienne mais permettraient également de développer divers domaines scientifiques.

III.3.1 Applications technologiques chimiques et physiques

- En électronique, la conductivité des nanotubes permettrait la création d'écrans plats flexibles. Leur excellente conductivité thermique est un atout pour améliorer un matériau en lui incorporant des nanotubes.

- Améliorer un matériau est une application importante des nanotubes car ils possèdent une solidité supérieure à celle de l'acier tout en restant léger. On pourrait ainsi les utiliser pour des câbles. Les nanotubes sont déjà utilisés dans des équipements sportifs comme des raquettes de tennis ou des vélos.

II.3.2 Applications biologiques

Du fait de leurs incroyables propriétés et de leur taille, les NTCs sont depuis quelques années très largement étudiés et notamment au niveau biologique en tant qu'outils pour le transport intracellulaire de molécules du fait de leur possibilité d'être internalisés dans la cellule. Egalement, leur large surface permet d'être fonctionnalisée par des molécules. De plus, leurs applications peuvent être étendues aux domaines de la détection, du monitoring ainsi que de la thérapie (Ali-Boucetta *et al.*, 2013)¹²².

- Transport d'agents thérapeutiques (Wong *et al.*, 2013)¹²¹: la forme des NTCs leur permet de contenir des substances médicales pour des traitements ciblés et de les fonctionnaliser. Les NTCs sont largement employés en tant que transporteurs pour le contrôle et le ciblage thérapeutique afin d'améliorer l'activité pharmacologique des molécules bioactives et diminuer en même temps leurs effets systémiques indésirables. De nombreux agents thérapeutiques tels que des molécules anti-cancéreuses (exemple les inhibiteurs de topoisomérases, les anthracyclines, les antimicrotubules...), des antimicrobiens, des agents anti-inflammatoires, mais aussi des molécules plus complexes telles que des vaccins sous forme peptidiques (Scheinberg *et al.*, 2013)¹²³, des anticorps (Wu *et al.*, 2014)¹²⁴ et des petits ARN interférents ont pu être délivrés avec succès en utilisant les NTCs.

- Vecteurs de thérapies géniques (Bates & Kostarelos., 2013)¹²⁵
- Outils pour la neurogénération et la réparation (Fabbro *et al.*, 2013)¹²⁶
- Outils pour la thérapie hyperthermique (Singh & Torti., 2013)¹²⁷. Se servir des NTCs pour des muscles artificiels serait une avancée, notamment pour des engins robotiques destinés à des températures extrêmes.
- Outils pour l'imagerie biomédicale (Gong *et al.*, 2013)¹²⁸

III.4 Limites biologiques de l'utilisation des NTCs

La biodistribution, les effets à long terme et la toxicité des NTCs sont étroitement liés à leurs chimies de surface, leur tailles, leurs doses et leurs voies d'administration (Wong *et al.*, 2013)¹²¹.

III.4.1 Insolubilité des NTCs

Les NTCs présentent des problèmes de solubilité dans la plupart des solvants dues à leurs propriétés chimiques et forment ainsi des paquets. En effet dans l'eau, une grande quantité de stabilisateurs est requise afin d'éviter une floculation et une séparation de phase. De plus les NTCs sont très hydrophobes de par leur structure carbonée.

Afin d'intégrer les NTCs dans les systèmes biologiques, la fonctionnalisation est un des moyens pour améliorer leur biocompatibilité et leur dispersion (Karousis *et al.*, 2010)¹²⁹. Trois approches de fonctionnalisation existent (Jeon *et al.*, 2011)¹³⁰ (fig.31) :

- attachement covalent de molécules
- fonctionnalisation déficiente du NTCs et fonctionnalisation non-covalente par adsorption de molécules à leur surface
- encapsulation de molécules dans la cavité interne des NTCs

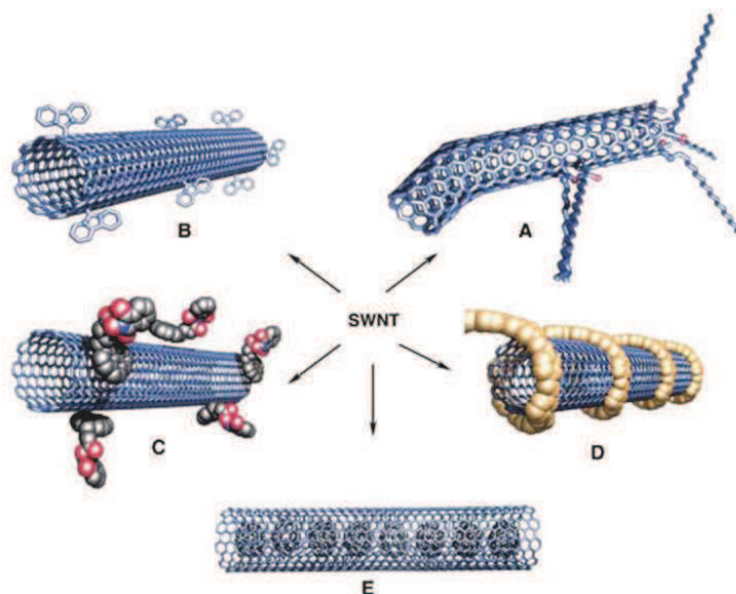


Fig. 31. Fonctionnalisations possibles des NTCs. a) fonctionnalisation défectueuse du NTC, b) attachement covalent de molécules, c) et d) fonctionnalisation non-covalente par adsorption de molécules à leur surface, e) encapsulation de molécules dans la cavité interne des NTCs (Jeon *et al.*, 2010)¹³⁰

III.4.2 Toxicité et biodistribution des NTCs

Depuis la découverte des NTCs, les premières études montrant leur toxicité datent d'environ dix ans (Daigle *et al.*, 2003 ; Lam *et al.*, 2004)¹³¹¹³². Ces études mettent en évidence le risque potentiel sur la santé, plus particulièrement au niveau pulmonaire, après une exposition aux NTCs. Les NTCs sont éliminés dans le corps par le processus de phagocytose des macrophages qui est lent (Sturm, 2014)¹³³.

Leur réactivité toxicologique dépend de plusieurs paramètres physico-chimiques (Lanone *et al.*, 2013)⁸:

- Les dimensions (la longueur, le diamètre) : ces paramètres peuvent affecter le site de dépôts des NTCs et le contact cellulaire.
 - Les sites de dépôts des NTCs : en effet lors de l'inhalation, les NTCs peuvent s'accumuler au niveau des poumons.
 - Le contact cellulaire : les NTCs peuvent induire une inflammation des tissus (Bhattacharya *et al.*, 2013)¹³⁴.
- Les propriétés de surface et la fonctionnalisation : l'incompatibilité des NTCs avec la plupart des solvants présente un réel problème pour leur utilisation en nanomédecine. Pour

améliorer leur biocompatibilité, les NTCs sont fonctionnalisés par un traitement acide multi-étapes. L'acidité crée une oxydation de la surface des NTCs qui est déterminante dans leur toxicité. De plus la surface, la tendance à s'agglomérer, la dispersion en solution, la présence et la nature de résidus catalyseurs constituent des paramètres qui interviennent dans la cytotoxicité des NTCs.

IV Modèle d'étude

IV.1 La chromatographie liquide haute performance-CHLP

IV.1.1 Principe de base

Le fonctionnement de la CLHP peut être divisé en quatre étapes (fig.21) :

- **Approvisionnement du solvant (phase mobile)**

Sous l'effet d'une pompe à haute pression, la phase mobile ou éluant (considérée comme notre milieu d'étude) circule à travers la colonne et le système chromatographique. (Fig.17)

- **Injection de l'échantillon**

L'échantillon à analyser (ligand L) est injecté via une vanne d'injection dans le système chromatographique où il va être transporté par la phase mobile.

- **Passage dans la colonne**

La phase mobile transporte l'échantillon dans la colonne remplie de phase stationnaire. Dans notre cas, la macromolécule M (HSPG) étudiée est greffée sur un support de silice constituant la phase stationnaire. Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. L'échantillon sort de la colonne au bout d'un temps plus ou moins long selon son affinité pour la phase stationnaire. En effet, si celui-ci a une forte affinité pour la phase stationnaire alors son temps de sortie (également appelé temps de rétention) sera grand. La fixation du ligand sur la phase stationnaire est caractérisée par son facteur de rétention k'_L .

- **Détection**

La détection du signal chromatographique se fait via un détecteur UV-visible avec obtention d'un tracé chromatographique (chromatogramme). k'_L peut être mesuré directement via le chromatogramme grâce au temps qui sépare le sommet du pic d'élution du ligand L de son injection.

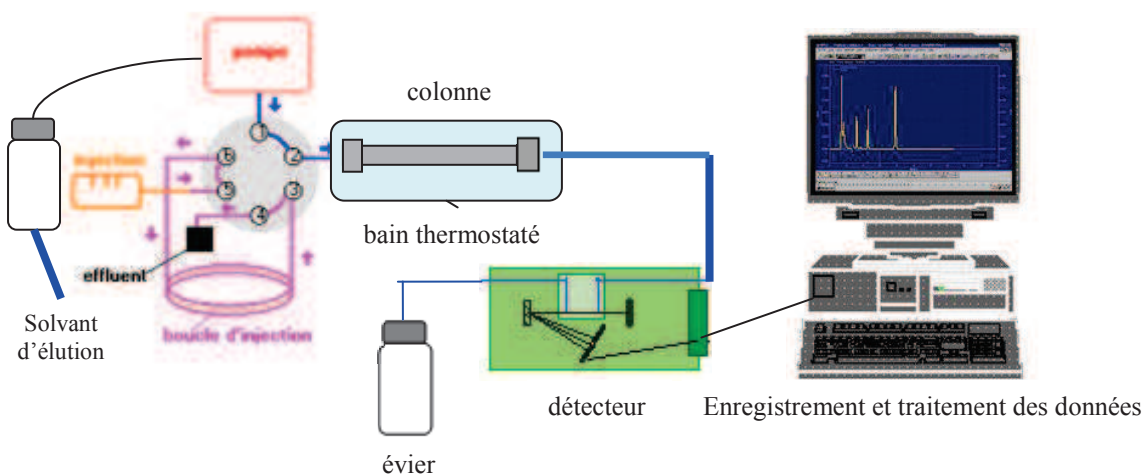


Fig.21. Représentation schématique d'une chaîne chromatographique Liquide Haute Performance (CLHP) (André et al., 2005)¹³⁵

IV.1.3 La Biochromatographie

La CHLP est la méthode la plus largement utilisée comme méthode analytique et préparative. En effet, elle offre beaucoup d'avantages :

- Haute résolution
- Séparation rapide
- Suivi en continu de l'effluent de la colonne
- Mesures quantitatives précises
- Analyses répétitives et reproductibles sur la même colonne
- Automatisation des protocoles d'analyse et du traitement des données

La CHLP habituellement utilisée comme technique séparative est aussi employée comme moyen d'étude physico-chimique pour déterminer l'association entre un ligand L et une macromolécule M. Elle est basée sur les différences d'affinité du ligand L à analyser à l'égard des deux phases, l'une mobile, l'autre stationnaire.

La CLHP d'affinité appliquée aux molécules biologiques (protéines, peptides) également appelée biochromatographie, est un puissant outil pour étudier la reconnaissance moléculaire, notamment le mécanisme d'association entre un xénobiotique et une molécule cible, avec des applications biopharmaceutiques et médicales (Hage, 1999; André et Guillaume, 2004)^{136,137}. Elle constitue un outil complet et rapide pour l'étude du mécanisme d'association d'un ligand L et d'une macromolécule M par rapport aux autres méthodes physico-chimiques (titrages calorimétriques, spectrofluorométrie, dichroïsme circulaire). La biochromatographie permet

ainsi d'étudier l'influence de plusieurs paramètres physico-chimiques sur l'association ligand /macromolécule. Les facteurs physico-chimiques peuvent être :

- Quantitatifs : pH et force ionique du milieu, température, concentration en agent compétiteur...
- Qualitatifs : nature d'un sel, modification de la structure de la macromolécule ou du ligand...

Ainsi la variation de ces différents paramètres permet de mimer le plus possible le milieu biologique (pH, température, présence de sels...) (Bagnost *et al.*, 2008)¹³⁸. L'étude de la température permet d'accéder aux paramètres thermodynamiques (enthalpie et entropie) du mécanisme d'association entre le ligand L et la macromolécule M. ...) (André *et al.*, 2005)¹³⁹. La phase stationnaire est constituée de la macromolécule M qui est fixée de manière covalente sur une résine constituée de particules de silice sur lesquelles sont greffés des groupements amine. L'immobilisation de la macromolécule M sur ce support chromatographique permet de créer une nouvelle colonne chromatographique spécifiquement dédiée à l'étude des mécanismes d'association entre la macromolécule M et ses différents ligands L.

IV.2. Les grandeurs chromatographiques

II.2.1 Equilibre chimique entre une macromolécule M et un ligand L

L'équilibre entre notre macromolécule M et un ligand L peut être vu comme une association ligand/récepteur (fig.22) :

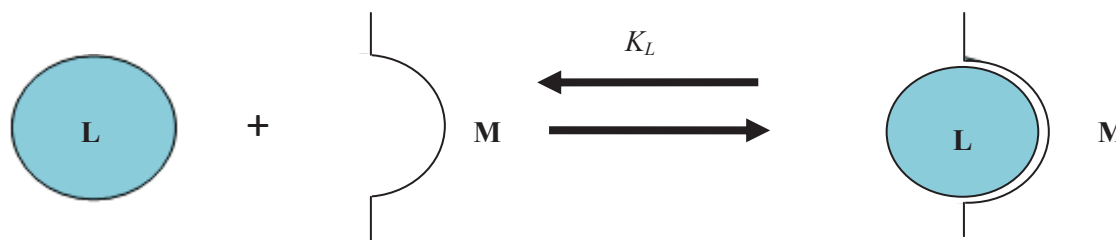


Fig .22. Schéma de l'interaction d'un ligand L sur le site récepteur de la macromolécule M

L'équilibre suivant peut-être décrit :



M étant greffée sur le support de silice, K_L la constante d'association est donc déterminée par l'équation suivante (Hage 1999, Melander & Horvath 1986)^{136,140}.

$$K_L = \frac{k'_L}{\varphi} \quad (2)$$

où φ représente le rapport de phase de la colonne (volume de la phase stationnaire divisé par le volume de la phase mobile). Comme φ est une constante, le facteur de rétention du ligand L k'_L est directement proportionnel à la constante d'association K_L ; k'_L caractérise donc l'affinité de L pour son site récepteur de la macromolécule M dans notre étude.

k'_L est également relié au temps de rétention t_L (temps de sortie du ligand L de la colonne) et au temps mort de la colonne t_0 (temps de rétention d'un ligand n'ayant aucune affinité pour M) par l'équation suivante :

$$k'_L = \frac{t_L - t_0}{t_0} \quad (3)$$

IV.2.2 Effet du pH sur l'interaction macromolécule M et ligand L

Généralement et plus particulièrement *in vivo*, les interactions moléculaires sont dépendantes du pH (Guillaume *et al.*, 2000)¹⁴¹. Si on considère un ligand L et une macromolécule M interagissant entre eux, un équilibre s'établit donné par l'Eq. (1) :



Alors, l'effet du pH sur le ligand L est caractérisé par l'association d'un ou de protons au ligand (proton linkage). Au niveau moléculaire, cette association/ est le résultat d'une altération des valeurs des pKa des acides aminés ionisables impliqués dans l'interaction. Ainsi, lorsque le pH du milieu varie, une description plus détaillée du processus d'interaction est nécessaire afin de visualiser la conservation de masse de chaque espèce ainsi que la liaison des protons au ligand (Bagnost *et al.*, 2010)¹⁴²



où $n_{H^+} = C - (A + B)$ est le nombre de protons liés à L lors de la réaction.

La constante d'association de cet équilibre est donnée par:

$$K = \frac{[L-M]}{[L][M][H^+]^n} \quad (5)$$

Eq. (5) peut être réécrite:

$$K = \frac{K_0}{[H^+]^n} \quad (6)$$

où K_0 correspond à la valeur de K pour $[H^+] = 1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Le logarithme de l'Eq. (6) donne :

$$\log K = \log K_0 - n_{H^+} \log [H^+] \quad (7)$$

Après dérivation de l'Eq. (7) :

$$\frac{\partial \log K}{\partial \log [H^+]} = -n_{H^+} \quad (8)$$

Comme $k' = \phi K$ Eq. (8) peut-être réécrite telle que:

$$\frac{\partial \log k'}{\partial \log [H^+]} = -n_{H^+} \quad (9)$$

IV.2.3 Effet de la température sur l'interaction macromolécule M et ligand L : courbes de Van't Hoff

L'enthalpie libre standard ΔG° du processus de fixation de L sur M est reliée à la constante d'association K_L par la relation suivante :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_L \quad (11)$$

où T est la température exprimée en Kelvin et R la constante des gaz parfaits.

K_L peut être exprimée en termes d'enthalpie standard ΔH° et d'entropie standard ΔS° du processus de fixation par la relation suivante :

$$\ln K_L = \frac{-\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (12)$$

Comme k'_L est proportionnelle à K_L (équation 11), on peut également écrire une relation similaire à l'équation entre le facteur de rétention k'_L et la température :

$$\ln k'_L = \frac{-\Delta H^\circ}{RT} + \Delta S^{\circ*} \quad (13)$$

$$\text{avec } \Delta S^{\circ*} = \frac{\Delta S^\circ}{R} + \phi \quad (14)$$

La courbe $\ln K_L$ (ou $\ln k'_L$) en fonction de $1/T$ est nommée courbe de Van't Hoff. Dans le cas où le processus de fixation se produit avec une enthalpie et un nombre de sites de liaison (récepteurs) constant sur M dans le domaine de températures étudiées, la courbe de Van't Hoff est une droite permettant le calcul des paramètres thermodynamiques ΔH° et $\Delta S^{\circ*}$ du processus de fixation (Melander & Horvath, 1986)¹⁴⁰. Lorsque les conditions opératoires varient, $\Delta S^{\circ*}$ (sans unité) varie de manière identique à ΔS° puisque ϕ est une constante.

IV.2.4 Compensation enthalpie-entropie (CEE)

Afin d'analyser plus finement le mécanisme d'association entre X et M lorsque les conditions d'analyse varient, la notion de CEE a été utilisée. C'est une méthode extra-thermodynamique d'analyse de données physico-chimiques (Melander & Horvath, 1986)¹⁴⁰.

La CEE permet d'étudier le mécanisme d'interaction d'une classe des ligands avec une macromolécule lorsque les conditions opératoires changent. Elle est exprimée généralement par la relation suivante :

$$\Delta H^\circ = \beta \Delta S^\circ + \Delta G^\circ_\beta \quad (15)$$

ΔG°_β est l'enthalpie libre du processus physico-chimique de fixation d'un ligand sur un récepteur à la température de compensation β . D'après l'équation, si la CEE est observée lorsque les conditions d'analyse varient (variation de pH, ajout d'ions dans le milieu...), alors le ligand a une enthalpie libre ΔG°_β , à la température β , indépendante des conditions opératoires. Dans ce cas, la contribution enthalpique à l'enthalpie libre est identique pour toutes les conditions. De façon similaire, la contribution entropique à l'enthalpie libre est la même (Ranatunga *et al.*, 2002)¹⁴³. Le type d'interaction entre le ligand et la macromolécule est alors indépendant des conditions. On démontre qu'il existe la relation suivante entre la température de compensation β et la constante d'association K_L calculée à une certaine température T :

$$\ln(K_L)_T = \frac{-\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{\beta} \right) - \frac{\Delta G^\circ_\beta}{R\beta} \quad (16)$$

Comme k'_L est proportionnel à K_L (équation 2), on peut également écrire une relation similaire à l'équation entre la température de compensation β et le facteur de rétention k'_L déterminé à une certaine température. Les courbes des équations $\ln (K_L)_T = f(\Delta H^\circ/R)$ ou $\ln (k'_L)_T = f(\Delta H^\circ/R)$ sont ainsi des droites de pente égale à $-(1/T)+(1/\beta)$. La température de compensation β correspond à la valeur de température pour laquelle, quelles que soient les conditions d'analyse, le ligand X a la même constante d'association K_L sur le récepteur.

De façon identique, il est possible d'étudier la CEE pour une classe de ligands dans un système donné d'étude. Si la CEE est observée, on peut conclure que les ligands sont retenus sur le récepteur par globalement le même type d'interaction (Melander & Horvath., 1986)¹⁴⁰.

Cependant, Ranatunga *et al.* (Ranatunga *et al.*, 2002)¹⁴³ ont montré que, pour des composés chimiquement différents et n'ayant pas les mêmes activités biologiques, l'ensemble des ligands testés ne présentent pas forcément le même mécanisme d'interaction (ou fixation) sur le récepteur, même si la CEE est observée. Par contre, une différence dans les valeurs des

pentés des courbes $\ln (k'_L)_T = f(\Delta H^\circ/R)$ correspondant à différentes conditions opératoires permet de conclure à un changement du mécanisme de fixation sur le récepteur (Ranatunga *et al.*, 2002)¹⁴³.

IV.3. Les interactions mises en jeu dans les phénomènes d'interaction gouvernant l'association ligand/macromolécule

Pour qu'un ligand s'associe à une macromolécule, il est nécessaire qu'il soit dans son voisinage. Les forces qui permettent ce rapprochement sont à longue portée et constituent principalement les interactions hydrophobes et coulombiennes. On parle alors d'interactions primaires. Succédant à cette étape, le ligand L engage avec la macromolécule M des interactions à courtes portées (interactions secondaires) représentées par les interactions de Van der Waals, hydrogène et répulsion stérique. Ce sont ces deux types d'interactions qui permettent un assemblage optimum entre le ligand L et la macromolécule M.

IV.3.1 Les interactions hydrophobes

Lorsqu'une molécule hydrophobe se trouve dans un milieu aqueux, les liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau vont se casser afin de faire de la place pour la molécule hydrophobe. Les molécules d'eau n'interagissent pas avec la molécule hydrophobe (fig.23). Cette réaction est considérée comme endothermique car l'énergie des liaisons défaites reste dans le système. Les molécules d'eau vont alors former de nouvelles liaisons hydrogènes et vont ainsi créer une cage appelée clathrate autour de la molécule hydrophobe. Ceci permet d'obtenir un système plus ordonné ; donc ΔS est négatif. Lorsqu'une autre molécule hydrophobe est ajoutée au milieu, les deux molécules hydrophobes vont interagir spontanément entre elles en créant des interactions hydrophobes. Ainsi l'enthalpie va augmenter (ΔH est positif) car des liaisons hydrogènes formant la clathrate vont se casser. Ainsi le système sera plus en désordre (ΔS positif).

Selon la formule de Gibbs: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

ΔH = petite valeur positive

ΔS = large valeur positive

→ ΔG est négatif et la formation d'interactions hydrophobes est une réaction spontanée.

Au niveau biologique particulièrement protéique, ces interactions sont importantes dans le repliement des protéines. En effet, cela permet à la protéine de rester active biologiquement en diminuant sa propre surface de contact et ainsi de réduire le nombre d'interactions indésirables avec l'eau.

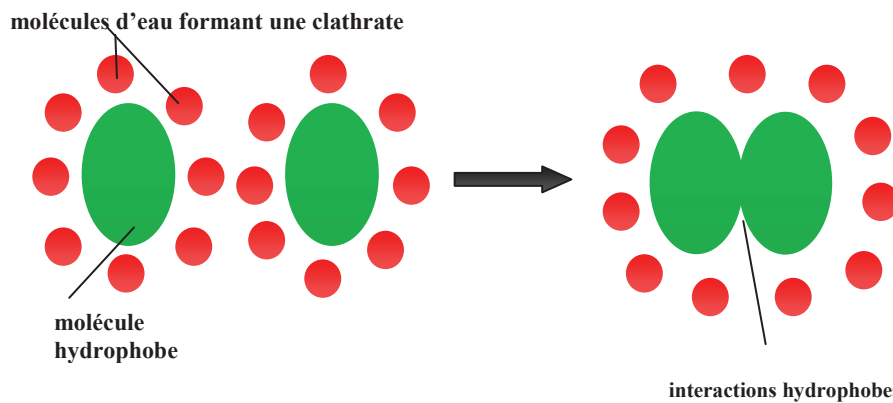


Fig.23. Formation d'une interaction hydrophobe

IV.3.2 Les forces coulombiennes

Ce sont des interactions entre des molécules chargées (fig.24). Elles peuvent être attractives ou répulsives. L'ordre de grandeur des interactions électrostatiques est de 150 à 900 kJ/mol, ce sont des interactions donc fortes.

En solution les ions sont entourés d'unités de charges opposées : c'est la double couche ionique. Cet environnement fait décroître rapidement la portée des forces coulombiennes par un phénomène d'écran. La limite de ces interactions est définie par la longueur de Debye. Les interactions coulombiennes jouent un rôle prépondérant dans de nombreux phénomènes biologiques comme la stabilité des biopolymères et des cellules.

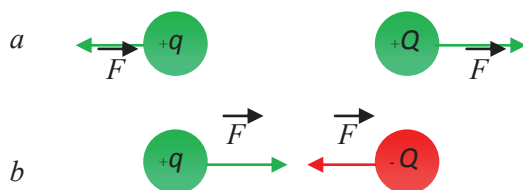


Fig.24. Forces coulombiennes. a) force répulsive, b) force attractive

IV.3.3 Les liaisons hydrogène

Ces liaisons ont lieu à chaque fois que des atomes de forte électronégativité sont associés à l'hydrogène (usuellement l'oxygène, l'azote, ou le fluor). La présence de charge partielle positive sur les atomes d'hydrogène provoque une attraction vers les doublets non liants des ligands. Il s'agit une interaction de haute énergie mettant en jeu la composante d'orientation des forces de Van der Waals.

Ces liaisons peuvent être intermoléculaires ou intramoléculaires. L'exemple type est celui des molécules d'eau qui s'organise en clathrate (fig.25)

La liaison hydrogène est capable de transférer des ions H^+ entre les molécules qu'elle lie. Cette propriété est très importante car elle est à l'origine de la réactivité des milieux aqueux.

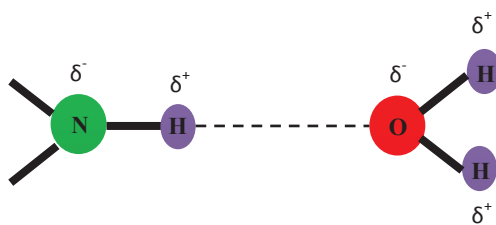


Fig.25. Liaison hydrogène entre l'oxygène accepteur de H^+ et l'azote donneur de H^+

IV.3.4 Les forces de Van der Waals

Il s'agit de forces d'origine électrique attractives qui, pour la plupart, proviennent des interactions entre des dipôles permanents ou induits. Ce sont les interactions inter- et intramoléculaires les plus faibles. On peut décliner les forces de Van der Waals en trois composantes :

- **Forces de Keesom : effets d'orientation**

Si les molécules de la phase mobile possèdent un dipôle permanent (eau, alcool...), une interaction entre deux dipôles s'établit (fig.26). En l'absence de contraintes extérieures, les dipôles s'alignent pour minimiser l'énergie.



Fig.26. Forces de Keesom : interaction dipôle-dipôle

- **Forces de Debye : effet d'induction**

Debye a ajouté aux forces de Keesom les forces dues aux dipôles induits. Une molécule dipolaire crée un champ électrique dans son voisinage (fig.27). Ce champ électrique polarise les molécules qui s'y trouvent et celles-ci sont alors attirées par les molécules polaires. Ces forces peuvent s'appliquer entre une molécule polaire et une molécule apolaire.

- **Forces de London ou forces de dispersion**

Les molécules non polaires peuvent présenter à chaque instant un moment dipolaire dû aux mouvements relatifs des électrons et des noyaux (fig.27). Si la molécule a en moyenne un moment dipolaire nul, à chaque instant, elle présente un moment électrique pouvant agir sur les molécules voisines. Elle peut créer ainsi des dipôles induits et des forces d'attraction.

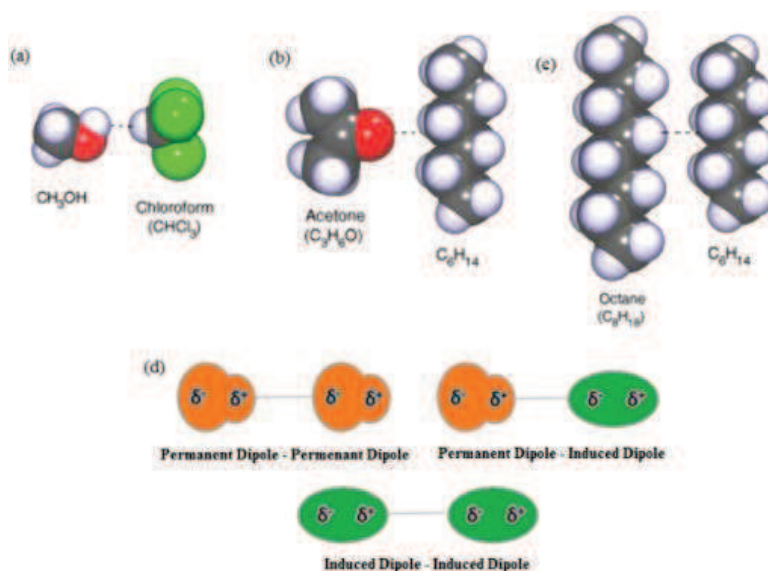


Fig.27. Récapitulatif des différentes forces de Van der Waals. (a) Forces de Keesom. (b) Forces de Debye. (c) Forces de London. (d) Résumés des interactions au niveau charges. (Leite et al., 2012)¹⁴⁴

IV.3.5 Répulsion stérique

Ce sont des forces de répulsion qui prédominent à très courte distance dès que les orbitales moléculaires tendent à s'interpénétrer.

La répulsion stérique se produit lorsqu'un groupe chargé d'une molécule est apparemment affaibli ou spatialement protégé par des atomes moins chargés (ou de charge opposée), y compris les ions en solutions (répulsion de Debye).

MATERIELS ET MODES OPERATOIRES

I Extraction et caractérisation de la TTR sénile

Les travaux ont été effectués pendant trois mois en début de la thèse dans le laboratoire de M. Benson (Indianapolis, Etats Unis) et sous sa direction (Benson *et al.*, 2009)¹⁴⁵.

I.1 Extraction des fibrilles amyloïdes

I.1.1 Détection des fibrilles amyloïdes

Les tissus amyloïdes ont été obtenus post- mortem à partir du cœur d'un homme âgé de 80 ans décédé d'une insuffisance cardiaque suite à une amylose sénile. Le diagnostic de l'amylose a été confirmé par coloration au Rouge Congo et caractérisation au microscope à lumière polarisée avec une biréfringence vert-pomme. La coloration au Rouge Congo a été réalisée à partir d'un extrait du tissu cardiaque qui a tout d'abord été chauffé puis fixé 10 min dans une solution de formaline. Il a ensuite été mis 5 min dans du PBS, 5 min dans une solution à 80 % éthanol, puis 20 min dans une solution contenant 50 mL d'éthanol à 80 %, 1,5 g de NaCl, et 10 µL de 50/50 NaOH ont été ajoutés après mélange et filtration. Une coloration d'une heure dans une solution de Rouge Congo est effectuée. La solution de Rouge Congo est préparée à partir de 50 mL d'une solution d'éthanol à 80 %, 1.5 g de NaCl et 0,1 g de Rouge Congo, puis 10 µL de 50/50 NaOH sont ajoutés après mélange et filtration. Après coloration, des lavages de 5 min sont réalisés : 3 dans H₂O, un dans un mélange NH₄OH/H₂O, 2 dans l'éthanol 95 %, 2 dans l'éthanol 100 %, et enfin 2 lavages dans du xylène.

La partie cardiaque a été congelée jusqu'à utilisation.

I.1.2 Extraction des fibrilles amyloïdes

Le traitement pour l'isolation des fibres amyloïdes a été réalisé par modification de la procédure de Pras *et al* (Pras *et al.*, 1968)¹⁴⁶. Environ 37 g de tissus cardiaque sont en premier découpés avec une lame pour faciliter la fragmentation. Ils sont fragmentés au mortier, suspendus dans 0.1 M de tampon citrate/NaCl (160 mL de tampon pour 30 g de tissus), et homogénéisés pendant une minute par un broyeur à tissus. Une centrifugation à 12000 RPM à 8°C pendant 30 min est effectuée afin de récupérer le culot qui est ensuite resuspendu et homogénéisé pendant 30 sec dans du tampon citrate/NaCl et ceci 4 fois. La

resuspension et l'homogénéisation sont refaites dans du tampon NaCl. Après chaque lavage au tampon NaCl, la DO à 280 nm est mesurée. Les lavages sont répétés jusqu'à ce que la valeur de DO descende à environ 0,1-0,007 i.e. après 4 lavages. Puis, 4 nouveaux lavages à D₂O d'une heure sont réalisés. Ces 4 lavages plus le culot sont mis sous dialyse en utilisant des tubes MWCO 3500 contre l'eau à 4°C O.N. Ils sont ensuite lyophilisés pendant 8 heures minimum.

I.2 Isolation de la protéine amyloïde

Le lyophilisat est pesé puis suspendu dans du tampon guanidine hydrochloride 6-8 M, 0,5 M Tris (pH8,2-8,3) avec 1 mg/mL d'EDTA (Benson *et al.*, 2009)¹⁴⁵. La solution finale doit être à 100 mg protéine/mL de guanidine hydrochloride. Ensuite, il est réduit sous agitation pendant quelques jours avec 10 mg/mL de dithiotréitol à T.A, alkylé par l'acide iodoacétique et vortexé pendant 30 min. 25 µL de β-mercaptoéthanol sont ajoutés et le mélange est vortexé. Le matériel insoluble est enlevé par une centrifugation à 12000 RPM à 4°C pendant 1 h. Le culot est retiré, et le surnageant est fractionné par chromatographie sur une colonne CL-6B. La phase mobile est constituée de Guanidine 4M et de Tris 0,05M. Environ 150 mL sont collectés en fraction de 2-3 mL. La DO est lue toutes les 5 fractions jusqu'à ce que la DO augmente. Puis toutes les autres fractions sont lues. Les fractions sont poolées selon la DO. 4 pools sont créés.

I.3 Caractérisation de la protéine amyloïde : identification de la protéine impliquée dans l'amylose

I.3.1 SDS-PAGE

Les pools sont en premier lyophilisés. 20 µL d'une solution de β-mercaptoéthanol à 2% dans du PBS 10 X sont ajoutés aux échantillons lyophilisés. Ils sont ensuite chauffés pendant 10 min puis centrifugés succinctement. Une analyse par SDS-PAGE par la procédure de Laemmli (Liepnies *et al.*, 1995)¹⁴⁷ est réalisée. L'électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium) est une technique consistant à faire migrer des protéines dans un gel, sous l'influence d'un champ électrique, permettant

ainsi leur séparation. Comme toute technique électrophorétique, la SDS-PAGE permet la séparation des particules se fait en fonction de leur charge électrique et pour des charges identiques, en fonction de leur taille.

Dans le cas de la SDS-PAGE, la séparation est réalisée en conditions dénaturantes en raison de l'ajout de SDS (dodécylsulfate de sodium) : le SDS est un détergent fort possédant une longue queue hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. Il interagit avec les protéines par sa portion hydrocarbonée en liant leurs régions hydrophobes. En se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative.

La structure native de la protéine est donc dénaturée, et une charge apparente négative est alors conférée à la protéine.

En présence de SDS, les protéines auront donc toutes une charge apparente négative, elles migreront donc toutes vers l'anode. Cela signifie que seul le poids moléculaire des protéines sera le facteur de leur séparation. Les protéines ayant un petit poids moléculaire, seront moins retenues dans les pores du gel de polyacrylamide et migreront donc plus loin que les grosses.

Les 20 μL de chaque pool et 10 μL de marqueur de poids moléculaires sont injectés dans chaque puits. La migration est obtenue après 2h.

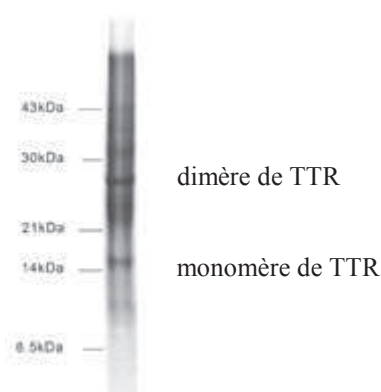


Fig.32. Gel de SDS-PAGE de la sTTR

1.3.2 Transfert sur membrane PVDF

Le transfert ou Western Blot est une technique permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique.

Le transfert sur membrane PVDF/ProBlott a été réalisé grâce au système Applied Biosystems (Benson *et al.*, 2009)¹⁴⁵.

Le gel obtenu par SDS-PAGE est trempé dans du méthanol 100 % pendant quelques sec puis immergé dans du tampon de transfert froid pendant au minimum 5 min. Le tampon de transfert est obtenu à partir de 3 g de Tris, 14,4 g de glycine, 100 mL de méthanol 100 % et H₂O. Un « sandwich » composé d'une éponge, de papier Whatman, du gel, de la membrane PVDF, de papier Whatman et d'une éponge est construit dans le tampon de transfert et inséré dans l'appareil. Le transfert se fait pendant 1 h à 80V. La membrane est ensuite immédiatement lavée avec H₂O, puis avec 100 % de méthanol pendant quelques sec. Elle est colorée par une solution de Bleu de Coomassie (0.5 g de Bleu de Coomassie R-250 et 200 mL de méthanol) pendant 1 min sous agitation douce. 5 mL d'acide acétique sont ajoutés et le tout est vortexé pendant 30 min. L'apparition de la bande correspondant à la protéine est obtenue 1 min après filtration à travers le papier Whatman.

1.3.3 Détermination de la séquence peptidique

1.3.3.1 Préparation à la dégradation d'Edman

La séquence en acides aminés est déterminée par la dégradation d'Edman. Le lyophilisat est suspendu dans de l'acide acétique 10% et environ 3 à 5 % est utilisé pour la dégradation d'Edman. L'échantillon est alors digéré par la trypsine dans 0,1M d'ammonium bicarbonate et les peptides résultant sont fractionnés par chromatographie en phase inverse sur une colonne Beckman Ultrasphère ODS. Les pics isolés sont alors soumis et analysés par la dégradation d'Edman.

1.3.3.2 Dégradation d'Edman

L'appareil utilisé pour la dégradation d'Edman est le modèle Applied Biosystems model. Dans la dégradation d'Edman, le phénylisothiocyanate (PITC) réagit avec la fonction amine N-terminale pour donner un complexe qui, après action d'un acide dans des conditions douces libère une phénylthiohydantoïne et le peptide restant intact (cf. carbamylation). Le grand avantage de la méthode d'Edman est que la chaîne peptidique reste intacte et peut être récupérée et soumise à nouveau au traitement avec le PITC (fig.28) (Edman, 1949)¹⁴⁸.

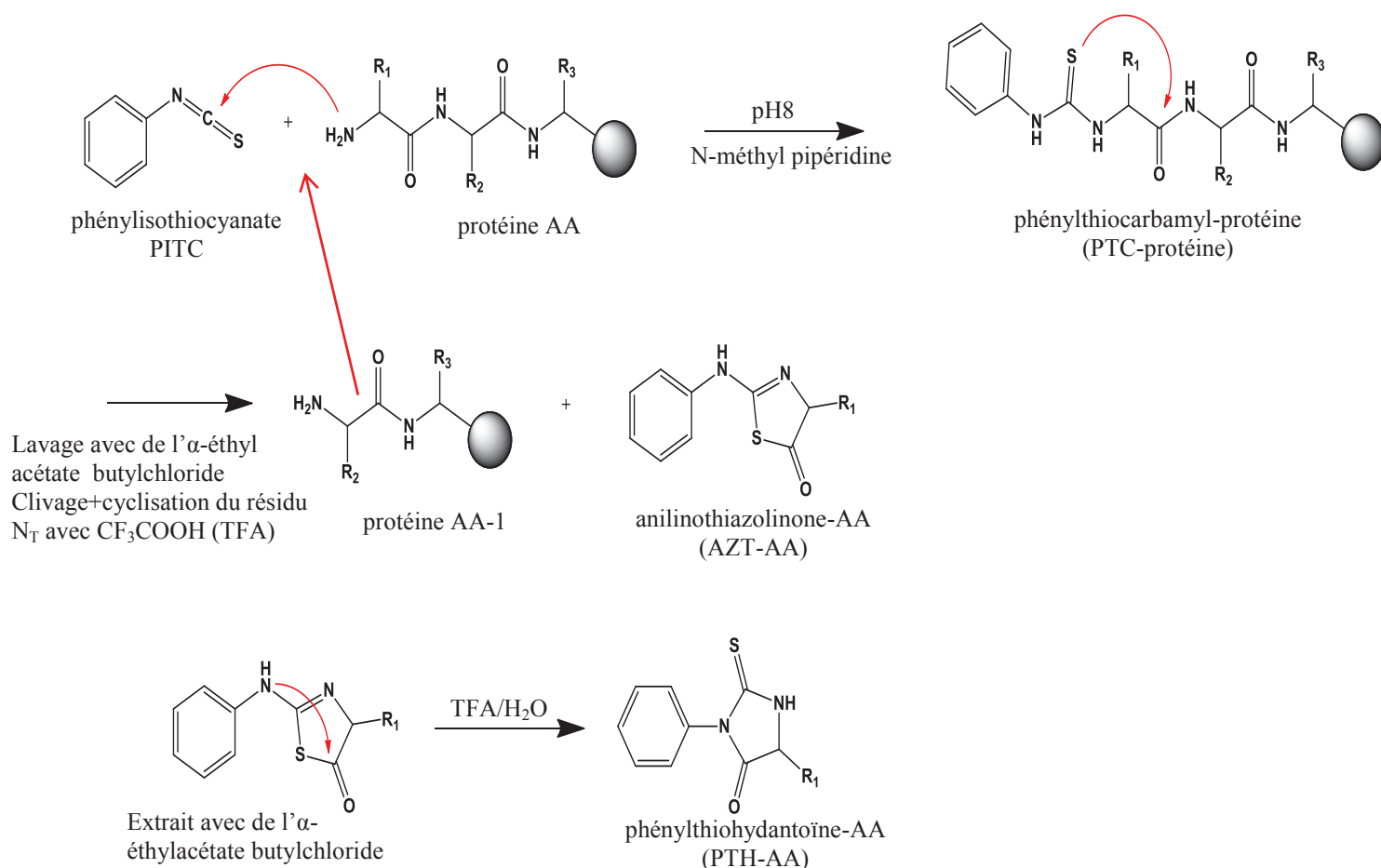


Fig.33. Dégradation d'Edman (AA : acide aminé)

1.3.4 Analyse directe de la séquence d'ADN

- **Isolement de l'ADN génomique**

L'ADN génomique est isolé du patient décédé à l'aide du kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit de chez Promega. 120 µL d'une solution d'EDTA (0.5 M, pH=8) et 500 µL de Nuclei Lysis Solution sont ajoutés à l'échantillon de tissus amyloïde et mis dans un tube puis placé dans de la glace. Environ 0.5 à 1 cm est ensuite mis dans un microtube de centrifugation de 1,5 mL. 600 µL de la même solution d'EDTA/ Nuclei Lysis Solution sont ensuite ajoutés. Puis 17,5µL d'une solution à 20mg/mL de protéinase K est ajoutée et le tout est mis à incubation toute la nuit à 55°C sous agitation douce. Après, 200 µL de la solution Protein Precipitation Solution sont ajoutés à température ambiante (T.A) et l'ensemble est vortexé pendant 20 sec sous agitation forte, puis mis dans la glace pendant 5 min. Une

centrifugation est effectuée à 13000-16000 g pendant 4 min. Le culot forme alors un précipité blanc épais. Le surnageant contenant l'ADN est gardé, transféré dans un tube de 1,5 mL avec 600 µL d'une solution d'isopropanol à T.A et centrifugé pendant une minute à 13000-16000 g à T.A. L'ADN forme alors le culot blanc visible qui est mélangé à nouveau avec de l'éthanol 70 % à T.A pour laver l'ADN. Une nouvelle centrifugation est réalisée pendant une min à 13000-16000 g à T.A. L'éthanol est ôté par une pipette Pasteur, et le culot est séché pendant 10 à 15 min. 100 µL de la solution DNA Rehydration Solution sont ajoutés et l'ADN est réhydraté par incubation à 65°C pendant une heure.

- **Analyse de la séquence d'ADN**

Les exons 2, 3 et 4 de la TTR sont amplifiés en utilisant les primers présents dans le tableau.5. Une réaction de PCR est réalisée en utilisant un volume total de 50 µL : 10 fois le tampon de PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH=8,3, 25 mM de MgCl₂) + 1 µL de 10 mM dNTP mix + 0,25 µM de chaque primer, une unité de Hot Master Taq Polymerase (Eppendorf Hambour Germany) + 2 µL d'ADN. La réaction d'amplification est réalisée avec comme amplificateur le Peltier Thermal Cycler PTC-100 (Bio-Rad, hercules, CA USA) pendant 30 cycles consistant en une dénaturation à 94°C pendant une min, une hybridation des amorces à 58°C pendant une minute pour les exons 3 et 4, l'hybridation de l'exon 2 est faite à 52°C, et une élongation à 72°C pendant une minute. Les produits d'amplification sont ensuite purifiés par le kit Qiaquick Gel extraction Kit (Qiagen, Valencia, USA) et soumis à une amplification asymétrique en utilisant le kit DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, Fullerton, USA). Les produits sont analysés par le CEQ 8000 GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, USA)

Tableau.5. Primers utilisés pour le séquençage de la TTR. Toutes les séquences sont données dans le sens 5' → 3' (Benson et al., 2009)¹⁴⁵

Primer	Sequence	Taille (pb)
E2-FL (5')	AGA TTT CTA ATA CCA CAA AG	306
E2-RL (3')	ATT CTT TAG CAG ATG ATG TG	
E3-FL (5')	GGT GTA TTA CTT TGC CAT G	276
E3-RL (3')	ACT GTC CAT TTC CTG GAA TG	
E4-FL (5')	ACT TCC GGT GGT CAG TCA TG	280
E4-RL (3')	GGT GAA AAC ACT GCT TTA GTA	

II Fonctionnalisation de la transthyrétine par les nanotubes de carbone (NTCs)

La fonctionnalisation de la wtTTR par les nanotubes de carbone a été réalisée à partir de la méthode décrite par Chen *et al* pour fonctionnaliser des biomolécules avec des SWNT (Chen *et al.*, 2001)¹⁴⁹ avec l'aide du laboratoire de chimie thérapeutique (Dr. Marc Pudlo). Cette méthode présente une fonctionnalisation covalente des NTCs.

Pour fonctionnaliser 7,3 mg de wtTTR, 26 mg de SWNT ont été incubés au préalable en présence de 3 fois plus du pyrène succinimide (79 mg) dans 7 mL de diméthylformamide (DMF). Le mélange a ensuite été soniqué pendant 1h à RT, puis lavé 3 fois dans du DMF pour enlever l'excès de réactif, filtrés avec des filtres Saint Gobain* Zitex* PTFE Membrane (Fisher Scientific) obtenir les NTCs. Pour la fonctionnalisation de la wtTTR, les 7,3 mg ont été mis en présence de 2,25 mg de NTCs dans du PBS pH 7.4 0,01 M. Le tout a été mis ensuite soniqué pendant 5 min et mis à incuber pendant 24h. Le mélange obtenu est ensuite stocké sous forme d'aliquots à 4°C.

III Etude chromatographique

III.1 Appareillage

Le système chromatographique utilisé durant toute l'étude comprend une pompe LC-10ATvp de chez Shimadzu (Champs-sur-Marne, France), une valve d'injection Rheodyne 7725 (Cotati, Californie, USA) munie d'une vanne d'éjection de 20 μ L et d'un détecteur Shimadzu UV-Visible.

Les données de rétention des différentes transthyréline et A β sont obtenues grâce à une colonne MODULO-CART HS UPTISPHERE 3 NH₂ Interchim (Montluçon, France) d'une longueur de 50 mm et de diamètre interne 4,6 mm constituée de particules de silice avec une taille de 120 Å et des pores de 12 μ m de diamètre.

III.2 Réactifs et molécules utilisés

La phase mobile assimilée à notre milieu d'étude, est identique dans chaque expérience réalisée. Elle est constituée de :

- Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (Merck, Paris, France) à 0.01 M.
- L'eau CLHP est obtenue grâce au système Elgastat Odil (Talant, France) puis dégazée par sonification

⇒ Le mélange Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ + eau CHLP = PBS

- Sodium azide, nitrate de sodium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France).
- Hipco "P" SWNT P2172 (Unidym, Etats Unis).
- 1-Pyrenebutyric acid N-hydroxysuccinimide ester (Sigma Aldrich, Saint-Quentin, France).
- DMF (Sigma Aldrich, Saint-Quentin, France).
- Filtres Saint Gobain* Zitex* PTFE Membrane (Fisher Scientific, France)

Les molécules utilisées sont

- L'héparane sulfate protéoglycane isolé de la membrane basale de souris Engelbreth-Holm-Swarm (poids moléculaire > 500 kDa) (Sigma Aldrich, Saint-Quentin, France).
- La wtTTR (Sigma Aldrich, Saint-Quentin, France).

- La sTTR (obtenue via la méthode décrite plus haut : C.III.1).
- La A β ₍₁₋₄₀₎ (Abcam, Londres, Angleterre).

III.3 Effet du pH sur les interactions TTR/HSPG et A β /HSPG

Le rôle du pH est crucial dans la formation des dépôts amyloïdes (Foss *et al.*, 2005 ; Lai *et al.*, 1996 ; Valerio *et al.*, 2008)^{152,52,153}, nous avons donc étudié son effet sur la rétention de la sTTR, la wtTTR et l'A β sur l'HSPG.

Le milieu d'étude (phase mobile) est constitué de PBS (0,01 M) et est ajusté à différents pH variant entre 5,5 et 7,4 (5,5, 6,0, 6,5, 7,0 et 7,4) et la colonne HSPG est maintenue à différentes températures allant de 283 à 313 K (283, 288, 293, 298, 303, 308, 313 K). L'élution des protéines se fait à un débit constant de 0,3 mL/min. Pour chaque pH du milieu d'étude et à chaque température de la colonne, 20 μ L d'échantillon à 20 μ M sont injectés successivement dans le système chromatographique et la rétention des molécules étudiées sur l'HSPG représentée par le facteur de rétention k' (k'_{TTR} et $k'_{A\beta}$) est déterminée. A chaque condition étudiée, le nitrate de sodium est injecté pour déterminer le temps mort Eq (3).

Pour les interactions entre TTR ou A β avec l'HSPG, quand le pH du milieu varie, l'équation de conservation de masse de chaque espèce qui prend en compte le nombre de H⁺ liés soit à HSPG soit à A β ou TTR et au complexe A β /HSPG et TTR/HSPG est de la forme :

$$HSPG(H^+)_A + A\beta(H^+)_B + n_H^+ \rightleftharpoons HSPG/A\beta(H^+)_C \quad (16)$$

La courbe de $\log k'$ versus pH est une parabole qui a pour équation :

$$\log k' = \lambda_2 pH^2 + \lambda_1 pH + \log k'_0 \quad (17)$$

III. 4 Effet de la TTR sur l'interaction A β /HSPG

La TTR séquestrerait l'A β (Schwarzman *et al.*, 1994 ; Buxbaum *et al.*, 2008, Costa *et al.*, 2008)^{6,106,107}. Nous avons étudié son effet sur l'association A β /HSPG.

La phase mobile et le débit de la phase mobile sont les mêmes que ceux utilisés dans l'étude du pH (cf. § III.3.2). L'effet de la TTR sur la rétention (i.e., $k'_{A\beta}$) de A β sur HSPG est étudié en incubant dans la solution d'A β à 20 μ M des concentrations de TTR variant entre 0,0 à 15

μM (0, 2, 5, 10, 15 μM). La température de la colonne est comprise entre 283 et 313 K. 20 μL de ces préparations TTR-A β sont injectés et la rétention de A β est déterminée.

EXPERIMENTATION

I Comparaison entre deux formes de transthyréline (une sénile, une sauvage) sur la liaison à l'héparane sulfate protéoglycane

La première série d'expériences a consisté à étudier et comparer la liaison entre l'HSPG et deux formes de TTR pour comprendre le mécanisme d'association impliqué. Pour cela, deux formes de TTR ont été utilisées: une forme sauvage (wtTTR) et une forme sénile (sTTR) extraite d'un patient décédé d'une insuffisance cardiaque suite à une amylose sénile à la TTR (voir paragraphe C.I.1). Dans un premier temps, comme il n'existe pas, de phases stationnaires greffées avec de l'HSPG (des phases stationnaires existent avec de l'héparine greffée), nous avons greffé une colonne de silice-NH₂ avec de L'HSPG via une méthode « *in situ* ». L'HSPG a été greffé via la méthode d'immobilisation décrite au chapitre C.III.3.1, les conditions opératoires ont été réalisées selon le protocole décrit C.III.3.2.

I.1 Conditions opératoires

Les injections ont été répétées au minimum trois fois et la détection des molécules étudiées à la sortie des colonnes est réalisée à une longueur d'onde de 214 nm.

I.1 Fixation de l'HSPG sur la silice-NH₂ par la méthode « in situ »

Comme il n'existe pas de colonne commerciale, ceci nous a conduits à mettre au point une nouvelle colonne chromatographique constituée de particules de silice sur lesquelles est greffé de l'HSPG.

Les techniques d'immobilisation peuvent se faire de deux façons différentes : soit (i) de manière « *in situ* » soit (ii) de manière « *in-batch* » (Girelli & Mattei, 2005)¹⁵⁰

L'immobilisation « *in-situ* » consiste à utiliser directement une colonne contenant déjà le support chromatographique constitué de particules de silice propylamine, puis ensuite de faire circuler la protéine d'intérêt (Girelli & Mattei, 2005)¹⁵⁰

L'immobilisation « *in-situ* » de l'HSPG est effectuée sur des particules de silice propylamine (particules de silice greffées avec des groupements NH₂). L'HSPG est immobilisée à partir de son groupement amine présent sur la partie protéique sur des particules de silice propylamine activée par le glutaraldéhyde par la méthode de la Base de Schiff. L'immobilisation covalente est réalisée tel le protocole suivant. La colonne NH₂ est d'abord lavée avec du tampon PBS pH 6,5 pendant 30 min à débit 0,5 mL/min. La phase stationnaire est activée continuellement avec une solution de 10% de glutaraldéhyde dans du PBS pH 6,5 pendant 10 h au même débit en circuit fermé. Ensuite la colonne est lavée dans du PBS 0,01M pH 6,5 pendant 1 h. 200 µg d'HSPG sont dissous dans 20 mL de tampon phosphate (1 mM ; pH = 7,4) et la solution obtenue est circulée de façon continue à faible débit (0,3 mL/min) dans la colonne. Après 24 h d'immobilisation minimum, la colonne est lavée avec du PBS (0,01 mM ; pH = 7,4) pendant une h, puis les bases de Schiff sont réduites par une solution de 100 mL de cyanoborohydrure à 0,1 M dans du PBS (0,01 M pH 7,4) pendant 5 h. La colonne est de nouveau lavée avec du PBS (0,01 M pH 7,4) pendant 30 min et une solution de 0,2 M d'éthanolamine est utilisée pendant 3 h pour désactiver les groupements aldéhydes. Pour finir, la colonne est lavée au PBS (pH 7,4 0,01 M) pendant 1h et 0,1 % de sodium azide est mis en circulation pendant une h pour la conservation de la colonne.

Les réactions chimiques qui se produisent tout au long du greffage de l'HSPG sur les particules de silice propylamine sont détaillées dans la figure ci-dessous (fig.33) :

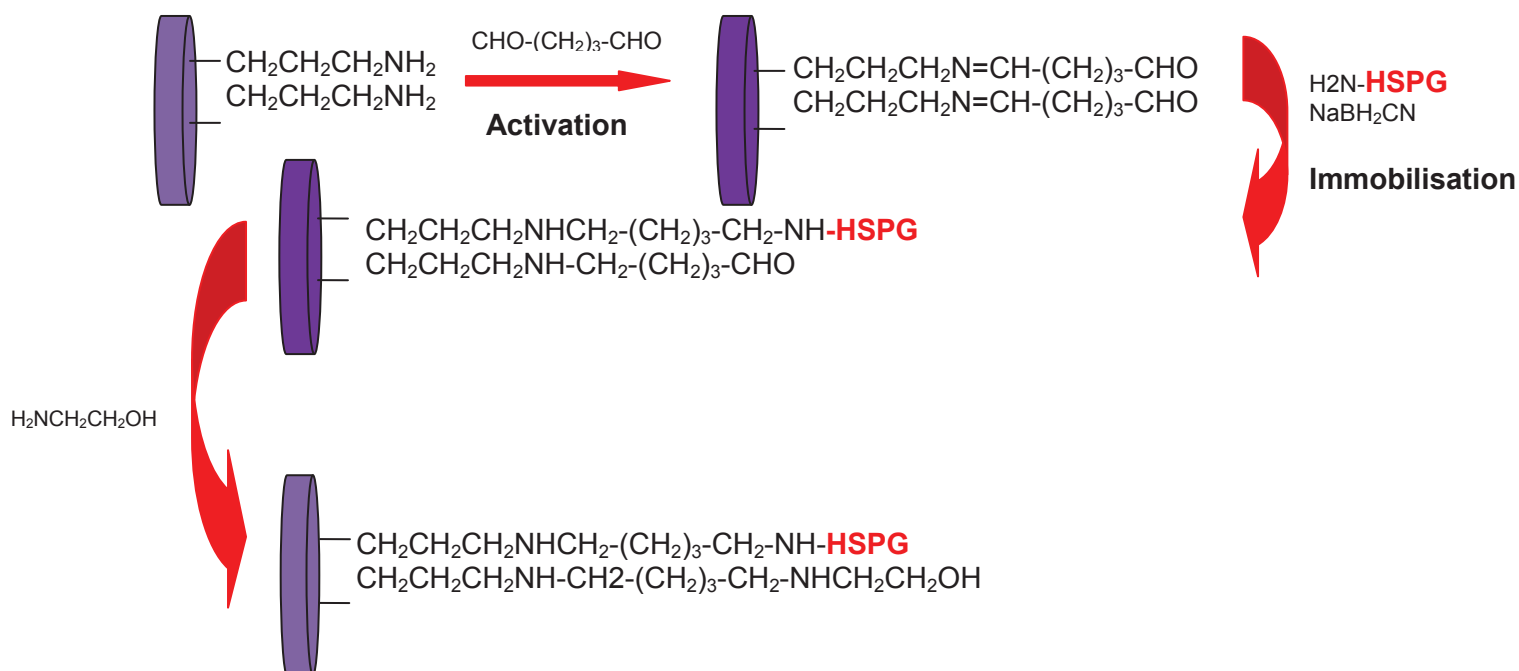


Fig.34. Immobilisation de l'HSPG sur les particules de silice activées par des groupements aminopropyle suivant notre technique (Ibrahim et al., 2009)¹⁵¹

1.2 Stabilité de la colonne

Pour évaluer la stabilité de la colonne, trois colonnes avec de l'HSPG greffé ont été préparées dans les mêmes conditions comme décrites ci-dessus (§ C.III.3.1) : les facteurs de rétention à $\text{pH} = 7,4$ (déviations standards égales à 0,024 pour wtTTR et 0,027 pour sTTR) ont été obtenus avec wtTTR (0,143) et sTTR (1,106). La phase mobile est constituée de PBS 0,01 M, le flux est de 0,3 mL/min et la température de la colonne est de 308 K.

De même, la bonne reproductibilité de cette colonne est observée par la mesure de la déviation standard relative du temps de rétention est $< 0,5\%$. Après près de six mois et plus de 300 injections, la diminution des valeurs des temps de rétention de la colonne est $< 1,2\%$.

La fig. 35 représente les chromatogrammes en début et en fin d'utilisation de la colonne.

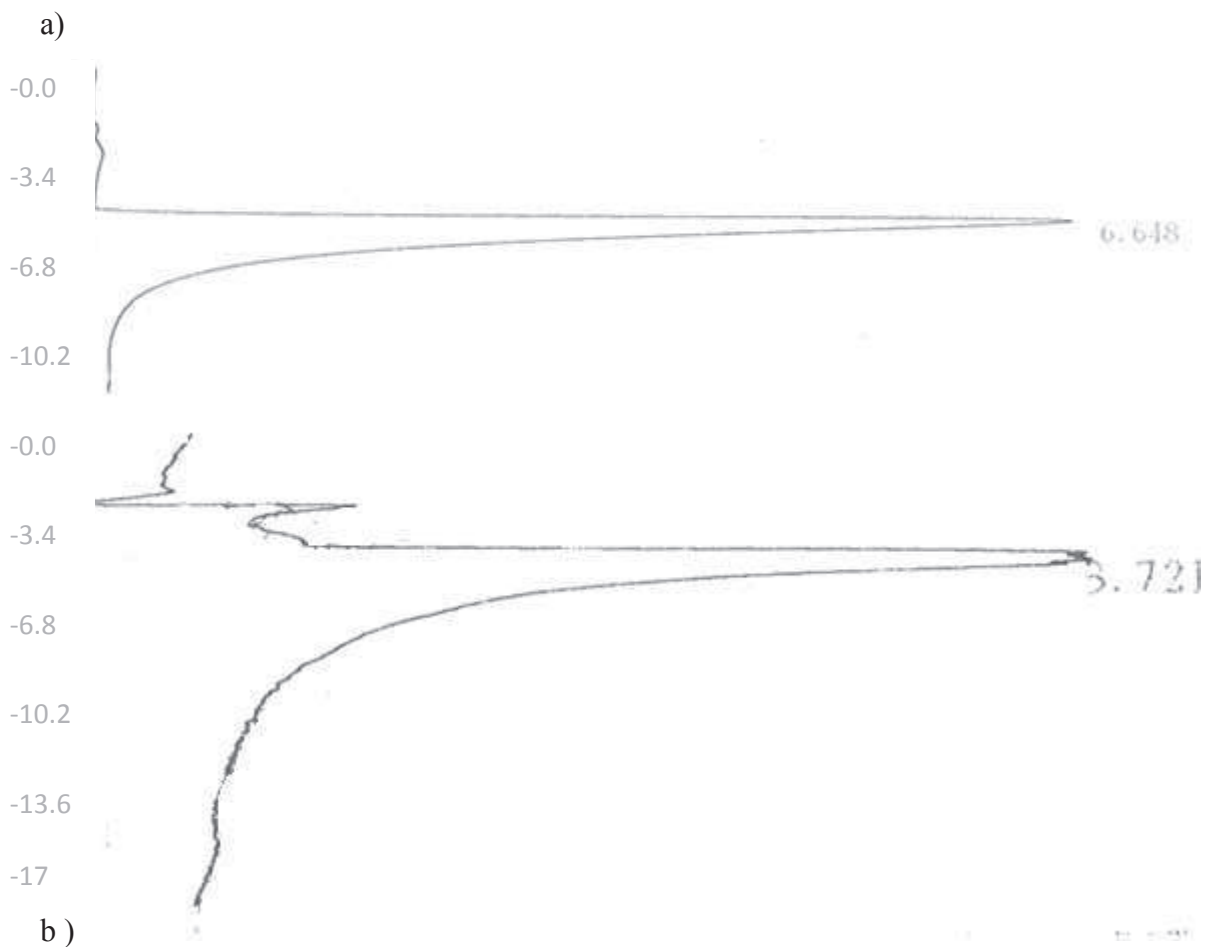


Fig. 35. Chromatogrammes de la sTTR a) pH=7 et T=25°C en début d'utilisation de la colonne b) pH=5,5 et T=35°C en fin d'utilisation de la colonne.

La masse totale de protéine immobilisée dans la colonne est déterminée à partir de quatre fractions de la phase stationnaire par analyse élémentaire. Elle est de 192 µg d'HSPG. La différence maximum relative de la quantité de protéine immobilisée entre ces différentes mesures ne dépasse pas 0,5% prouvant une distribution homogène de l'HSPG sur le support chromatographique.

I.2 Association de TTR (wtTTR et sTTR) avec l'HSPG à pH=7,4

En conditions physiologiques, la wtTTR peut se lier à l'HSPG mais se dissocie très facilement. Dans les amyloses séniles, la sTTR se retrouve dans les dépôts amyloïdes et est indissociable. Afin de déterminer les processus d'association TTR/HSPG, une comparaison a

été effectuée entre la sTTR et la wtTTR par biochromatographie avec notre colonne greffée avec l'HSPG.

A 25°C, pour les deux formes de TTR, les temps de rétention ont été répétés au moins trois fois (déviations < 2%) et la valeur correspondante des variations des facteurs de rétention k' sont < 5% (Eq.3), indiquant à la fois une reproductibilité et une stabilité très satisfaisante pour sTTR et wtTTR du système opératoire.

La fig.36 représente le chromatogramme de la wtTTR ainsi que celui de la sTTR à pH7,4 et T=25°C.

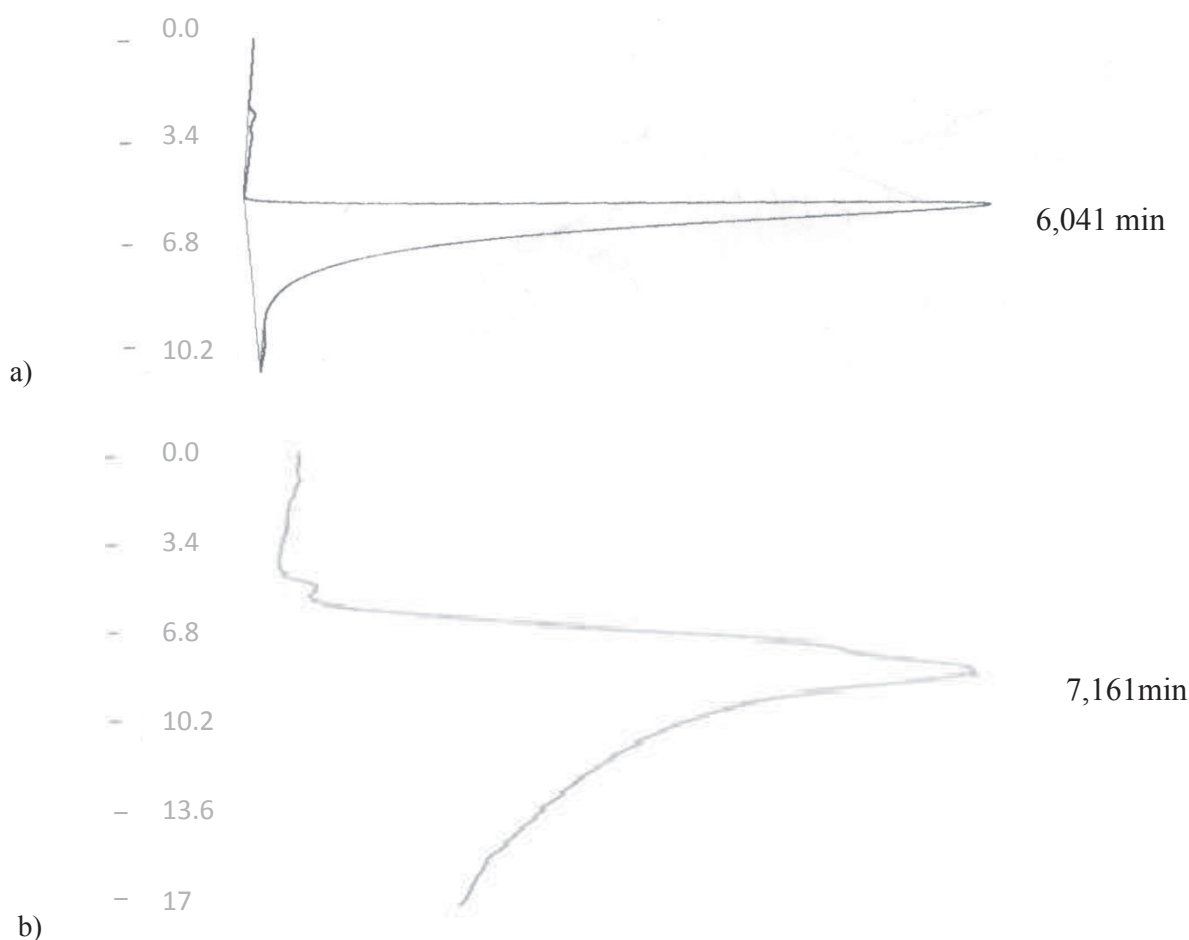


Fig.36. Chromatogrammes de TTR à pH=7,4 et T=25°C a) wtTTR b) sTTR

La fig.36 montre qu'à pH=7,4, la sTTR se fixe plus fortement que la wtTTR avec un temps de rétention plus long que la wtTTR ($t_{sTTR} = 7,161$ min, $t_{wtTTR} = 6,041$). Ceci peut être expliqué par la conformation qu'adopte la wtTTR ainsi que la sTTR en solution.

En effet :

- La wtTTR reste sous forme tétramérique.

➤ La sTTR doit être sous forme monomérique partiellement dénaturée. La concentration de guanidine HCl utilisée pour extraire les fibrilles (6-8 M) (Lai *et al.*, 1997)¹⁵⁴ permet de dissocier le tétramère de TTR en monomères et de dénaturer les monomères. Cependant, Lai *et al* (Lai *et al.*, 1997)¹⁵⁴ ont montré que lorsque la concentration en Guanidine-HCl diminuait, la réaction inverse pour reformer le tétramère était possible mais pas dans les mêmes conditions. Jesus *et al* (Jesus *et al.*, 2012)¹⁰⁴ ont réalisés des mesures de cinétiques de repliement de la TTR et leurs résultats montrent que la TTR était capable de retrouver une structure quaternaire en tétramère après au moins 12 h dans un tampon spécifique. Dans notre cas, nous avons directement lyophilisé la solution. De plus, d'après Wiseman *et al* (Wiseman *et al.*, 2008)¹⁵⁵, le partage d'une protéine entre l'agrégation et le réassemblage dépend de trois paramètres :

- La concentration relative en monomères normalement repliés et la concentration en intermédiaires amyloïdogènes.
- Les constantes relatives des taux des processus de réassemblage et d'agrégation.
- Les concentrations relatives en agrégats de TTR solubles.

Le mécanisme menant au réassemblage est dépendant et initié par la présence de monomères correctement repliés. Notre solution provenant d'une solution de fibrilles amyloïdes a été réduite et alkylée, elle ne contient donc pas de monomères de TTR natifs. Donc, la protéine est restée sous forme dénaturée. Cependant, nous l'avons ensuite mise dans du PBS donc un léger repliement peut être possible (Lai *et al.*, 1997 ; Jesus *et al.*, 2012)^{154,156}.

Pour aller plus loin, nous avons étudié les paramètres thermodynamiques de l'association TTR/HSPG.

Les expériences ont été réalisées à des températures allant de 10°C à 40°C pour accéder aux valeurs thermodynamiques.

Dans le domaine de températures étudiées, les courbes de van't Hoff ($\ln k'$ en fonction de $1/T$, Eq.12) sont tracées pour chaque valeur de pH. La fig.37 représente les courbes de van't Hoff pour la wtTTR et la sTTR.

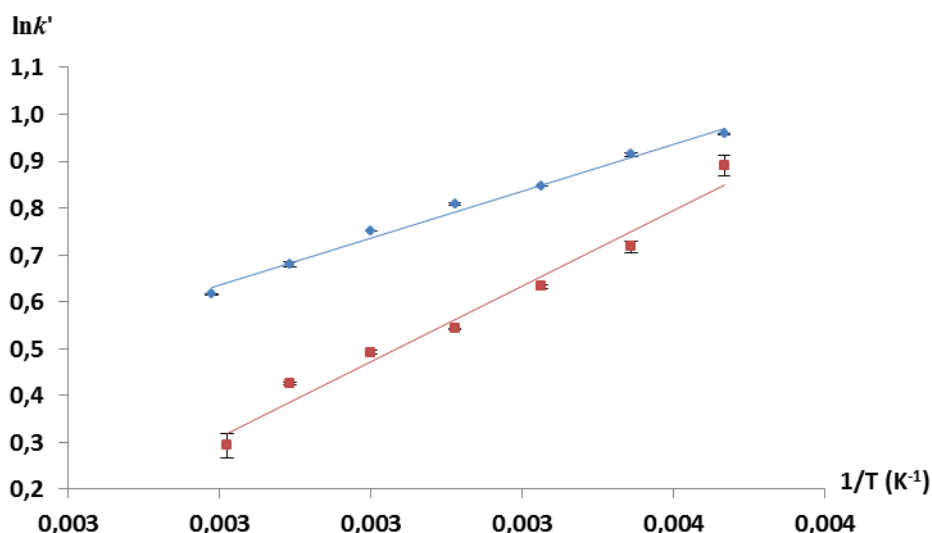


Fig.37. Courbe de Van't Hoff de la TTR (■:wtTTR, ●:sTTR)

Les coefficients de corrélation des droites sont supérieurs à 0,98.

L'allure de ces courbes montrent que les courbes sont linéaires ce qui signifie que les mécanismes d'association de wtTTR et de la sTTR avec l'HSPG sont indépendants de la température.

A partir des droites obtenues, il est alors possible d'accéder aux paramètres thermodynamiques (ΔH° and $\Delta S^{\circ*}$) du mécanisme d'association de la sTTR et de la wtTTR (calculés à l'aide de l'Eq.11 et de la courbe de Van't Hoff $\ln k'$ fonction de $1/T$) qui sont donnés dans le tableau ci-dessous (tableau.6).

Tableau.6. Paramètres thermodynamiques de l'association de sTTR et de wtTTR à l'HSPG à $pH=7,4$ (ΔH° (kJ.mol⁻¹), $\Delta S^{\circ*}$ (pas d'unités)). Les écarts-type sont entre parenthèses.

	sTTR	wtTTR
ΔH°	-10,13 (0,05)	-13,48 (0,09)
$\Delta S^{\circ*}$	-2,80 (0,04)	-5,10 (0,04)

Les résultats montrent que les valeurs de ΔH° and $\Delta S^{\circ*}$ sont toujours négatives :

Ces résultats mettent en évidence un mécanisme d'association contrôlé par l'enthalpie ce qui implique que les principales interactions impliquées sont de type van der Waals et

hydrogène (De Paz & Seeberger, 2008)¹⁵⁷. Ce type d'interactions peuvent provenir des atomes de soufre ou d'oxygène qui créent alors des liaisons de van der Waals avec les acides aminés aromatiques (histidine, phénylalanine ...) de la TTR tels qu'il est reporté dans de nombreux exemples (Borza & Morgan, 1998)¹⁵⁸. De même, la TTR contient un résidu asparagine qui peut former une liaison hydrogène via son atome d'hydrogène présent sur l'amide de sa chaîne latérale avec le groupement carboxylique de l'acide iduronique de la partie GAG de l'HSPG. Par ailleurs, il a été également démontré que la formation de complexes entre des polyélectrolytes faiblement chargés et des protéines diminuait le rôle de l'entropie et était ainsi contrôlée par l'enthalpie due aux attractions électrostatiques (Bouchemal *et al.*, 2008)¹⁵⁹. Thompson *et al* (Thompson *et al.*, 1994)¹⁶⁰ reportent aussi que seulement 30 % de l'énergie libre de la liaison entre le FGF2 et l'héparine serait due à des interactions électrostatiques pures ce qui signifie que les autres interactions non ioniques telles que les interactions hydrogènes et de van der Waals seraient responsables de la plus grosse partie de l'énergie de cette interaction FGF2/héparine. Ces résultats montrent que la wtTTR ainsi que la sTTR interagissent avec l'HSPG principalement par des liaisons de van der Waals et hydrogène quel que soit le pH. En effet, pour dissocier et dénaturer la wtTTR un pH très acide est nécessaire (Lai *et al.*, 1996)⁵², dans les conditions physiologiques, la wtTTR reste toujours sous forme tétramérique et peut interagir avec l'HSPG lorsqu'elle se trouve dans la circulation sanguine.

Les 2 TTR ont une affinité forte avec l'HSPG. Cependant les valeurs thermodynamiques de la wtTTR sont légèrement inférieures à celles de la sTTR tentant de montrer que des interactions hydrophobes sont plus importantes dans l'association sTTR/HSPG que dans celle wtTTR/HSPG.

En conditions biologiques, la wtTTR est un des ligands de l'HSPG. Dans les amyloses séniles, la sTTR interagit avec l'HSPG mais reste fixée. Nos résultats montrent qu'à pH 7,4 des interactions hydrophobes interviennent en plus dans la liaison sTTR/HSPG ce qui expliquera pourquoi la wtTTR se fixe moins bien que la sTTR à l'HSPG en conditions biologiques du fait de la forme de la sTTR comparée à la forme tétramérique de la wtTTR (Noborn *et al.*, 2011)¹⁶¹.

I.3 Effet du pH sur la fixation des 2 TTR sur l'HSPG

Les expériences ont été effectuées à des pH compris entre 5,5 et 7,4 (5,5, 6,0, 6,5, 7,0 et 7,4) et à différentes températures (10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35° et 40°C) afin d'accéder aux paramètres thermodynamiques.

Le pH est un paramètre physico-chimique très important au niveau de l'organisme et la plupart des macromolécules peuvent s'ioniser. Il joue un rôle clé dans le processus de dissociation de la TTR et dans la formation des fibrilles amyloïdes. Il est donc intéressant d'étudier l'effet de ce paramètre sur la liaison de la TTR à l'HSPG.

La figure ci-dessous représente la variation de $\log k'$ en fonction du pH (fig. 38) :

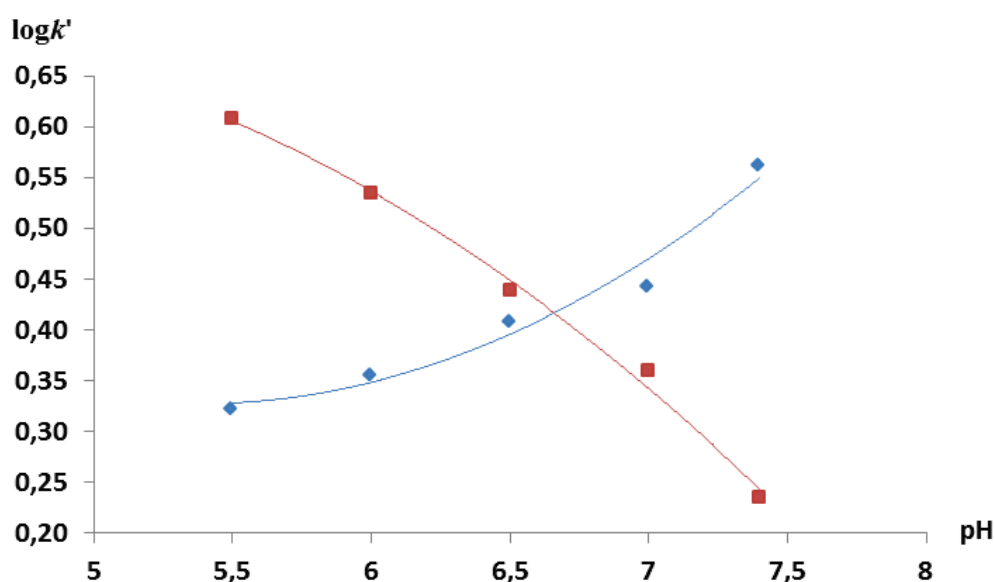


Fig.38. $\log k'$ versus pH pour la sTTR (♦) et la wtTTR (■) à 25°C.

Les droites ont une équation de la forme $\log k' = \log k'_0 + \lambda_1 \text{pH} + \lambda_2 \text{pH}^2$ (Eq. 17)

$$\text{Pour wtTTR : } \log k' = 3.818 - 0.719\text{pH} + 0.028\text{pH}^2 \quad r^2 = 0.999 \quad (23)$$

$$\text{Pour sTTR : } \log k' = 2.909 - 0.905\text{pH} + 0.078\text{pH}^2 \quad r^2 = 0.983 \quad (24)$$

On observe des variations similaires pour toutes les températures étudiées (Eq.17).

Les deux courbes sont différentes ce qui implique des mécanismes différents :

- Pour la wtTTR : k'_{wtTTR} diminue avec le pH. La rétention diminue au fur et à mesure que le pH augmente. La fig. 38 montre les chromatogrammes de la wtTTR à pH=7,4 et pH=5,5 pour T=25°C

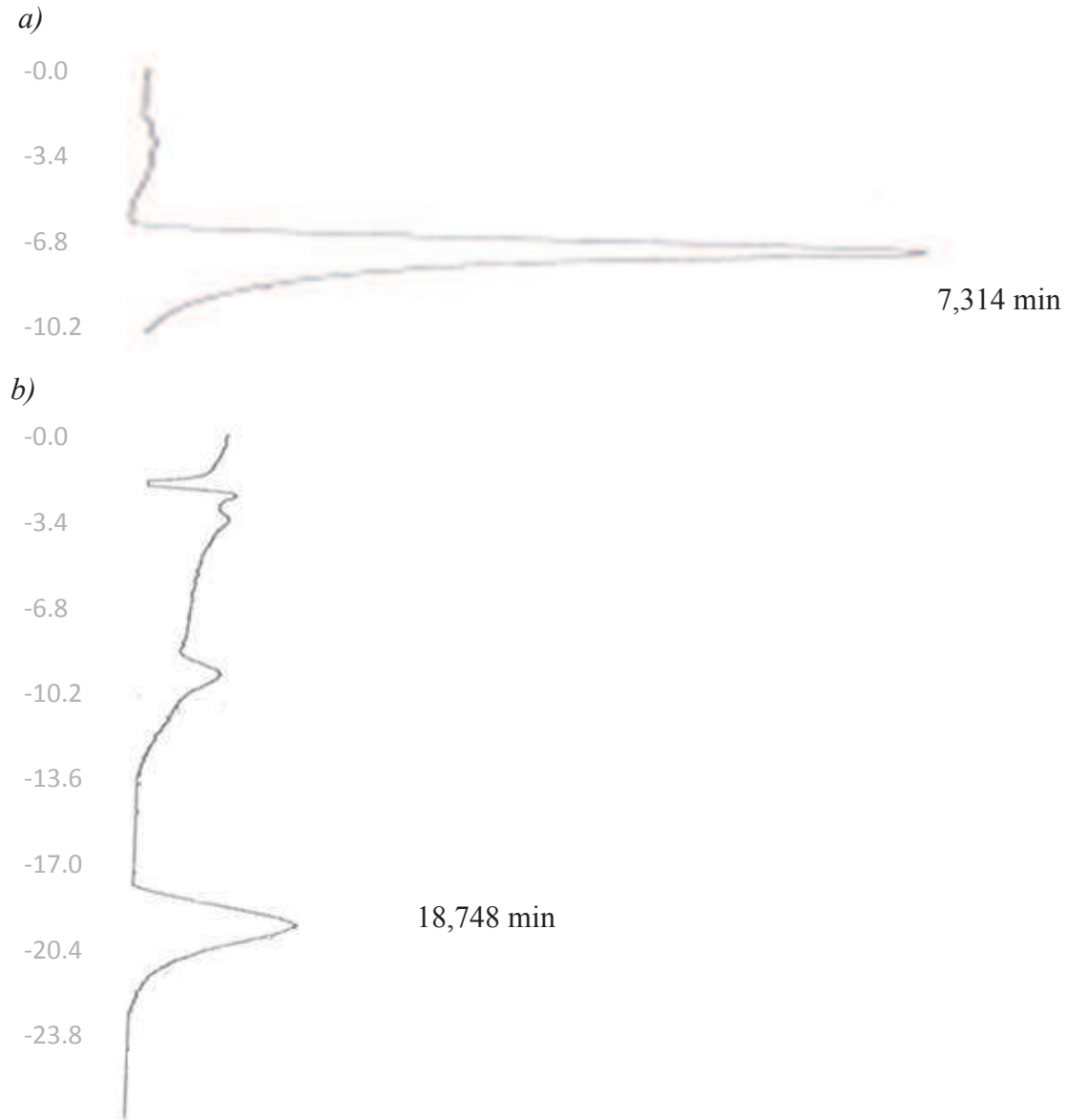


Fig.39. Chromatogrammes de la wtTTR pour a) T=25°C et pH=7 et b) T=20°C et pH=5,5

- Pour la sTTR : k'_{sTTR} augmente avec le pH ($t_{pH7}=7,31$ min et $t_{pH6,5}=9,34$ min). En effet la fig. 40 montre les chromatogrammes de la sTTR à deux pH différents.

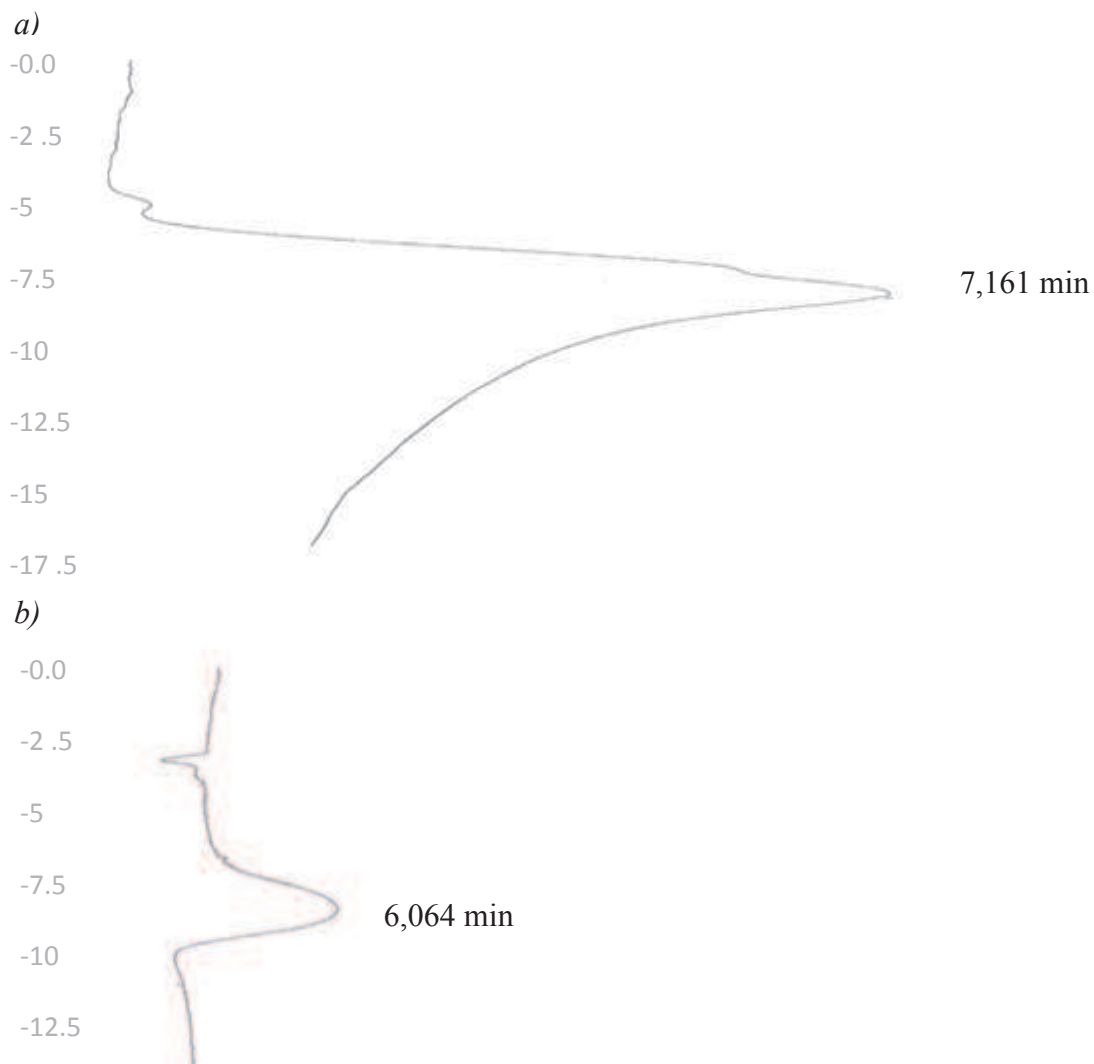


Fig.40. Chromatogrammes de la sTTR à a) pH=7,4 et T=25°C et b) pH=7 et T=25°C.

La forme en ogive des chromatogrammes obtenus pour la sTTR peuvent être expliqués : en effet, en solution nous avons la sTTR qui n'est pas forcément à 100% pure et dans une conformation qui n'est pas qu'en feuillets β . Nous avons donc un milieu qui ressemble beaucoup plus à la réalité pathologique.

Afin d'aller plus en détail dans le mécanisme d'association de ces 2 TTR avec l'HSPG, les valeurs thermodynamiques (Eq.3) ΔH° et ΔS° ont été calculées. Les valeurs sont présentes dans le tableau.7.

Tableau.7. Paramètres thermodynamiques de l'association de sTTR et de wtTTR à l'HSPG. (ΔH° (kJ.mol⁻¹), ΔS° * (pas d'unités)). Les écarts-type sont entre parenthèses.

pH	ΔH° (sTTR)	ΔS° * (sTTR)	ΔH° (wtTTR)	ΔS° * (wtTTR)
5,5	-8,26 (0,06)	-2,65 (0,04)	-9,78 (0,03)	-1,77 (0,01)
6	-8,88 (0,12)	-2,95 (0,31)	-10,41 (0,32)	-2,74 (0,12)
6,5	-12,37 (0,12)	-4,05 (0,04)	-12,27 (0,16)	-3,95 (0,03)
7	-11,21 (0,57)	-3,46 (0,27)	-12,96 (0,43)	-4,57 (0,17)

Le tableau.7 montre :

Pour la wtTTR : quand le pH augmente les valeurs thermodynamiques diminuent tout le temps (exemple : pH 5,5 ΔH° = -9,78 kJ/mol et ΔS° *= -1,77 ; pH7 ΔH° = -12,96 kJ/mol et ΔS° *= -4,57). Donc les interactions de types Van der Waals et hydrogènes sont majoritaires (les interactions de type Van der Waals sont majoritaires car les paramètres thermodynamiques sont négatifs). La diminution de la rétention lorsque le pH augmente (fig.38) est due à une diminution des interactions ioniques qui elles sont caractérisées par des données enthalpiques et entropiques positives. Les interactions électrostatiques diminuent entre le groupement sulfate de l'HSPG et la forme tétramérique de la wtTTR car l'histidine qui a un pKa $\approx$ 6,5 devient quand le pH augmente de moins en moins chargée. De plus pour dissocier et dénaturer la wtTTR un pH très acide est nécessaire (pH<5,1) (Lai *et al.*, 1996)⁵².

Pour la sTTR : on observe un changement du mécanisme de fixation de la sTTR avec l'HSPG pour un pH= 6,5 : Pour un pH<6,5 lorsque le pH diminue les valeurs thermodynamiques augmentent à cause de l'augmentation des interactions ioniques et hydrophobes qui se créent dues à la forme monomérique de la sTTR (Foss *et al.*, 2005)¹⁵². A pH 5,5, nous remarquons que les valeurs de ΔH pour sTTR sont légèrement plus élevées que celles de la wtTTR. Ceci montre bien qu'ils existent plus d'interactions ioniques entre la sTTR et l'HSPG qu'entre la wtTTR et l'HSPG. Les interactions ioniques peuvent venir de la séquence 24-35 (PAINVAVHVFRK) connue en tant que séquence "hot spot" pour les mutations dans les ATTR (Faham *et al.*, 1996)¹⁶². Elle est partiellement enfouie dans la forme native de la TTR et devient accessible dans la sTTR (Liepnieks *et al.*, 1995 ;Lashuel *et al.*, 1998)^{1,147}. Cette séquence contient 3 acides aminés basiques (histidine, arginine et lysine) dont la lysine et l'arginine qui sont quasiment toujours chargées positivement (pKa arginine =

12,48 and pK_a lysine = 10,2). HSPG contient de nombreux groupements COO^- et SO_3^- qui peuvent interagir avec ces acides aminés basiques (Jairajpuri *et al.*, 2003)¹⁶³. De plus, Cardin & Weintraub (Cardin & Weintraub, 1989)¹¹² ont reporté une séquence consensus: XBBXB (X, hydrophatique, B résidus basiques) retrouvée dans de nombreux domaines de liaison protéine/héparine. Cette séquence consensus ressemble à la séquence 24-35.

Pour un $\text{pH} > 6,5$, les valeurs de ΔH et $\Delta S^{\circ*}$ augmentent lorsque le pH augmente (exemple, $\Delta H^{\circ}_{\text{pH}6,5} = -12,37 \text{ kJ/mol}$ $\Delta H^{\circ}_{\text{pH}7,4} = -10,13 \text{ kJ/mol}$; $\Delta S^{\circ*}_{\text{pH}6,5} = -4,05$, $\Delta S^{\circ*}_{\text{pH}7,4} = -2,80$) ainsi que k' . L'augmentation des valeurs thermodynamiques peut être justifiées par des interactions hydrophobes (Ross *et al.*, 1981)¹⁶⁴. Ces interactions hydrophobes peuvent être générées par un résidu valine, qui peut former une interaction hydrophobe avec le groupement N-acétylé de l'HSPG (Faham *et al.*, 1996)¹⁶². De plus dans l'association protéine/ligand, de nombreux contacts entre les groupements non polaires de sTTR et de l'HSPG sont engagés. Ces interactions requièrent leur déshydratation ce qui implique gain d'entropie.

Ainsi, l'augmentation de l'association sTTR/HSPG lorsque le pH augmente est due à une augmentation des interactions hydrophobes. En solution la sTTR est sous forme monomérique partiellement dénaturée à pH acide et passe sous forme β -plissée lorsque le pH devient supérieur à 6,5. En effet Narayanan & Diaz (Narayanan & Diaz, 2013)¹⁶⁵ ont montré que les interactions hydrophobes sont importantes dans la formation de feuillets β .

La fig.41 représente le nombre de protons liés ou éjectés à 298 K pour wtTTR et sTTR calculés à partir de l'Eq.17

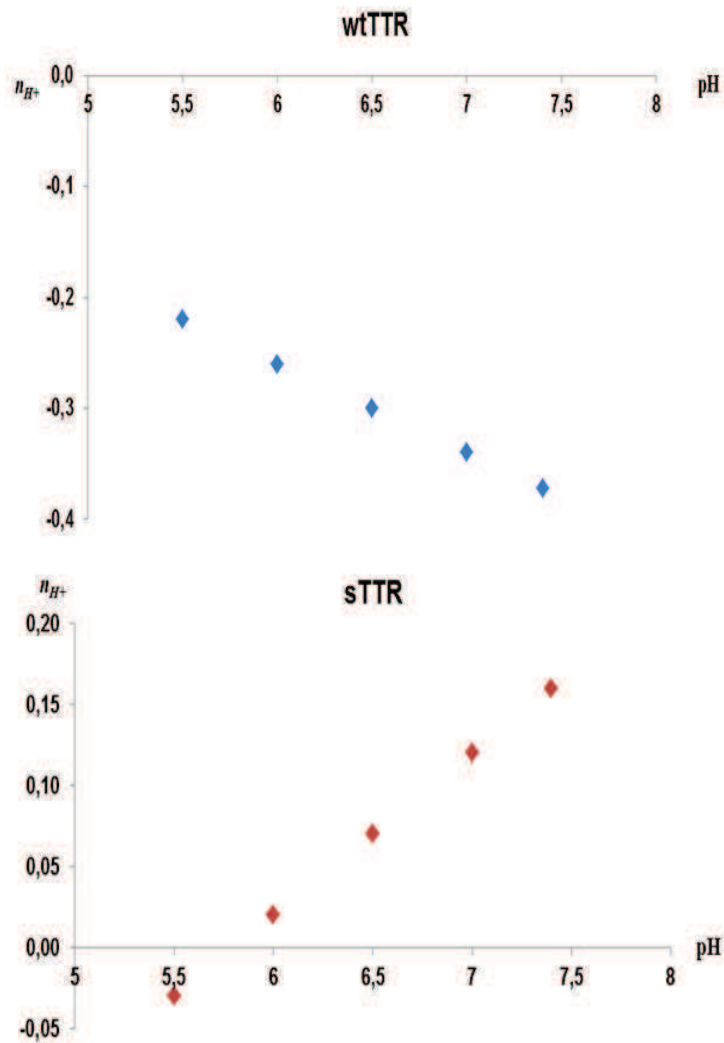


Fig.41. Nombre de protons liés ou éjectés à 298 K pour wtTTR et sTTR.

Les résultats de la fig.41 nous montrent que :

- Le nombre de protons éjectés ou liés pour la wtTTR est négatif.
- Le nombre de protons éjectés ou liés pour la sTTR est négatif en dessous de $\text{pH} \approx 5,5-6$ et devient positif en dessus. Les valeurs de n_{H^+} augmentent avec le pH. A 308K, les valeurs de n_{H^+} values sont égales à zéro à $\text{pH} = 5,81$. Le nombre de protons échangés est négatif ce qui signifie qu'un résidu à la surface d'HSPG ou sur celle de la sTTR a une valeur de son pK_a altérée conséquence de la liaison ou bien du relargage d'un proton. Ces résultats suggèrent que le groupement ionisable affecté peut être le noyau imidazole de l'histidine qui a un pK_a autour de 6 physiologiquement. Ceci corrobore l'hypothèse que la protonation d'un résidu histidine est une étape importante dans l'association sTTR/HSPG (Kisilevsky *et al.*, 2007 ; Ancsin, 2003)²². En effet, Ancsin (Ancsin, 2003)²² et Noborn (Noborn *et al.*, 2011)¹⁶¹ ont mis en évidence l'importance d'un résidu histidine et de sa

protonation dans des séquences consensus de protéines amyloïdes. Par ailleurs, le rôle de la protonation d'un résidu His dans la fixation des protéines amyloïdes aux GAGs a auparavant été décrites pour AIPP (De Carufel et al, 2013)¹⁶⁶, pour la protéine prion (Elimova et al, 2009)¹⁶⁷ ainsi que pour le peptide bêta-amyloïde (Brunden et al, 1993)¹⁶⁸. Cependant bien que la séquence 24-35 joue un rôle prépondérant dans de nombreuses FAP, et contient les acides aminés basiques et une phénylalanine, la sTTR a une structure quaternaire partiellement dénaturée ce qui implique que d'autres acides aminés en dehors de la séquence 24-35 sont impliqués. La fig.42 montre les trois AA basiques retrouvés dans la séquence 24-35 :

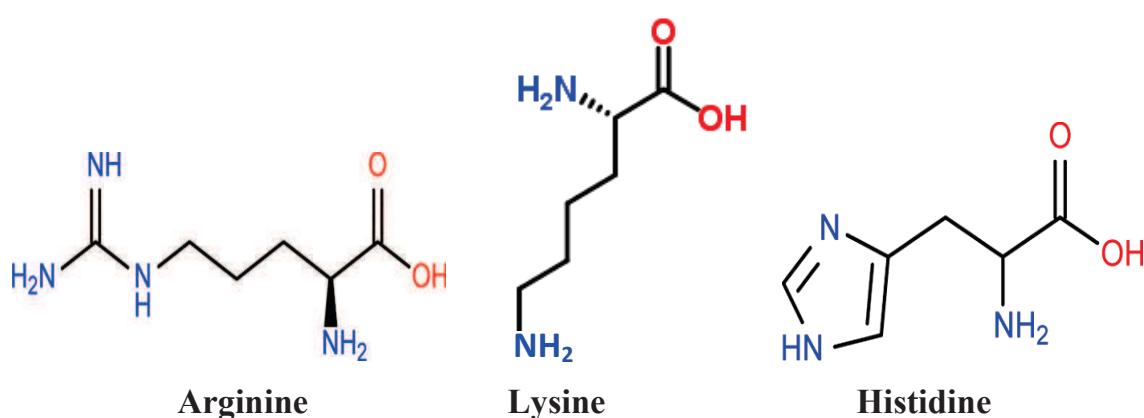


Fig.42. Les trois acides aminés basiques présents dans la séquence 24-35

En effet, Yokohama *et al* (Yokohama *et al.*, 2012)¹⁶⁹ suggère que la double protonation de l'His 88 par acidification casse le réseau de liaison hydrogène et entraîne une déstabilisation du tétramère. De plus, des études ont montré que sTTR est formée d'un feuillet β intermoléculaire créé entre les feuillets A et G conduisant à un changement conformationnel et à la déstabilisation de la structure native du tétramère (Gustavsson *et al.*, 1991)¹⁷⁰. D'après la fig. 43, les feuillets A et G contiennent de nombreux acides aminés hydrophobes (valine, leucine, isoleucine, alanine...) qui peuvent interagir entre eux et créer lorsque le pH est suffisamment acide des interactions hydrophobes.

Feuillet A : P-L-M-V-K-V-L-D-A

Feuillet G : Y-T-I-A-A-L-L-S

Fig.43. Séquence en acides aminés des feuillets A et G. Feuillet A : acides aminés 11 à 19, feuillet G : acides aminés 105 à 112.

Une autre approche thermodynamique pour analyser le processus physico-chimique entre la TTR et l'HSPG est la CEE.

Une courbe de $\ln k'$ (à température égale à 298 K), calculé pour chaque forme de TTR, versus $-\Delta H^\circ$ est réalisée (Fig.44).

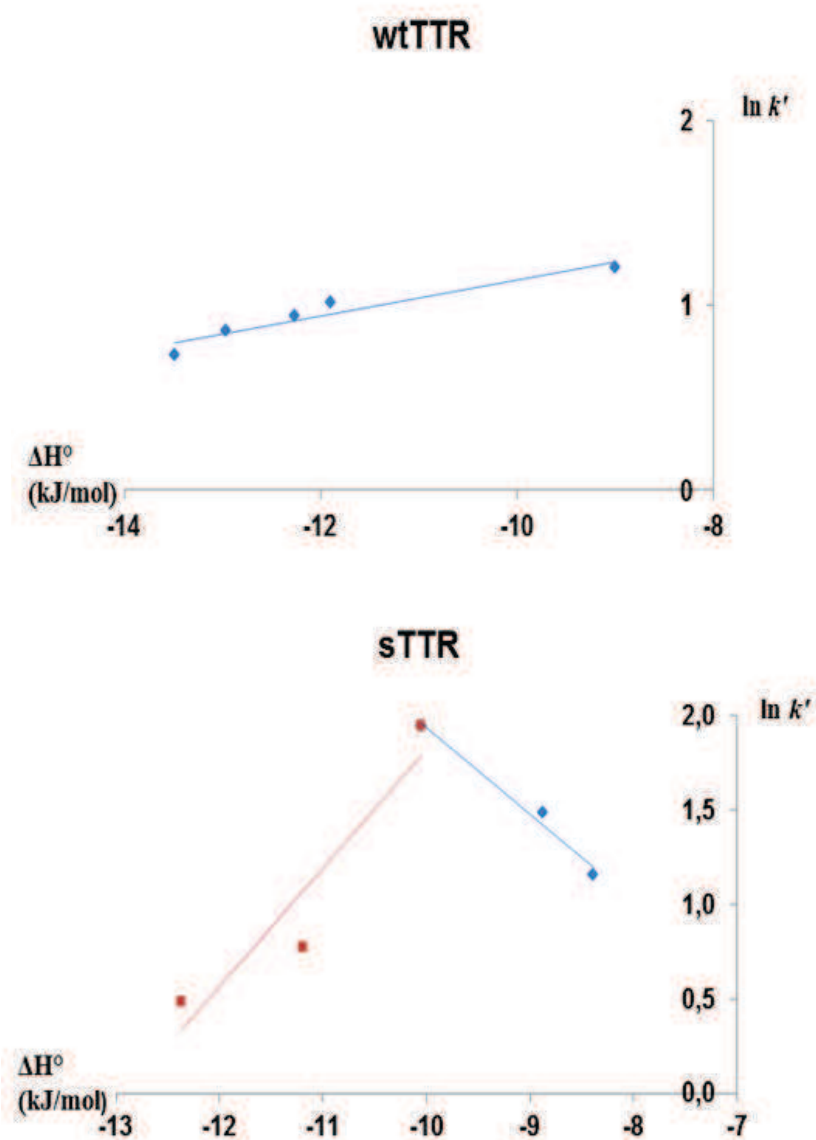


Fig.44. Courbes $\ln k'$ versus ΔH° (kJ.mol^{-1}) déterminées pour wtTTR et sTTR à $T = 298\text{K}$.

sTTR : domaine a : $\blacklozenge$ ($6,5 \leq \text{pH} \leq 7,4$)

domaine b : $\blacksquare$ ($5,5 \leq \text{pH} \leq 6,5$)

La fig.44 montre :

- Pour wtTTR, la courbe obtenue est linéaire. Le mécanisme de fixation de la wtTTR avec l'HSPG est indépendant du pH.

La courbe a pour équation :

$$\ln k' = 0,097\Delta H^\circ + 2,112 \quad r^2 = 0.91 \quad (19)$$

- Pour sTTR, la courbe présente une brisure de symétrie à une valeur critique de ΔH° à pH=6,5 ($\Delta H^\circ = -10,06$ kJ/mol).

Deux domaines distincts peuvent ainsi être partagés : a allant de pH 6,5 à pH 7,4 et b allant de pH 5,5 à pH 6,5 (fig.41) :

$$\text{pH} > 6,5 : \ln k' (a) = -0,457 \Delta H^\circ - 2.636 \quad r^2 = 0.98 \quad (20)$$

$$\text{pH} < 6,5 : \ln k' (b) = 0,630 \Delta H^\circ + 8,126 \quad r^2 = 0.89 \quad (21)$$

Les pentes des courbes sont différentes ce qui signifie que la température de compensation β n'est pas la même pour le domaine a et b de la sTTR et pour la wtTTR. En effet, β de wtTTR est égale à 1230 K et pour sTTR les domaines a et b présentent respectivement des températures de compensation égales à -190 K et 262 K. Ces résultats confirment bien le changement de mécanisme observé au niveau du tableau.7. et de la fig.41 à pH= 6,5.

Donc sTTR/HSPG présente deux mécanismes d'association fonction du pH:

Ainsi, nos résultats montrent que la sTTR ne présente pas la même structure tertiaire que la wtTTR malgré une séquence en AA identique. La sTTR va alors présenter des AA basiques et d'autres résidus qui n'étaient pas accessibles sous la forme tétramérique. Une hypothèse pour expliquer la structure de la sTTR est l'implication du système endosomes/lysosomes (Fig.45-46). La protéine amyloïde n'étant pas dans la bonne conformation serait alors mal dégradée par le système endosomes/lysosomes et serait relarguée dans le milieu extracellulaire lors de l'exocytose sous forme de fibrilles amyloïdes et pourrait alors se lier à l'HSPG extracellulaire via des liaisons ioniques et hydrophobes avec les résidus alors présents à la surface.

I.3 Conclusion

Cette série d'expériences réalisée à partir d'un système chromatographique a permis d'étudier l'effet à la fois de la température ainsi que du pH sur la liaison transthyréine (sénile ou sauvage)/héparane sulfate protéoglycane et de déterminer les paramètres thermodynamiques associés. Les principaux résultats sont :

- Les valeurs de ΔG et ΔS montrent que les interactions gouvernant l'association avec l'HSPG sont de type Van der Waals et hydrogènes pour les deux formes de TTR.
- Ces résultats confirment l'étude faite par Lai *et al* (Lai *et al.*, 1996)⁵² qui estime que la sTTR se dénature et a une capacité à former des fibres amyloïdes à pH inférieur à 5,5-6 nécessaire pour initier de la fibrillogénèse.
- Les valeurs obtenues des données thermodynamiques ainsi que la détermination du nombre de protons échangés mettent en évidence l'implication de certains acides aminés tels que la lysine, où bien la phénylalanine. Ces acides aminés sont alors impliqués dans des interactions qui déstabilisent la structure tétramérique initiale.
- La TTR comme beaucoup de protéines amyloïdes se lie à l'HSPG via la protonation d'un résidu His.

Une des hypothèses les plus répandues pour expliquer la formation des fibrilles amyloïdes est le rôle du système endosomes/lysosomes (Cataldo *et al.*, 2000 ; Pasternak *et al.*, 2004)^{171,172}.

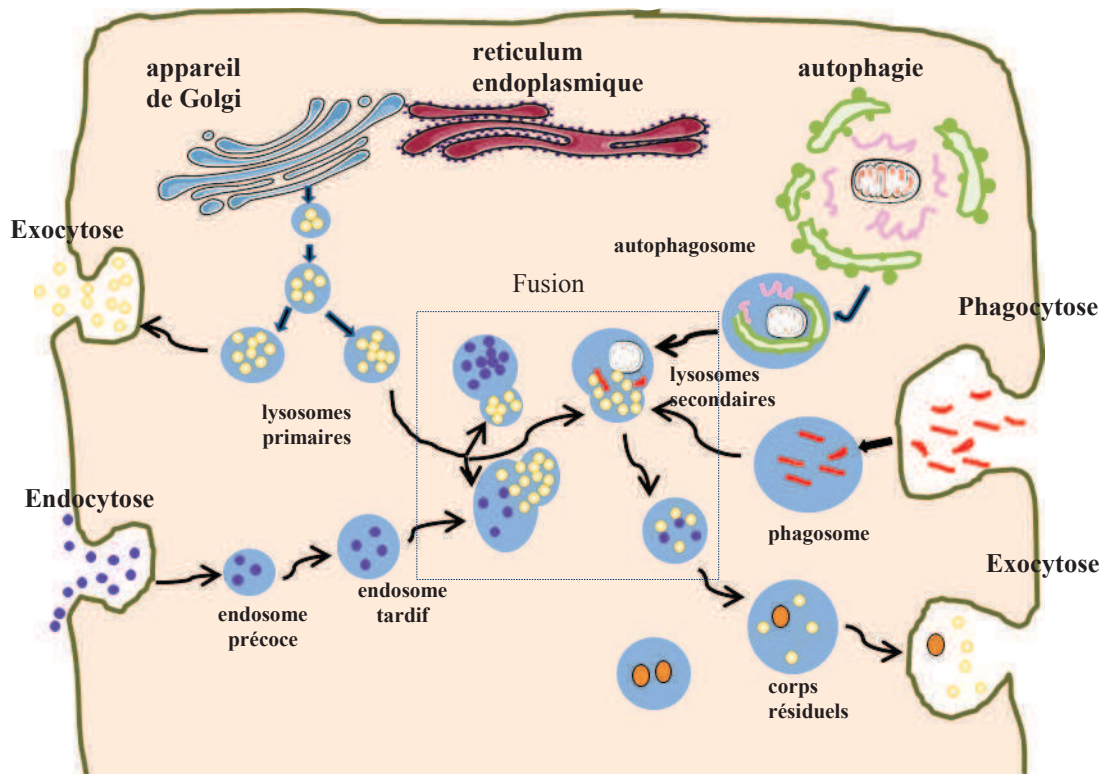


Fig.45. Le rôle du système endosome/lysosome et son fonctionnement. ● : enzymes lysosomales, ● : matériels extracellulaires, — : bactéries, ● : matériels non dégradés.

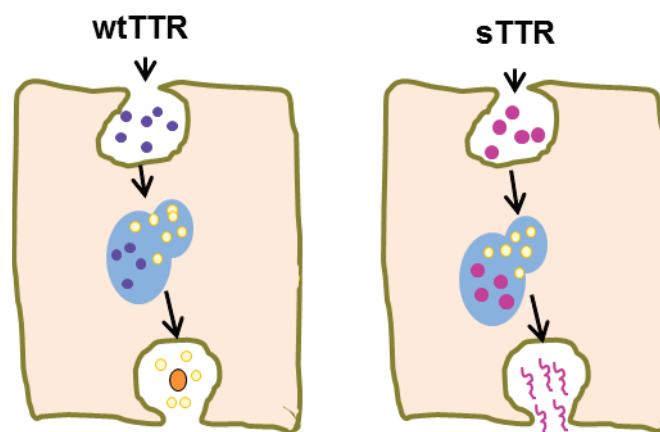


Fig.46. Hypothèse : devenir respectif de la wtTTR et de la sTTR lors de leur passage dans le système endosome/lysosome. ● : sTTR sous forme tétramérique, ● : sTTR mal dégradée sous forme monomérique amyloïdogène.

II Effet du pH et de la transthyréline sur la liaison A β /HSPG

Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons étudié l'effet de la transthyréline et du pH sur la liaison A β /HSPG par biochromatographie. Les dépôts d'agrégats de protéines A β en plaques amyloïdes retrouvés dans le cortex cérébelleux et l'hippocampe sont la signature de la MA. La MA est également considérée comme une amylose. En effet, dans les dépôts amyloïdes, la protéine A β se retrouve en feuillets β avec des molécules associées telles que l'HSPG. Physiologiquement, la protéine A β a la capacité d'interagir avec l'HSPG et ceci de manière non covalente. Dans la MA, la liaison A β /HSPG est résistante à la protéolyse. Par ailleurs, il a été prouvé *in vitro* et sur modèle animal que la transthyréline interagit avec la protéine A β . Elle séquestrerait A β et préviendrait ainsi la formation des fibres amyloïdes et la toxicité de l'A β . Cependant le rôle exact et le mécanisme d'action de la TTR dans la MA n'ont pas encore été définis.

La colonne utilisée est greffée avec de l'HSPG selon la même méthode que précédemment (cf § C.III.3.1), la protéine A β est la forme A β (1-40). Les conditions opératoires sont décrites au chapitre C.3.3.3)

II.1 Résultats

II.1.1 Effet du pH sur la liaison A β /HSPG

Comme dans le premier volet de la thèse, les expériences ont été réalisées à pH compris entre 5,5 et 7,4 et à des températures comprises entre 10°C à 40°C suivant le protocole (cf C.3.2). Le pH est « le paramètre » clé pour initier la fibrillogénèse. En effet il a été démontré qu'un pH acide est nécessaire au début de la fibrillogénèse de la protéine A β . La fig.47 représente la variation du logarithme du facteur de rétention de A β sur HSPG quand le pH varie de 5,5 à 7,4 avec une équation de la forme $\log k' = \log k'_0 + \lambda_1 \text{pH} + \lambda_2 \text{pH}^2$ (équation 18).

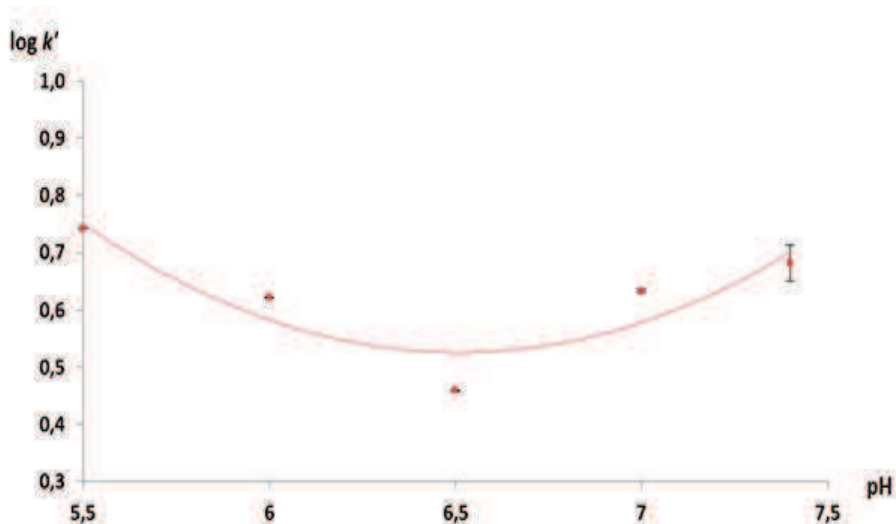


Fig.47. Variation du facteur de rétention d'A β en fonction du pH ($x=0 \mu\text{M}$) à 25°C

Les valeurs de $\log k'_0$, λ_1 et λ_2 sont respectivement égales à : 9,90 ; -2,88 et 0,22 pour la fig.47 avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,82. Grâce à l'équation 19 nous obtenons le nombre de protons donnés ou acceptés en fonction du pH lors de l'interaction A β /HSPG (fig.46).

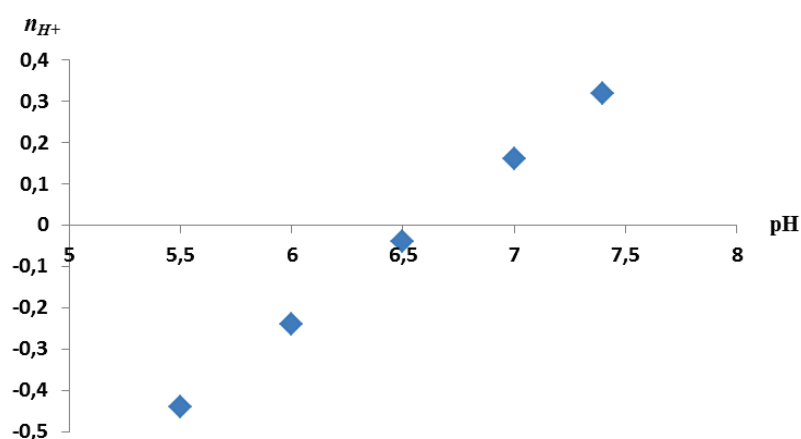


Fig.48. Nombres de protons éjectés ou acceptés en fonction du pH pour A β ($x=0 \mu M$)

Les résultats de la fig.48 montrent que :

Le nombre de protons éjectés ou liés est négatif à $pH < 6,5$ et devient positif à $pH > 6,5$

Ceci est une conséquence de la liaison de A β sur l'HSPG et de la libération des protons H^+ .

A β possède plusieurs résidus histidine dont le noyau imidazole de la chaîne latérale a un pK_a autour de ≈ 6 . Ainsi, l'atome d'hydrogène polaire du groupement nitrogène de cet AA peut former des interactions hydrogènes avec les acides aminés de la partie protéique de HSPG.

→ Ces résultats confirment l'importance de la protonation du noyau imidazole de résidus His dans le processus amyloïde (De Carufel et al., 2013)¹⁶⁶ et notamment ceux de Bränden *et al* sur le peptide bêta-amyloïde (Bränden *et al.*, 1993)¹⁶⁸.

II.1.2 Etude des paramètres thermodynamiques de la liaison A β /HSPG quand TTR = 0 μM

Les études précédentes ont montré que la TTR interagissait avec la protéine A β et ont émis l'hypothèse d'une séquestration possible de A β par la TTR. Afin de déterminer le type de liaisons impliquées dans l'interaction de A β avec l'HSPG et l'effet de la TTR sur cette interaction, les paramètres thermodynamiques ont été déterminés. Les valeurs de ΔH et ΔS sont calculées à partir de la courbe de Van't Hoff. La fig.49 représente les courbes de Van't Hoff de liaison à l'HSPG de A β ainsi que la courbe de TTR à 25°C et à $pH=7,4$.

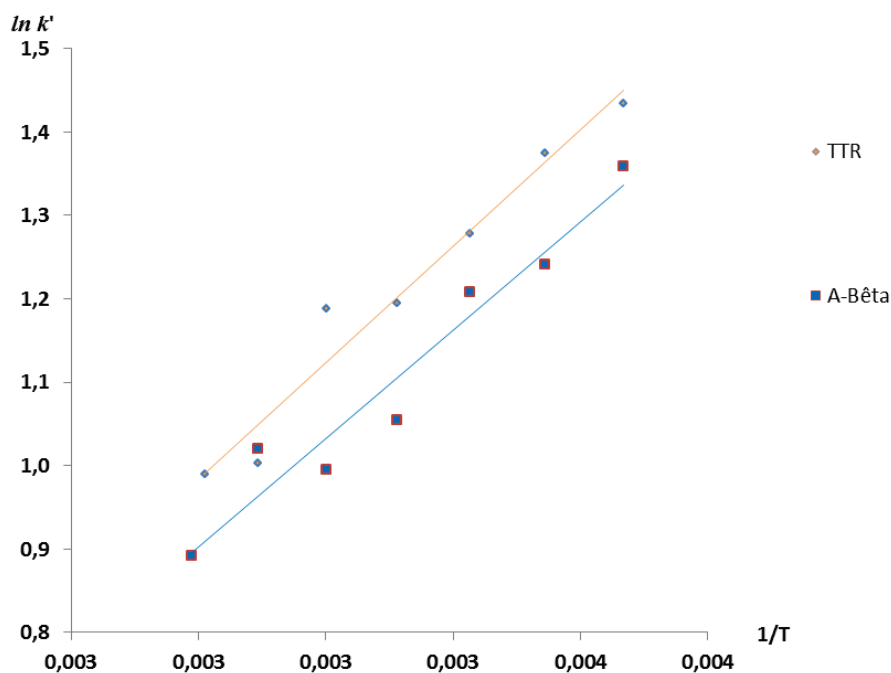


Fig.49. Courbes de Van't Hoff de A β et de la TTR ($x=0 \mu M$)

Les coefficients de corrélation associés à ces courbes sont supérieurs à 0,95.

L'analyse des courbes de Van't Hoff montre que les courbes sont linéaires, le mécanisme de fixation est donc indépendant de la structure de A β quel que soit le pH étudié.

Les courbes de Van't Hoff sont linéaires ce qui permet de calculer facilement les valeurs d'enthalpie et d'entropie à partir de l'équation 12.

Le tableau.8 représente les valeurs de ΔH° and ΔS° à tous les pH étudiés :

Tableau.8. Valeurs de l'enthalpie et de l'entropie de l'association A β /HSPG (ΔH° en kJ/mol, ΔS° sans unité)($x=0 \mu M$)

pH	5,5	6	6,5	7	7,4
ΔH°	-1,51(0,11)	-4,00(0,01)	-10,83(0,33)	-14,90(0,10)	-16,30(0,57)
ΔS°	1,10(0,05)	-0,21(0,00)	-3,27(0,13)	-4,70(0,04)	-5,06(0,24)

Les valeurs d'enthalpie (ΔH°) sont toujours négatives à n'importe quelle valeur de pH ce qui implique que les liaisons de van der Waals et hydrogène jouent un rôle majeur dans le mécanisme d'association de A β /HSPG.

Les résultats à pH <6.5 montrent que lorsque la valeur du pH diminue, les valeurs de ΔH° et de $\Delta S^{\circ*}$ augmentent considérablement ; et lorsque le pH est < à 5,5, $\Delta S^{\circ*}$ devient positives ($\Delta H^\circ_{\text{pH}7,4} = -16,3$ kJ/mol et $\Delta S^{\circ*}_{\text{pH}7,4} = -5,06$, $\Delta H^\circ_{\text{pH}5,5} = -1,51$ kJ/mol and $\Delta S^{\circ*}_{\text{pH}5,5} = 1,10$). Ces observations montrent que des interactions de type ioniques et hydrophobes apparaissent dans le mécanisme d'association de A β /HSPG.

Ces valeurs sont corrélées par l'étude de la CEE. En effet, l'analyse par CEE de l'association d'A β avec l'HSPG montre une brisure de symétrie à pH=6,5. Ainsi deux domaines distincts peuvent être mis en évidence : un domaine allant de pH 6,5 à 7,4 et un domaine compris entre pH 5,5 et 6,5 (fig.50).

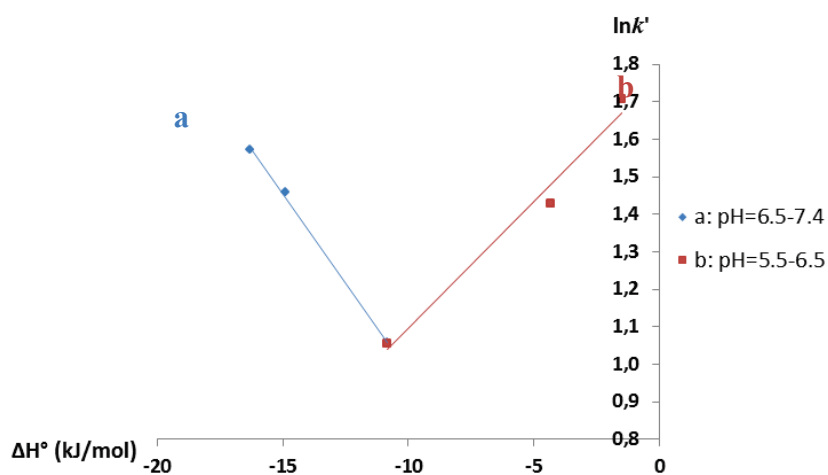


Fig.50. Compensation enthalpie-entropie de l'association A β /HSPG à 25°C.

Domaine a : pH 6,5-7,4. Domaine b : pH 5,5-6,5

Par exemple d'après la fig.49, les droites de régression linéaire ont pour équation :

$$\ln k' (a) = -0,08 \Delta H^\circ + 0,13 \quad r^2 = 0,98 \quad (25)$$

$$\ln k' (b) = 0,07 \Delta H^\circ + 1,76 \quad r^2 = 0,97 \quad (26)$$

Ainsi les équations de droites sont différentes ce qui implique des températures de compensation différentes. En effet à 25°C, pour A β : $\beta=265$ K pour le domaine a and $\beta=360$ K pour le domaine b. Le Tableau.9 regroupe les différentes températures de compensation pour A β incubée avec 0 μ M de TTR.

Tableau.9. Températures de compensation de $A\beta + x = 0\mu M$

	β pH6,5-7,4	β pH5,5-6,5
$x=0 \mu M$	259	398

L'étude de la CEE permet de mettre en évidence une brisure de symétrie à la valeur de pH=6,5 (Fig.50). La table.9 montre une valeur des températures de compensation différentes selon le domaine de pH ($\beta_{(pH6,5-7,4)}=259$ K, $\beta_{(pH5,5-6,5)}=398$ K.

L'analyse des données thermodynamiques associées aux courbes de CEE et de $n_{H^+}=f(pH)$ montrent que :

- Lorsque le pH est supérieur à 6,5, les valeurs d'enthalpies associées diminuent ce qui impliquent que les liaisons de van der Waals et hydrogène sont prépondérantes dans le mécanisme d'association et forment ainsi un réseau de liaisons hydrogène important à l'interface du complexe $A\beta$ /HSPG.
- Les résultats à pH <6.5 montrent que lorsque la valeur du pH diminue, les valeurs de ΔH° et de ΔS° augmentent considérablement ; et lorsque le pH est < à 5,5, ΔS° devient positives ($\Delta H^\circ_{pH7,4} = -16,3$ kJ/mol et $\Delta S^\circ_{pH7,4} = -5,06$, $\Delta H^\circ_{pH5,5} = -1,51$ kJ/mol and $\Delta S^\circ_{pH5,5} = 1,10$). Ces observations démontrent que des interactions de type ioniques et hydrophobes apparaissent dans le mécanisme d'association de $A\beta$ /HSPG.

II.1.3 Conclusion et discussion

Les interactions de van der Waals et hydrogènes peuvent provenir de différents groupements :

En effet, la forme $A\beta(1-40)$ possède dans la partie contenant les 28 premiers AA des AA aromatiques tels que une tyrosine en position 10 et 3 phénylalanines en positions 4, 19 et 20.

De nombreuses études ont démontré l'importance du groupement sulfate des GAGs dans l'interaction avec $A\beta$ (Castillo *et al.*, 1999)¹⁷⁴ avec une implication directe dans la liaison ou bien en tant que contre-ion. Par ailleurs l'importance du groupement sulfate a été confirmé par une diminution de la formation des fibrilles amyloïdes en présence de HS désulfatés (McLaurin *et al.*, 1999)¹⁷⁵. En effet, des interactions de type van der Waals peuvent

avoir lieu entre les électrons délocalisés des noyaux aromatiques des acides amines aromatiques de A β et les charges négatives du groupement sulfate de HSPG.

Les interactions entre les acides aminés aromatiques entre eux présents sur A β et sur la partie protéique de HSPG peuvent induire également des interactions de van der Waals comme dans les interactions entre le précurseur AA et l'HSPG (Narindrasorak *et al.*, 1991)¹⁷⁶.

Les liaisons de type ionique et hydrophobe sont prépondérantes dans le mécanisme d'association quand le pH est inférieur à 6,5.

En effet, les interactions entre les espèces ioniques et les interactions hydrophobes en solution aqueuse sont caractérisées par de faibles changements d'enthalpie mais par un changement d'entropie devenant alors positive (Castillo *et al.*, 1999)¹⁷⁴. A β possède 3 résidus His dans les 14 premiers AA en 6, 13 et 14 qui peuvent créer alors des interactions ioniques. En effet la protonation de l'atome d'azote du noyau imidazole peut interagir avec les charges négatives groupement sulfates) de l'HSPG mais aussi avec les AA provenant de la partie protéique du PG (Narindrasorak *et al.*, 1991)¹⁷⁶. Cette hypothèse est corroborée par les valeurs négatives de n_{H^+} (fig.39). Ces résultats confirment l'étude de McLaurin (Mc Laurin *et al.*, 1999)¹⁷⁵ qui a montré que les résidus 13-16 (His-His-Gln-Lys) de A β étaient indispensables à l'interaction avec les GAG du fait que leur interactions avec les atomes de soufre de l'HSPG sont inhibées à pH>6,5 (Palanivelu, 2012)¹⁷⁷.

Les interactions hydrophobes peuvent être dues aux AA hydrophobes qui interagissent avec la partie protéique de l'HSPG. A β possède 11 AA hydrophobes dans la partie N_T tels que la Leucine (Leu) 17 et la valine (val) 18. En effet, les études ont montré que ces deux AA sont fréquemment impliqués dans les interactions hydrophobes et sont très fréquemment retrouvés dans les structures de feuillets β (Chou & Fasman, 2006)¹⁷⁸ des protéines. Par ailleurs, des études suggèrent que la présence d'AA avec une forte propension à former des feuillets β dans une séquence qui est sous forme d'hélice α facilitent un changement conformationnel en feuillet β de la séquence (Pagel *et al.*, 2006)¹⁷⁹. Ainsi, les interactions hydrophobes et ioniques ajoutées à la conformation en feuillet β de la partie C_T sont responsables du changement conformationnel de la partie N_T en feuillet β aussi.

Nos résultats démontrent clairement 2 points importants ::

Les interactions de van der Waals maintiennent principalement la partie N_T de $A\beta(1-40)$ sous forme de pelote statistique i.e. dans sa structure physiologique.

Le pH joue un rôle prépondérant dans la conversion d' $A\beta$ de la structure de pelote statistique en feuillet β qui est la structure amyloïdogénique.

II.2. Effet de la TTR sur la liaison $A\beta$ /HSPG

II.2.1 Effet du pH

Les expériences ont été menées comme dans le chapitre II.1.1 avec des concentrations en TTR (x) de 2, 5, 10 et 15 μM de TTR.

La fig.51 représente la variation du facteur de rétention d' $A\beta$ en fonction du pH à 25°C pour $x=2, 5, 10$ et 15 μM .

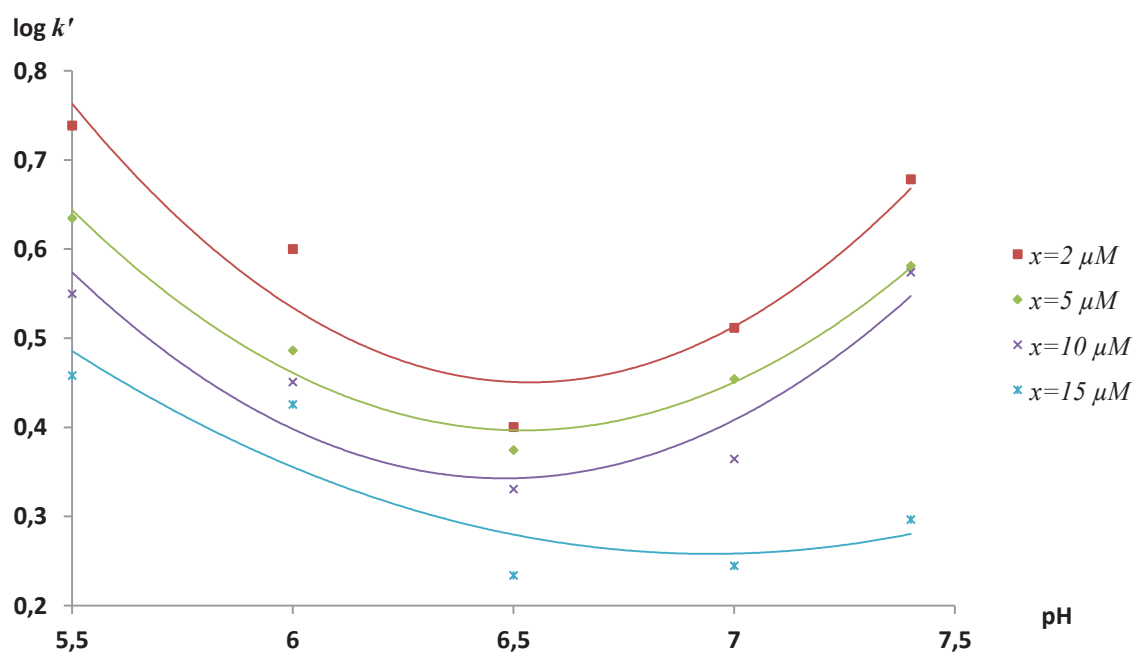


Fig.51. Variation du facteur de rétention de $A\beta$ en fonction du pH à 25°C avec $x=2$ (■), 5 (◆), 10 (×), ou 15 (×) μM

On observe également une équation de la forme $\log k' = \log k'_0 + \lambda_1 \text{pH} + \lambda_2 \text{pH}^2$ (Eq. 18). Cette variation parabolique est observée pour n'importe quelle valeur de TTR ajoutée au milieu. Grâce à l'Eq. 19 nous obtenons le nombre de protons donnés ou acceptés en fonction du pH lors de l'interaction A β /HSPG avec $x=2, 5, 10$ et $15 \mu\text{M}$ (fig.51).

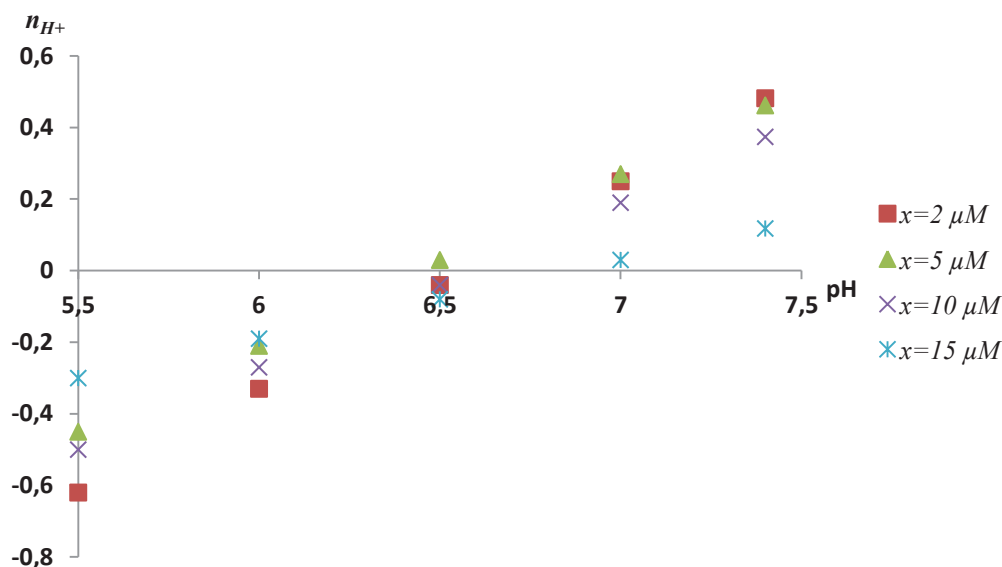


Fig.52. Nombres de protons éjectés ou acceptés en fonction du pH pour A β avec $x=2$ (■), 5 (▲), 10 (×), ou 15 (✱) μM

Les résultats de la fig.52 montrent la même conclusion que sans TTR. Il existe une valeur critique de pH à 6,5 qui correspond à la protonation d'un noyau imidazole de résidu His.

II.2.2 Analyse des données thermodynamiques

Afin de déterminer le type de liaisons impliquées dans l'interaction de A β avec l'HSPG en présence de TTR, les paramètres thermodynamiques ont été déterminés. Les valeurs de ΔH et ΔS sont calculées à partir de la courbe de Van't Hoff. La fig.53 représente les courbes de Van't Hoff de liaison à l'HSPG de A β avec 2, 5, 10 et 15 μM de TTR à 25°C et à pH=7,4.

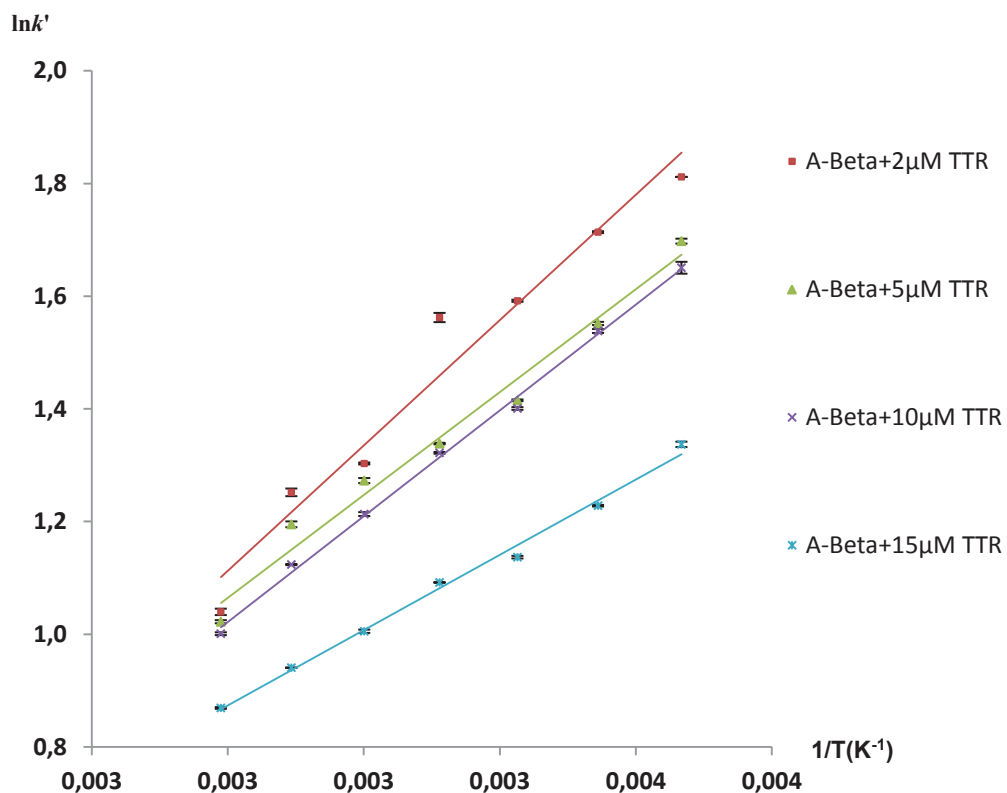


Fig.53. Courbes de Van't Hoff de $A\beta$ en présence $x= 2$ (■), 5(▲), 10 (×), ou 15 (✱) μM

Les coefficients de corrélation associés à ces courbes sont supérieurs à 0,96.

L'analyse des courbes de Van't Hoff montre que les courbes sont linéaires, le mécanisme de fixation est donc indépendant de la structure de $A\beta$ quel que soit le pH étudié et la concentration en TTR.

Les courbes de Van't Hoff sont linéaires ce qui permet de calculer facilement les valeurs d'enthalpie et d'entropie à partir de l'Eq 12.

Le Tableau.10 représente les valeurs de ΔH° and ΔS° à tous les pH étudiés :

Tableau.10. Valeurs de l'enthalpie et de l'entropie de l'association A β /HSPG (ΔH° en kJ/mol, ΔS° sans unité) pour $x=2, 5, 10$ et $15 \mu\text{M}$

pH	$x (\mu\text{M})$	2	5	10	15
5,5	ΔH°	-3,17(0,24)	-4,39(0,37)	-4,30(0,70)	-7,70(0,59)
	ΔS°	0,41(0,10)	-0,28(0,14)	-0,53(0,27)	-2,04(0,11)
6	ΔH°	-5,81(0,22)	-4,63(0,10)	-5,06(0,10)	-7,97(0,30)
	ΔS°	-0,99(0,09)	-0,75(0,04)	-0,97(0,04)	-2,33(0,12)
6,5	ΔH°	-12,36(0,06)	-11,13(0,11)	-11,14(0,33)	-12,49(0,02)
	ΔS°	-4,06(0,02)	-3,61(0,05)	-3,71(0,13)	-4,53(0,01)
7	ΔH°	-14,90(0,10)	-13,64(0,15)	-13,51(0,03)	-11,10(0,16)
	ΔS°	-4,70(0,04)	-4,33(0,06)	-3,65(0,01)	-5,69(0,06)
7,4	ΔH°	-16,30(0,57)	-18,47(0,10)	-15,58(0,13)	-15,48(0,05)
	ΔS°	-5,06(0,24)	-6,00(0,04)	-4,98(0,05)	-6,21(0,02)

Ces valeurs nous montrent que :

- Lorsque le $\text{pH} > 6,5$, il n'y a pas de différences significatives dans les valeurs thermodynamiques à toutes les concentrations de TTR (à $\text{pH}=7,4$: $\Delta H^\circ_{\text{A}\beta+x=0\mu\text{M}} = -16,3$ kJ/mol, $\Delta S^\circ_{\text{A}\beta+x=0\mu\text{M}} = -5,06$ et $\Delta H^\circ_{\text{A}\beta+x=15\mu\text{M}} = -15,48$ kJ/mol, $\Delta S^\circ_{\text{A}\beta+x=15\mu\text{M}} = -6,21$). Ces données démontrent que les interactions de van der Waals et hydrogènes sont prépondérantes dans le mécanisme d'association entre A β et HSPG.
- Lorsque le $\text{pH} < 6,5$, la diminution des valeurs thermodynamiques avec la concentration de TTR (à $\text{pH}=5,5$: $\Delta H^\circ_{\text{A}\beta+x=0\mu\text{M}} = -1,51$ kJ/mol et $\Delta S^\circ_{\text{A}\beta+x=0\mu\text{M}} = 1,10$, $\Delta H^\circ_{\text{A}\beta+x=15\mu\text{M}} = -7,70$ kJ/mol et $\Delta S^\circ_{\text{A}\beta+x=15\mu\text{M}} = -2,04$) démontre que la prédominance des interactions de type ioniques et hydrophobes diminue avec l'augmentation de la concentration en TTR.

La fig.53 montre une brisure de symétrie observée également à $\text{pH } 6,5$ pour n'importe quelle valeur de x .

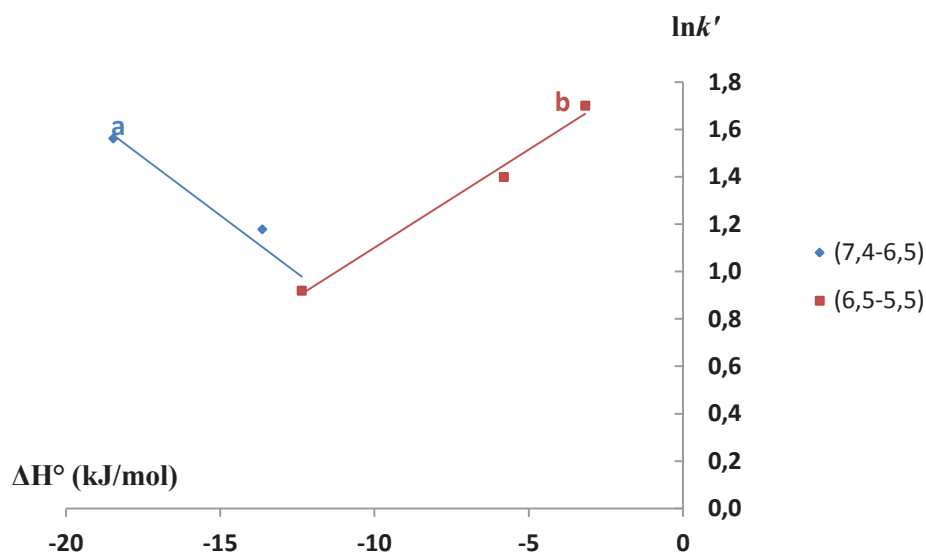


Fig.54. Compensation enthalpie-entropie de l'association Aβ/HSPG à 25°C avec $x=2 \mu\text{M}$.

Domaine a : pH 6,5-7,4. Domaine b : pH 5,5-6,5

Par exemple d'après la fig.54, les droites de régression linéaire ont pour équation :

$$\ln k' (a) = -0,10 \Delta H^\circ - 0,23 \quad r^2 = 0,99 \quad (27)$$

$$\ln k' (b) = 0,08 \Delta H^\circ + 1,92 \quad r^2 = 0,99 \quad (28)$$

Ainsi les équations de droites sont différentes ce qui implique des températures de compensation différentes. En effet à 25°C, pour Aβ+2 μM: β=265K pour le domaine a et β=360K pour le domaine b. Le Tableau.11 regroupe les différentes températures de compensation pour Aβ incubée avec 2, 5, 10 et 15 μM de TTR.

Tableau.11. Températures de compensation de Aβ + $x = 2, 5, 10$ et $15 \mu\text{M}$

$x (\mu\text{M})$	β pH6,5-7,4	β pH5,5-6,5
2	251	402
5	259	401
10	263	444
15	251	456

L'analyse des données thermodynamiques associées aux courbes de CEE et de l'Eq. 18 montrent que lorsque le pH est inférieur à 6,5 les interactions de hydrophobes et ioniques diminuent avec l'augmentation de la concentration de TTR ce qui implique que moins d'AA hydrophobes sont impliqués la liaison A β /HSPG.

La TTR ne permet pas aux AA hydrophobes de A β d'accéder à la surface de l'HSPG.

II.2.3 Analyses des chromatogrammes et des données associées

- La fig.55 et la fig.56 montrent respectivement que le temps de rétention ainsi que le facteur de rétention diminuent avec l'augmentation de la concentration en TTR. Ces résultats démontrent que la présence de TTR diminue l'affinité de A β pour HSPG du fait de l'association de A β avec la TTR dans le milieu. Cette diminution est observée à toutes les valeurs de pH étudiées.

La fig.55 représente la variation du facteur de rétention de A β à pH= 5,5 et T=25°C :

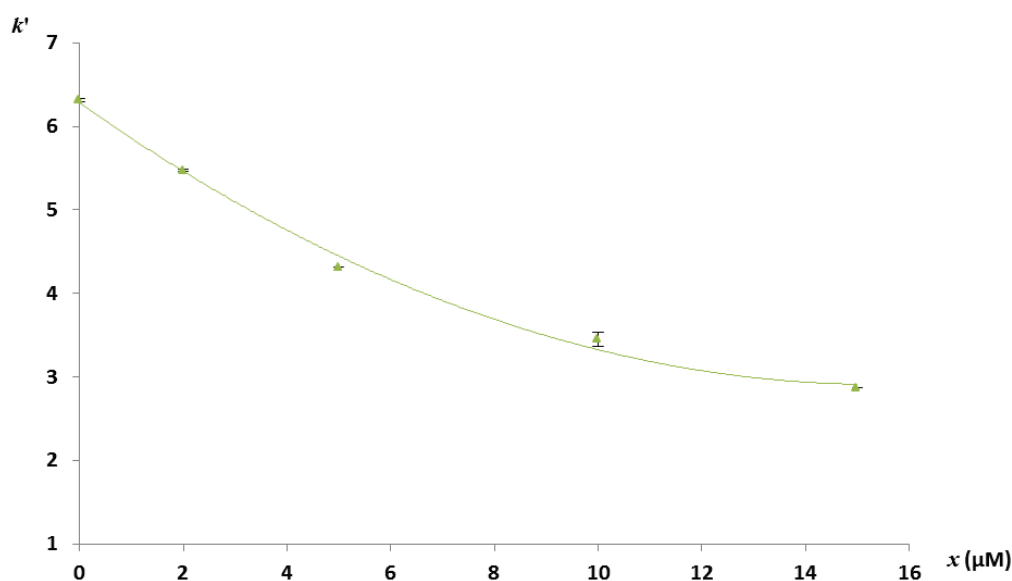


Fig.55. k' versus x à pH=5,5 et à T= 25°C

La fig.55 donne un exemple de chromatogrammes de A β sans TTR et A β incubée avec 15 μM de TTR à pH=7,4 et T=25°C :



Fig.56. Chromatogrammes à pH=7,4 et T=25°C de a) A β sans TTR, b) A β incubée avec 15 μ M de TTR

Afin d'aller plus en détail, nous avons analysé l'aire des pics des chromatogrammes à tous les pH et à $x=0, 2, 5, 10$ et 15μ M de TTR.

Le tableau 12 présente les aires des pics à tous les pH étudiés et toutes les concentrations de TTR étudiées :

Tableau.12. Aire des pics chromatographiques de A β avec $x=0, 2, 5, 10$ et 15μ M

x (μ M)	pH5,5	pH6	pH6,5	pH7	pH7,4
0	2594295	2259050	2092899	2486154	2871451
2	1347617	1669877	1616071	1286884	1863466
5	1232481	1617110	1110924	1000000	1218179
10	225289	93965	1052514	101124	495148
15	78228	46730	51045	47443	52606

La fig.57 représente la variation de l'aire des pics en fonction de la concentration de TTR présente dans le milieu :

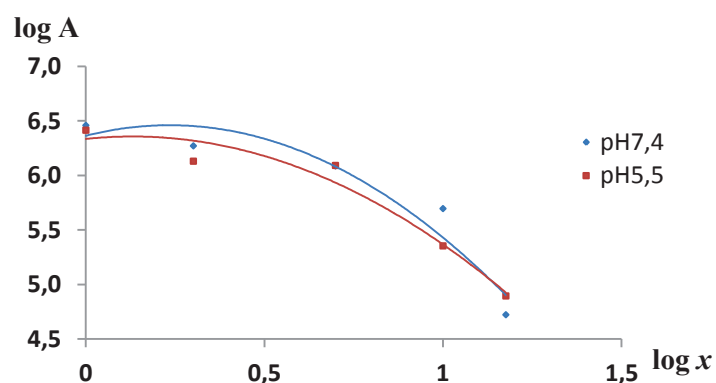


Fig.57. $\log A$ versus $\log x$ à pH= 7,4 and pH=5,5

La Fig.56 Table.10 et la Fig.57 indiquent que l'aire du pique chromatographique diminue avec l'augmentation de la concentration en TTR et ceci à toutes les valeurs de pH étudiées. En effet la diminution de l'aire des pics avec l'augmentation de la concentration en TTR dans le milieu montre que la concentration de A β présente dans le milieu diminue

La fig. 55 montre que la rétention de A β diminue avec la concentration croissante de TTR. Donc plus la TTR est présente dans le milieu et moins l'association A β /HSPG est forte. Ces résultats sont corrélés aux résultats thermodynamiques qui montrent que plus la concentration de TTR augmente dans le milieu et plus on observe une diminution des interactions hydrophobes et ioniques.

Ces observations peuvent être expliquées à l'activité protéolytique de la TTR. En effet une activité protéolytique a été attribuée à la TTR en tant que fonction cérébrale physiologique (Liz *et al.*, 2004)¹⁸⁰ et confirment le clivage de A β par la TTR. En effet, Costa *et al* (Costa *et al.*, 2008)¹⁰⁷ ont montré que la TTR clivait le peptide A β après trois heures d'incubation en un segment de 1698 Da correspondant aux AA en position 1 à 14 (fig. 58). Donc ce clivage élimine une grande partie de l'A β avec la partie C_T incluse. Ainsi, plus la concentration en TTR incubée avec l'A β augmente, plus l'A β est clivée. Le niveau de peptide A β entier correspondant à l'A β libre diminue. Les résidus 13-16 critiques pour l'interaction avec les GAG ainsi que de nombreux AA hydrophobes tels que la Val18 et la Leu17 responsables des interactions hydrophobes sont quasiment tous enlevés lors du clivage; l'importance des interactions hydrophobes et ioniques sont donc réduites (Geneste *et al.*, 2013)¹⁸¹. Le fragment A β reste donc sous forme de pelote statistique et ne peut donc s'agréger avec l'HSPG.



*Fig.58. Fragment obtenu de A β obtenu après 3h d'incubation avec la TTR (Costa *et al.*, 2010)¹⁰⁷*

II.3 Conclusion

Dans cette étude, la biochromatographie nous a permis d'étudier l'interaction de A β avec l'HSPG et de déterminer l'effet à la fois de la TTR et du pH sur cette association. Plusieurs points importants peuvent être relevés des résultats obtenus :

- L'interaction entre A β et HSPG implique en majorité des liaisons de Van der Waals et des liaisons hydrogènes.
- Cette interaction est dépendante du pH: lorsque le pH > 6,5, les liaisons de Van der Waals et hydrogènes sont prépondérantes. Quand le pH atteint une valeur inférieure à 6-6,5 plus d'interactions hydrophobes et ioniques sont engagées dans le mécanisme d'association.
- Ce changement de mécanisme à pH inférieur à 6,5-6 serait dû à la protonation d'une histidine et au résidu Glu22 qui permettraient alors la conversion de l'hélice- α en feuillet- β .
- Il existe une compétition entre la forme libre de A β et la forme incubée avec la TTR pour la liaison à l'HSPG.
- La TTR exercerait son activité protéolytique sur A β en la clivant en plus petits fragments qui seraient alors moins amyloïdogènes que la forme de A β entière. En effet les aires des pics chromatographiques montrent que plus la concentration en TTR incubée avec A β est importante plus l'aire diminue. De plus les données thermodynamiques augmentent avec la concentration en TTR à partir de pH 6.5 ce qui implique alors une moindre importance des interactions hydrophobes et ioniques.

III Effet de la fonctionnalisation de la TTR par des nanotubes de carbone (NTCs) sur la liaison TTR/HSPG

Les NTCs sont utilisés au niveau médical comme vecteurs de molécules thérapeutiques (cf § B.III.3.1). Ils sont fonctionnalisés afin de permettre une meilleure biodisponibilité.

Nous avons évalué l'effet des NTC fonctionnalisés sur la TTR afin de voir si la présence de NTC influait la liaison à l'HSPG.

Pour cela nous avons utilisé le protocole C.II. Les conditions opératoires sont les mêmes qu'utilisées pour l'association wtTTR/HSPG (cf § C.III.3.1) : l'étude a été réalisée à différents pH de 5,5 à 7,4 et à des températures comprises entre 10°C et 40°C.

La fig.60 représente les courbes de Van't Hoff de la TTR fonctionnalisée par les NTCs à tous les pH étudiés.

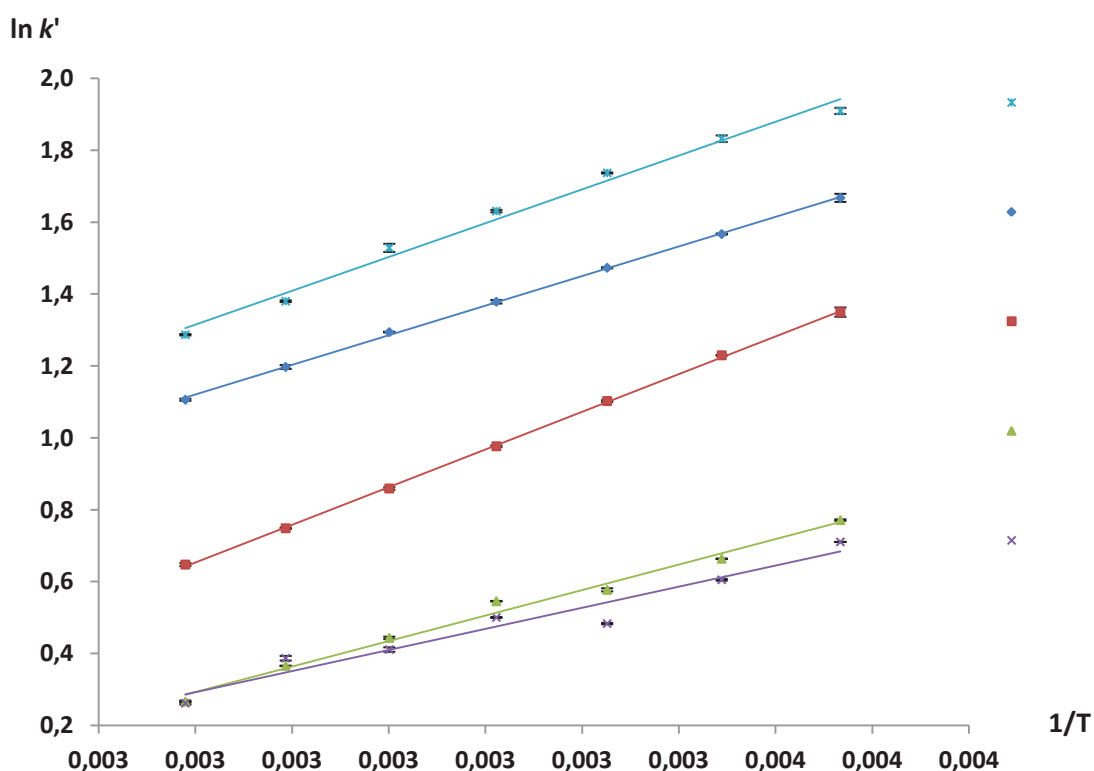


Fig.60. Courbes de Van't Hoff de TTR-NTC à pH 5,5 (*), 6 (♦), 6,5 (■), 7(▲) et 7,4 (×)

L'analyse de la courbe de Van't Hoff ne montre quasiment aucune différence avec celle obtenue avec la TTR seule. Les courbes sont toutes linéaires et présentent un coefficient de

corrélation supérieur à 0,92. Donc le mécanisme d'association est indépendant de la température quel que soit le pH étudié.

Tableau.13. Valeurs des k' pour la wtTTR, les NTCs et wtTTR-NTCs à pH 5,5 et 7,4

NTCs		wtTTR		wtTTR-NTCs	
$k'_{5,5}$	$k'_{7,4}$	$k'_{5,5}$	$k'_{7,4}$	$k'_{5,5}$	$k'_{7,4}$
4,405	1,227	4,736	1,881	4,890	1,835

n=3
 $\sigma < 0,005$

Le tableau.13 montre des valeurs de k' différentes que ce soit à pH 5,5 ou 7,4 pour chacune des formes étudiées. Cela montre bien qu'il y a eu fonctionnalisation de la wtTTR par les NTCs.

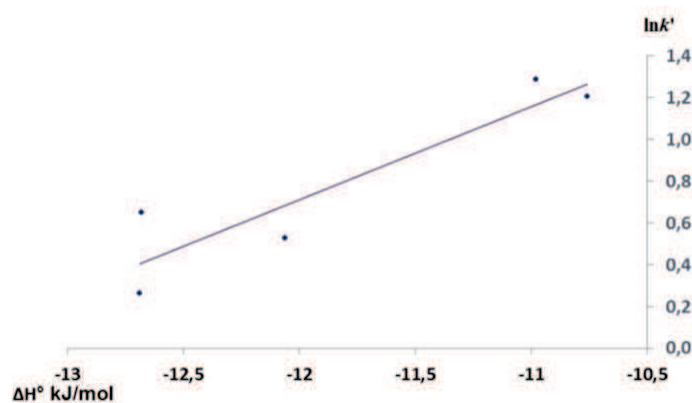


Fig.61. Compensation enthalpie entropie de l'association entre l'HSPG et wtTTR-NTCs

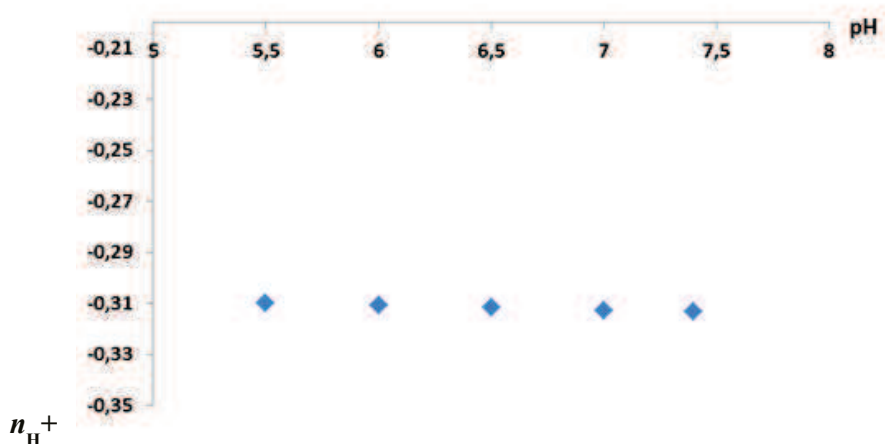


Fig.62. Nombre de protons mis en jeu lors de l'association entre l'HSPG et wtTT-NTCs à pH compris entre 5,5 et 7,4

La figure.61 représentant la compensation enthalpie entropie de l'association entre l'HSPG et la wtTTR-NTCs ne présente pas de brisure de symétrie donc il n'y a pas de changement dans le mécanisme d'association.

De plus, la figure.62 montre que le nombre de protons mis en jeu lors de cette association reste quasiment identique quel que soit le pH.

Nous pouvons donc conclure entre la figure 61 et la 62 que ce mécanisme d'association est indépendant de la température.

La courbe de Van't Hoff a permis d'accéder aux paramètres thermodynamiques associés (ΔH° et ΔS°) à partir de l'Eq.18. Les valeurs sont présentées dans le tableau 14.

Table.14. Valeurs des paramètres thermodynamiques ΔH° et ΔS° pour wtTTR et TTR-NTC à pH5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 et 7,4 (ΔH° en kJ/mol, ΔS° sans unité)

	wtTTR		TTR-NTC	
	ΔH°	ΔS°	ΔH°	ΔS°
pH5,5	-8,78	-1,74	-10,98	-2,88
pH6	-10,41	-2,74	-10,76	-2,81
pH6,5	-12,27	-3,95	-12,68	-4,03
pH7	-12,96	-4,57	-11,79	-4,25
pH7,4	-13,48	-5,10	-12,69	-4,70

L'analyse des résultats montrent que les valeurs thermodynamiques sont similaires à celles obtenues sans la fonctionnalisation par les NTCs. Ces valeurs sont toutes négatives, cependant elles restent assez constantes par rapport à celles obtenues sans NTCs (wtTTR : ΔH° pH5,5= -8,78 kJ/mol et TTR-NTC : ΔH° pH5,5= -10,98 kJ/mol). Les interactions de van der Waals et hydrogènes sont prépondérantes à tous les pH étudiés. Il n'y a donc pas de différences significatives entre la TTR seule et la TTR greffée avec des NTC pour la liaison avec l'HSPG.

Cependant, lorsque le pH diminue, les valeurs thermodynamiques pour la TTR-NTCs augmentent comparées à celles obtenues pour la wtTTR seule.

De plus la figure.63 montre également une rétention différente à partir de pH=6,5.

Un mécanisme d'association différent apparaîtrait à pH <6,5 et surtout à pH 5,5 avec beaucoup plus d'interactions hydrophobes.

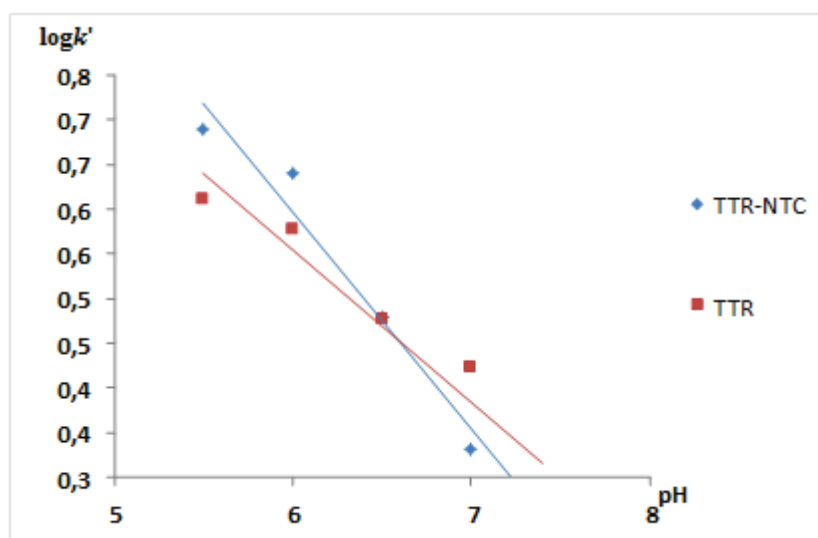


Figure.63. $\log k'$ vs pH pour la TTR-NTC et la TTR

Ces résultats peuvent être expliqués en partie par la configuration qu'adopte la wtTTR lorsqu'elle est fonctionnalisée par les NTCs. Lorsque la wtTTR va être fonctionnalisée par le NTC, celui-ci très hydrophobe va alors créer des interactions de type hydrophobe avec la wtTTR. L'ensemble wtTTR-NTC peut être comparé avec l'association entre la wtTTR et son ligand la tyroxine T4 (fig.64).

Il est reconnu que l'association entre la TTR et la T4 permet de stabiliser la TTR sous sa forme tétramérique. Donc le NTC lorsque ce dernier est associé à la TTR jouerait un rôle de stabilisateur de la TTR et ce rôle serait d'autant plus visible à pH acide. Cela permettrait à la wtTTR de se dissocier plus difficilement.

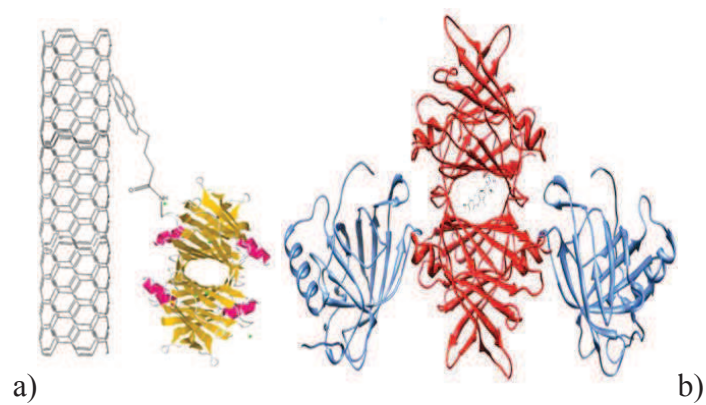


Fig.64. a) Structure de la wtTTR fonctionnalisée avec le NTC et b) Structure de la wtTTR avec son ligand la thyroxine T4.

DISCUSSION GENERALE

Dans le cadre de la thématique « santé » sur les maladies rares et orphelines, nous avons étudié les amyloses et en particulier les protéines amyloïdes et leurs interactions avec leurs ligands moléculaires et cellulaires. Ce projet de thèse s'est articulé avec le projet général en étudiant 2 types de protéines amyloïdes : la protéine bêta-amyloïde impliquée dans les plaques séniles de la maladie d'Alzheimer et la protéine transthyrétine composant principal de l'amylose sénile à la transthyrétine. Les liaisons de ces protéines avec leur ligand moléculaire l'héparane sulfate protéoglycane ont été analysées par biochromatographie. Le but de cette étude était de mieux appréhender et analyser, par la mise au point de nouvelles colonnes chromatographiques, les associations impliquées entre les protéines amyloïdes et leurs ligands moléculaires ou cellulaires.

L'HSPG étant le composé ubiquitaire des amyloses, nous nous sommes tout d'abord penchés sur la mise au point d'une nouvelle colonne chromatographique avec de l'HSPG greffé de manière covalente. La mise au point de nouvelles colonnes chromatographiques pour étudier les propriétés pharmacologiques des xénobiotiques a suscité un intérêt majeur. En effet, ce sont des techniques de screening rapides et fiables. Elles permettent, en utilisant la chromatographie liquide haute performance, d'analyser et de mieux comprendre les processus physicochimiques impliqués dans le mécanisme d'association des xénobiotiques sur les différentes phases stationnaires remplissant une colonne chromatographique. Le ligand a été fixé par réaction avec des fonctions réactives insérées sur la surface du support chromatographique utilisé. Les compétences du laboratoire de chimie analytique et physique dans le développement de techniques de biorecognition, c'est-à-dire de mise en évidence d'interactions moléculaires et de l'influence de modifications de l'environnement cellulaire sur ces interactions a permis de mettre en place une colonne fiable pour les conditions opératoires requises et dans le temps. Une première méthode a déjà été mise au point par les chercheurs de l'EA pour l'immobilisation de l'ACHÉ.

L'HSPG est immobilisé sur des particules de silice pré-activée par des résidus amines. Cette colonne a permis à la fois la détermination des processus physicochimiques impliqués dans le mécanisme d'association des protéines amyloïdes (TTR et A β) avec l'HSPG ainsi que l'effet de la transthyrétine sur la liaison A β /HSPG. Les résultats d'analyse de cette colonne montrent que la technique est reproductible avec un pourcentage de d'HSPG greffé égal à 86 % de la masse totale utilisée. De plus, la fixation covalente permet une robustesse de colonne avec 1) une capacité supérieure à 500 injections sans changement au niveau du temps de rétention ou

bien du chromatogramme et 2) des capacités de conditions opératoires avec des températures comprises entre 10°C et 40°C et des pH allant jusqu'à 5,5.

La colonne créée a ensuite été mise en œuvre pour :

- 1) l'étude de la liaison entre deux formes de TTR et l'HSPG.
- 2) l'étude de l'effet de la TTR sur la liaison A β /HSPG.

Discussion sur la liaison TTR/HSPG

Pour l'étude de la liaison entre deux formes de TTR et l'HSPG, la comparaison a été effectuée à partir de: une transthyréine sauvage commerciale (wtTTR) et une transthyréine sénile extraite d'un patient mort des suites d'une amylose sénile à la TTR (sTTR). Pour obtenir cette protéine, une collaboration a été faite avec le laboratoire du Professeur Benson à Indianapolis (Etats Unis) qui a permis d'acquérir les connaissances nécessaires dans le domaine de l'extraction protéique et d'obtenir la protéine d'intérêt. Les résultats de cette étude ont confirmé la dépendance au pH de la liaison de la sTTR avec l'HSPG avec la protonation d'un résidu histidine. L'association wtTTR/HSPG se fait via des interactions de van der Waals et hydrogènes quel que soit le pH. La liaison de la sTTR à l'HSPG présente deux mécanismes d'association :

- lorsque le pH est supérieur à 6,5, le mécanisme d'association est similaire à celui de la wtTTR ;
- lorsque le pH est inférieur à 6,5, des interactions de type ioniques et hydrophobes apparaissent du fait de la protonation des AA basiques et de l'implication d'AA aromatiques qui deviennent alors accessibles dans la sTTR.

Le meilleur moyen thérapeutique pour diminuer les dépôts amyloïdes dans les amyloses séniles à la TTR est d'empêcher la formation de sTTR en stabilisant la structure quaternaire de la sTTR. Donc la stabilisation du tétramère est primordiale. Ainsi, la plupart des molécules mises sur le marché ont pour but de stabiliser le tétramère de TTR. Ces molécules sont le Tafamidis[®] et le Diflunisal[®]. Cependant elles ont été développées pour les FAP principalement et les résultats cliniques ne sont pas encore très concluants. La SSA est la forme d'amylose la plus couramment rencontrée, il est donc nécessaire d'étudier les mécanismes qui perturbent la structure quaternaire de la sTTR au-delà des substitutions d'acides aminés afin de pouvoir proposer un traitement possible.

A l'heure actuelle, quelques molécules naturelles telles que le curcumin (Ferreira *et al.*, 2011)¹⁷³ où les ions Cr³⁺ (Adamski-Werner *et al.*, 2004)⁷⁵ se lient à la sTTR et agissent en tant que compétiteur de T4. Les études *in vitro* ont montré une stabilisation de la structure

quaternaire. De nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur le ciblage du gène de la TTR par des ARN interférents (Coelho *et al.*, 2013)⁸¹, des oligonucléotides antisens (Ackerman *et al.*, 2012)⁸⁰, ainsi que des oligonucléotides simples brins (Ando, 2005)⁸² constituent des stratégies thérapeutiques prometteuses pour l'avenir.

Discussion sur l'effet de la TTR sur la liaison Aβ/HSPG

Pour l'étude de l'effet de la TTR sur la liaison Aβ/HSPG, la protéine Aβ (1-40) a été utilisée. Différentes concentrations en TTR (0, 2, 5, 10 et 15 μM) et différents pH (5,5 < pH < 7,4) ont été étudiés afin de déterminer l'effet du pH mais également l'effet de la TTR sur la variation des interactions impliquées dans la liaison Aβ/HSPG. Les résultats ont mis en évidence :

- le mécanisme d'association entre Aβ et l'HSPG suit le même modèle que celui entre la sTTR et l'HSPG.
- ce changement de mécanisme à pH inférieur à 6,5-6 serait dû à la protonation d'une histidine et au résidu Glu22 qui permettraient alors la conversion de l'hélice-α en feuillet-β.

Ces résultats confirment bien le rôle prépondérant du pH avec un mécanisme pH dépendant commun aux amyloses.

- la TTR ne serait pas uniquement une molécule pouvant séquestrer l'Aβ mais elle cliverait celle-ci en petits fragments et permettrait donc un turn-over de la protéine.

La TTR aurait donc un rôle d'inhibiteur dans la MA ce qui expliquerait le faible taux de TTR retrouvé chez les personnes décédées des suites de cette maladie.

La fixation de Aβ sur l'HSPG est l'étape clé de la formation des plaques amyloïdes. Castillo et al (Castillo et al., 1997)¹⁸² ont montré que le HSPG accélérerait le taux de fibrillation Aβ(1-40) et stabilisait les fibrilles amyloïdes déjà formées et ceci via les chaînes GAG du perlécan. Par ailleurs, leur étude montre également, que le perlécan est le seul constituant présent dans les plaques amyloïdes qui accélère le taux de fibrillation de Aβ. De plus, la nature β-plissée originale de Aβ favorise cette agrégation. En effet, physiologiquement au niveau structural, Aβ est constituée d'un domaine C_T qui correspond aux AA 29 à 40 et est riche en AA hydrophobes tels que la valine et la leucine. D'après l'analyse de Chou-Fasman et Kyte & Doolittle (Chou & Fasman, 1978; Kyte & Doolittle, 1982)¹⁷⁸¹⁸³, ces résidus sont retrouvés fréquemment dans les protéines ayant une structure en feuillet β et sont rarement retrouvés dans les hélices α ou les structures aléatoires. Le segment 1-28 est physiologiquement retrouvé sous forme d'hélice α. Donc la structure secondaire de Aβ en solution est formée de feuillets β (1-5, 28-40), d'un tour β (6-8, 22-27) et d'une hélice α (9-21) (Soto *et al.*, 1994). Lorsque le pH descend en dessous de 4 et au-dessus de 7, cette

partie adopte une structure aléatoire. Cependant, lorsque le pH est compris entre 4 et 7, il précipite rapidement en une structure oligomérique en feuillet β (Barrow & Zagorski, 1991)¹⁸⁴. Cependant, le segment hydrophobe C_T adopte invariablement une structure en feuillet β indépendamment du pH et de la température (Barrow & Zagorski, 1992)¹⁸⁵. Nos résultats montrent que la fixation de $A\beta$ à l'HSPG est pH dépendante avec une valeur de pH critique à environ 6,5 qui sont en accord avec l'étude menée par Pirchl (Pirchl *et al.*, 2006)¹⁸⁶. Cette étude qui démontre que les cellules endothéliales des capillaires des cerveaux de rats atteints de la MA sont endommagés lorsque le pH < 6,6, et ne sont pas affectés à pH > 6,6 concluant qu'une courte acidose induirait la mort cellulaire des neurones cholinergiques et pourrait avoir un impact sur le développement de la démence. Une acidose prolongée pourrait contribuer à la dérégulation de $A\beta$ et par conséquent à la déposition en plaques. Lors de la MA, le pH descend en dessous de pH 6,6 et la protéine $A\beta$ s'agrège en feuillet β . Comme la partie C_T , hydrophobe est déjà organisée en feuillet β , c'est la partie N_T qui devient un feuillet β et qui est responsable de l'agrégation et de la formation des fibrilles amyloïdes. La transition de structure d'hélice α en feuillet β a été modélisée (Yamatsuji *et al.*, 1996)¹⁸⁷ et des études de substitutions d'AA suggèrent que les carboxylate et les fonctions imidazoles sont d'importants médiateurs de l'assemblage de $A\beta$. En effet, nos résultats montrent une modification des interactions mises en jeu entre pH 6,5 et 6 avec une protonation. Cet intervalle de pH correspond également au pKa du noyau imidazole du résidu His qui se protonerait et qui pourrait créer des liaisons ioniques avec l'HSPG. En effet, $A\beta$ possède deux His en position 13 et 14 qui font parties de la séquence HHQK, motif possible pour la liaison à l'héparine. Nos résultats sont en accord avec ceux de Lu *et al* (Lu *et al.*, 2013)¹⁸⁸ et ceux de Madine *et al* (Madine *et al.*, 2012)¹⁸⁹. Les liaisons ioniques au niveau de l'HSPG sont essentiellement médiées par la partie sulfatée du GAG. En effet, Castillo *et al* (Castillo *et al*, 1999)¹⁷⁴ ont enlevé tous les groupements sulfates de l'héparine et ont constaté un arrêt complet de la fibrillogénèse d' $A\beta$. Les liaisons peuvent également venir de la partie protéique de PG, le perlécan contient une séquence qui code pour un site d'attachement (Ser-Gly ou Ser-Gly-Asp) et qui pourrait jouer un rôle important dans la formation de plaques amyloïdes (Maresch *et al.*, 1997). Donc, les liaisons ioniques et hydrophobes apparaissant à pH < 6,5 peuvent être créées par les nombreux AA hydrophobes, dont la Val 17 et la Leu18, présents dans $A\beta$ et la Gly. Ces liaisons ioniques et hydrophobes apparaissant permettraient un changement de conformation de la partie N_T en feuillet β permettant l'agrégation et la fibrillisation. Ces données sont en accord avec Valerio *et al* (Valerio *et al.*, 2008)¹⁵³. La fibrillisation de $A\beta$ semble très probablement initier la cascade d'événements conduisant à la

MA. Prévenir, altérer ou inverser la formation des dépôts amyloïdes doit être un axe thérapeutique prioritaire.

Depuis la découverte par Schwarzman en 1994 (Schwarzman *et al.*, 1994)⁶ du rôle de la transthyréine en tant que molécule pouvant lier la protéine A β , de nombreuses études ont été menées afin de vérifier, et comprendre le potentiel rôle de la TTR dans la MA. Il a été constaté que lors du vieillissement, le niveau et la capacité de synthétiser de la TTR diminuent. Les études menées par l'équipe du professeur Murphy ont identifié des sites de fixation sur la TTR. Les premières études ont montré 2 possibles sites de liaison à A β sur la TTR placés sur le feuillet A et l'hélice EF (Du & Murphy, 2010)¹¹⁰. Par la suite d'autres sites de fixation ont été identifiés notamment des AA clés tels que les résidus Leucine 82 et 110 (Fig.59). Le résidu Leu étant situé sur l'hélice EF et la leucine 110 sur le feuillet G. De même, une modification de la Cys10 altérerait l'effet de la TTR sur la liaison à A β . La plupart des études actuelles convergent vers l'hypothèse d'un rôle séquestreur de la TTR.

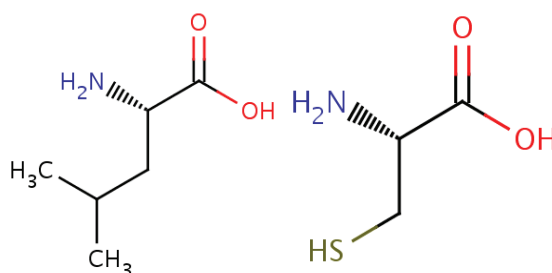


Fig.59. La leucine et la cystéine

Cependant, nos résultats montrent plus on rajoute de la TTR dans le milieu d'incubation plus la quantité de protéine A β diminue. Donc nos résultats approuvent l'étude menée par Costa et al (Costa *et al.*, 2008)¹⁰⁷ qui montre que la TTR est capable de cliver A β en fragments d'une dizaine d'AA après 3h d'incubation (Fig.45). Ce clivage est confirmé par nos données thermodynamiques, les valeurs d'enthalpies et d'entropies deviennent de plus en plus négatives avec la concentration de TTR démontrant que les interactions ioniques et hydrophobes ne peuvent plus se produire.

Ce clivage de A β par la TTR démontre alors que la séquence HHQK est bien indispensable à l'agrégation et à la fibrillisation, de même que les AA Val21 et Glu22. Aussi cela appuie l'hypothèse que la partie N_T doit être sous forme de feuillet β et doit être accompagnée de la partie C_T pour favoriser l'agrégation.

L'activité peptidase de la TTR est déjà connue mais pour d'autres molécule (ApoAI) (Fielding & Fielding, 1995)¹⁹⁰. Cependant son mécanisme catalytique est toujours inconnu.

En conditions physiologiques normales, la TTR jouerait un rôle protecteur de la MA en clivant les peptides A β ce qui préviendrait alors la formation de fibrilles. Dans la MA, le niveau de TTR disponible serait insuffisant pour inhiber l'agrégation de A β sous forme de plaque (Gloekner *et al.*, 2008)¹⁹¹. L'association d'A β avec HSPG pourrait être due à une accumulation d'A β qui ne serait pas dégradée.

Cibler la TTR en tant que potentiel agent thérapeutique ou bien supplémenter la production de TTR diminuant avec l'âge constituerait une voie thérapeutique prometteuse pour traiter un des symptômes la M

L'étude de ces deux amyloses par biochromatographie permet de conclure sur trois points :

- Au niveau technique, la biochromatographie est un outil puissant qui permet d'analyser les paramètres thermodynamiques dans différentes conditions opératoires qui peuvent mimer les conditions biologiques.
- Il existe un mécanisme commun d'interactions entre les protéines amyloïdes et l'HSPG qui est dépendant du pH et qui impliquerait la protonation d'un ou de résidus histidine. Les dépôts amyloïdes étant insolubles en conditions physiologiques, il faut donc agir en amont, i.e, avant le passage dans le système de dégradation en stabilisant la protéine dans sa forme quaternaire originelle ou bien en séquestrant la protéine.
- La TTR présente dans le cerveau permettrait non seulement de séquestrer mais également de cliver la protéine A β . Cette hypothèse est soutenue par la faible concentration de TTR cérébrale par rapport à la concentration en A β . Ainsi, la TTR agirait en tant qu'inhibiteur de la MA.

La TTR a donc un double rôle dans les amyloses : elle est la protéine amyloïde impliquée dans les amyloses à la TTR et elle protégerait le cerveau de la MA en prévenant l'apparition des plaques amyloïdes.

REFERENCES

- (1) Lashuel, H. A.; Lai, Z.; Kelly, J. W. Characterization of the transthyretin acid denaturation pathways by analytical ultracentrifugation: implications for wild-type, V30M, and L55P amyloid fibril formation. *Biochemistry (Mosc.)* **1998**, *37*, 17851–17864.
- (2) Elimova, E.; Kisilevsky, R.; Szarek, W. A.; Ancsin, J. B. Amyloidogenesis recapitulated in cell culture: a peptide inhibitor provides direct evidence for the role of heparan sulfate and suggests a new treatment strategy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2004**, *18*, 1749–1751.
- (3) Vilasi, S.; Sarcina, R.; Maritato, R.; De Simone, A.; Irace, G.; Sirangelo, I. Heparin Induces Harmless Fibril Formation in Amyloidogenic W7FW14F Apomyoglobin and Amyloid Aggregation in Wild-Type Protein In Vitro. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22076.
- (4) Zcharia, E.; Metzger, S.; Chajek-Shaul, T.; Aingorn, H.; Elkin, M.; Friedmann, Y.; Weinstein, T.; Li, J.-P.; Lindahl, U.; Vlodavsky, I. Transgenic expression of mammalian heparanase uncovers physiological functions of heparan sulfate in tissue morphogenesis, vascularization, and feeding behavior. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2004**, *18*, 252–263.
- (5) Bruinsma, I. B.; Riet, L. te; Gevers, T.; Dam, G. B. ten; Kuppevelt, A. H. M. S. M. van; David, G.; Kusters, B.; Waal, R. M. W. de; Verbeek, M. M. Sulfation of heparan sulfate associated with amyloid-beta plaques in patients with Alzheimer's disease. *220* **2010**.
- (6) Schwarzman, A. L.; Gregori, L.; Vitek, M. P.; Lyubski, S.; Strittmatter, W. J.; Enghilde, J. J.; Bhasin, R.; Silverman, J.; Weisgraber, K. H.; Coyle, P. K. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 8368–8372.
- (7) Han, S.-H.; Jung, E. S.; Sohn, J.-H.; Hong, H. J.; Hong, H. S.; Kim, J. W.; Na, D. L.; Kim, M.; Kim, H.; Ha, H. J.; et al. Human serum transthyretin levels correlate inversely with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* **2011**, *25*, 77–84.
- (8) Velayudhan, L.; Killick, R.; Hye, A.; Kinsey, A.; Güntert, A.; Lynham, S.; Ward, M.; Leung, R.; Lourdasamy, A.; To, A. W. M.; et al. Plasma transthyretin as a candidate marker for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* **2012**, *28*, 369–375.
- (9) Rokintansky, C. V. *Handbuch der Pathologischen Anatomie*; Braunmuller and Sedel, 1842.
- (10) Virchow, R. Further reports on the occurrence of plant-like cellulose in man. *Virchows Arch A* **1854**, *6*, 140–144.
- (11) Friedreich, N.; Kekule, A. Zur amyloidoidfrage. In *Virchows Arch Path Anat*; 1859; Vol. 16, pp. 50–65.
- (12) Cornil, M. Sur la dissociation du violet de l'éthylanidine et sa séparation en deux couleurs sous l'influence de certains tissus normaux et pathologiques, en particulier par les tissus en dégénérescence amyloïde, 1875.

- (13) Heschl, R. Eine Hubsche a vista - reaktion auf amyloid degenerirte Gewebe. *Wien Med Wochenschr* **1875**, 25, 713–715.
- (14) Bennhold, H. Eine spezifische Amyloidfaerbung mit Kongorot. *Munch Wed Worchenschr* **1922**, 69, 1537–1538.
- (15) Divry, P.; Florkin, M. Sur les propriétés optiques de l'amyloïde. *CR Soc Biol* **1927**, 97, 1808–1810.
- (16) Westermark, P.; Araki, S.; Benson, M. Nomenclature of amyloid proteins. Report of the meeting of the international nomenclature committee on amyloidosis. August 8-9, 1998. *Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 1999, 63–67.
- (17) Bladen, A.; Nylen, M.; Glenner, G. The ultrastructure of human amyloid as revealed by the negative staining technique. *J Ultrasturcture Res*, 1966, 449–459.
- (18) Skinner, M.; Shirahama, T.; Cohen, A. S.; Deal, C. The aassociation of amyloid P component (AP) with the amyloid fibril: an updated method for amyloid fibril isolation. *Prep Biochem*, 1983, 461–476.
- (19) Pepys, M. B.; Booth, D. R.; Hutchinson, W. L.; Gallimore, J. R.; Collins, I. M.; Hohenester, E. Amyloid P component. A critical review. *Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 1997, 274.
- (20) Hamazaki, H. Ca²⁺-mediated association of human serum amyloid P component with heparan sulfate and dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 1456–1460.
- (21) McLaughlin, R. W.; De Stigter, J. K.; Sikkink, L. A.; Baden, E. M.; Ramirez-Alvarado, M. The effects of sodium sulfate, glycosaminoglycans, and Congo red on the structure, stability, and amyloid formation of an immunoglobulin light-chain protein. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2006**, 15, 1710–1722.
- (22) Ancsin, J. B. Amyloidogenesis: historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans as a major culprit. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* **2003**, 10, 67–79.
- (23) Lindahl, U.; Li, J. Interactions between heparan sulfate and proteins-design and functional implications. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2009**, 276, 105–159.
- (24) Kisilevsky, R.; Ancsin, J. B.; Szarek, W. A.; Petanceska, S. Heparan sulfate as a therapeutic target in amyloidogenesis: prospects and possible complications. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* **2007**, 14, 21–32.
- (25) Athanasou, N. A.; Kokubun, S.; West, L.; Sallie, B.; Puddle, B. Glycosaminoglycans in intervertebral disc amyloid deposits. *Eur. Spine J. Off. Publ. Eur. Spine Soc. Eur. Spinal Deform. Soc. Eur. Sect. Cerv. Spine Res. Soc.* **1995**, 4, 308–312.

- (26) Magnus, J. H.; Husby, G.; Kolset, S. O. Presence of glycosaminoglycans in purified AA type amyloid fibrils associated with juvenile rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **1989**, *48*, 215–219.
- (27) Martin, D. J.; Ramirez-Alvarado, M. Glycosaminoglycans promote fibril formation by amyloidogenic immunoglobulin light chains through a transient interaction. *Biophys. Chem.* **2011**, *158*, 81–89.
- (28) Teilum, G. Pathogenesis of amyloid of the two phase cellular theory of local secretion. *Microbiol Scand* **1964**, *61*, 21.
- (29) Kisilevsky, R.; Gruys, E.; Shirahama, T. Does amyloid enhancing factor (AEF) exist? Is AEF a single biological entity? *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* **1995**, *2*, 128–133.
- (30) Abankwa, G.; Ali-Khan, Z. Alveolar hydatid cyst induced amyloid enhancing factor (AEF): physicochemical properties and abolition of AEF activity by serine protease inhibitors. *Br J Exp Pathol* **1988**, *69*, 279–292.
- (31) Saunders, A.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D. Association of apolipoprotein E allele E4 with late onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **1993**, *43*, 1467–1472.
- (32) Gallo, G.; Wisniewski, T.; Choi-Miura, N. H.; Ghiso, J.; Frangione, B. Potential role of apolipoprotein-E in fibrillogenesis. *Am.J.Pathol* **1994**, *145*, 526–530.
- (33) Sipe, D. Amyloidosis. *Ann Rev Biochem* **1992**, *61*, 947–975.
- (34) Kim, J.; Basak, J. M.; Holtzman, D. M. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* **2009**, *63*, 287–303.
- (35) Husby, G.; Magnus, J.; Marhaug, G. Protein, polysaccharide and ionic interactions in amyloidosis.I. In *Amyloid and amyloidosis*; Parthenon Publishing, 1994; pp. 150–155.
- (36) Rambaran, R. N.; Serpell, L. C. Amyloid fibrils. *Prion* **2008**, *2*, 112–117.
- (37) Murakami, K. amyloids and protein aggregation-analytical methods. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2009.
- (38) Adamcik, J.; Mezzenga, R. Study of amyloid fibrils via atomic force microscopy. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2012**, *17*, 369–376.
- (39) Makin, O. S.; Serpell, L. C. X-ray diffraction studies of amyloid structure. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2005**, *299*, 67–80.
- (40) Briki, F.; Vérine, J.; Doucet, J.; Bénas, P.; Fayard, B.; Delpech, M.; Grateau, G.; Riès-Kautt, M. Synchrotron x-ray microdiffraction reveals intrinsic structural features of amyloid deposits in situ. *Biophys. J.* **2011**, *101*, 486–493.
- (41) Tycko, R. Solid-state NMR studies of amyloid fibril structure. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2011**, *62*, 279–299.

- (42) Cohen, A. S.; Calkins, E. Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* **1959**, *183*, 1202–1203.
- (43) Glenner, G. G. Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). *N Eng J Med* **1980**, *302*, 1283–1292.
- (44) Blake, C.; Serpell, L. Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix. *Struct. Lond. Engl.* **1993**, *4*, 989–998.
- (45) Wille, H.; Zhang, G. F.; Baldwin, M. A.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B. Separation of scrapie prion infectivity from PrP amyloid polymers. *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 608–621.
- (46) Kelly, J. W. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Cur Opin Struct Biol* **1998**, *8*, 101–106.
- (47) Blake, C. C. F.; Swan, I. D. A.; Rerat, C.; Berthou, J.; Laurent, A.; Rerat, B. An X-ray study of the subunit structure of prealbumin. *J. Mol. Biol.* **1971**, *61*, 217–224.
- (48) Magy-Bertrand, N. Les amyloses à transthyréine. *Rev. Médecine Interne* **2007**, *28*, 306–313.
- (49) Kanda, Y.; Goodman, D. S.; Canfield, R. E.; Morgan, F. J. The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *J Biol Chem* **1975**, *249*, 6796–6805.
- (50) Blake, C. C.; Geisow, M. J.; Oatley, S. J.; Rérat, B.; Rérat, C. Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J. Mol. Biol.* **1978**, *121*, 339–356.
- (51) Monaco, H. L.; Rizzi, M.; Coda, A. Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. *Science* **1995**, *268*, 1039–1041.
- (52) Lai, Z.; Colón, W.; Kelly, J. W. The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid. *Biochemistry (Mosc.)* **1996**, *35*, 6470–6482.
- (53) Shinohara, Y.; Mizuguchi, M.; Matsubara, K.; Takeuchi, M.; Matsuura, A.; Aoki, T.; Igarashi, K.; Nagadome, H.; Terada, Y.; Kawano, K. Biophysical analyses of the transthyretin variants, Tyr114His and Tyr116Ser, associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochemistry (Mosc.)* **2003**, *42*, 15053–15060.
- (54) McCutchen, S. L.; Colon, W.; Kelly, J. W. Transthyretin mutation Leu-55-Pro significantly alters tetramer stability and increases amyloidogenicity. *Biochemistry (Mosc.)* **1993**, *32*, 12119–12127.
- (55) Nettleton, E. J.; Sunde, M.; Lai, Z.; Kelly, J. W.; Dobson, C. M.; Robinson, C. V. Protein subunit interactions and structural integrity of amyloidogenic transthyretins: evidence from electrospray mass spectrometry. *J. Mol. Biol.* **1998**, *281*, 553–564.

- (56) Quintas, A.; Vaz, D. C.; Cardoso, I.; Saraiva, M. J. M.; Brito, R. M. M. Tetramer Dissociation and Monomer Partial Unfolding Precedes Protofibril Formation in Amyloidogenic Transthyretin Variants. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 27207–27213.
- (57) Serag, A. A.; Altenbach, C.; Gingery, M.; Hubbell, W. L.; Yeates, T. O. Arrangement of subunits and ordering of β -strands in an amyloid sheet. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2002**, *9*, 734–739.
- (58) Olofsson, A.; Ippel, J. H.; Wijmenga, S. S.; Lundgren, E.; Ohman, A. Probing solvent accessibility of transthyretin amyloid by solution NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 5699–5707.
- (59) Eneqvist, T.; Andersson, K.; Olofsson, A.; Lundgren, E.; Sauer-Eriksson, A. E. The beta-slip: a novel concept in transthyretin amyloidosis. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 1207–1218.
- (60) Ferrao-Gonzales, A. D.; Souto, S. O.; Silva, J. L.; Foguel, D. The preaggregated state of an amyloidogenic protein: Hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 6445–6450.
- (61) Foss, T. R.; Kelker, M. S.; Wiseman, R. L.; Wilson, I. A.; Kelly, J. W. Kinetic Stabilization of the Native State by Protein Engineering: Implications for Inhibition of Transthyretin Amyloidogenesis. *J. Mol. Biol.* **2005**, *347*, 841–854.
- (62) Klabunde, T.; Petrassi, H. M.; Oza, V. B.; Raman, P.; Kelly, J. W.; Sacchettini, J. C. Rational design of potent human transthyretin amyloid disease inhibitors. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 312–321.
- (63) Hammarström, P.; Jiang, X.; Hurshman, A. R.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. Sequence-dependent denaturation energetics: A major determinant in amyloid disease diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99 Suppl 4*, 16427–16432.
- (64) McCutchen, S. L.; Lai, Z.; Miroy, G. J.; Kelly, J. W.; Colón, W. Comparison of lethal and nonlethal transthyretin variants and their relationship to amyloid disease. *Biochemistry (Mosc.)* **1995**, *34*, 13527–13536.
- (65) Hammarström, P.; Wiseman, R. L.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics. *Science* **2003**, *299*, 713–716.
- (66) Rapezzi, C.; Quarta, C. C.; Riva, L.; Longhi, S.; Gallelli, I.; Lorenzini, M.; Ciliberti, P.; Biagini, E.; Salvi, F.; Branzi, A. Transthyretin-related amyloidoses and the heart: a clinical overview. *Nat. Rev. Cardiol.* **2010**, *7*, 398–408.
- (67) Andrade, C. A peculiar form of peripheral neuropathy. Familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* **75**, 408–427.
- (68) Connors, L. H.; Richardson, A. M.; Théberge, R.; Costello, C. E. Tabulation of transthyretin (TTR) variants as of 1/1/2000. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* **2000**, *7*, 54–69.

- (69) Cornwell III, G. G.; Murdoch, W. L.; Kyle, R. A.; Westermarck, P.; Pitkänen, P. Frequency and distribution of senile cardiovascular amyloid. A clinicopathologic correlation. *Am.J.Med* **1983**, *75*, 618–623.
- (70) Pomerance, A. The pathology of senile cardiac amyloidosis. *J. Pathol. Bacteriol.* **1966**, *91*, 357–367.
- (71) Pitkänen, P.; Westermarck, P.; Cornwell, G. G., 3rd. Senile systemic amyloidosis. *Am. J. Pathol.* **1984**, *117*, 391–399.
- (72) Stangou, A. J.; Hawkins, P. N. Liver transplantation in transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy. *Curr. Opin. Neurol.* **2004**, *17*, 615–620.
- (73) Bulawa, C. E.; Connelly, S.; DeVit, M.; Wang, L.; Weigel, C.; Fleming, J. A.; Packman, J.; Powers, E. T.; Wiseman, R. L.; Foss, T. R.; et al. Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *PNAS* **2012**, *109*, 9629–9634.
- (74) Johnson, S. M.; Connelly, S.; Fearn, C.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. The Transthyretin Amyloidoses: From Delineating the Molecular Mechanism of Aggregation Linked to Pathology to a Regulatory-Agency-Approved Drug. *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 185–203.
- (75) Adamski-Werner, S. L.; Palaninathan, S. K.; Sacchettini, J. C.; Kelly, J. W. Diflunisal analogues stabilize the native state of transthyretin. Potent inhibition of amyloidogenesis. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 355–374.
- (76) Kingsbury, J. S.; Laue, T. M.; Klimtchuk, E. S.; Theberge, R.; Costello, C. E.; Connors, L. H. The Modulation of Transthyretin Tetramer Stability by Cysteine 10 Adducts and the Drug Diflunisal. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 11887–11896.
- (77) Gandhi, N. S.; Mancera, R. L. Heparin/heparan sulphate-based drugs. *Drug Discov Today* **2010**, *15*, 1058–1069.
- (78) Kisilevsky, R.; Lemieux, L. J.; Fraser, P. E.; Kong, X.; Hultin, P. G.; Szarek, W. A. Arresting amyloidosis in vivo using small-molecule anionic sulphonates or sulphates: implications for Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 143–148.
- (79) Pepys, M. B.; Herbert, J.; Hutchinson, W. L.; Tennent, G. A.; Lachmann, H. J.; Gallimore, J. R.; Lovat, L. B.; Bartfai, T.; Alanine, A.; Hertel, C.; et al. Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature* **2002**, *417*, 254–259.
- (80) Ackermann, E. J.; Guo, S.; Booten, S.; Alvarado, L.; Benson, M.; Hughes, S.; Monia, B. P. Clinical development of an antisense therapy for the treatment of transthyretin-associated polyneuropathy. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* **2012**, *19*, 43–44.
- (81) Coelho, T.; Adams, D.; Silva, A.; Lozeron, P.; Hawkins, P. N.; Mant, T.; Perez, J.; Chiesa, J.; Warrington, S.; Tranter, E.; et al. Safety and Efficacy of RNAi Therapy for Transthyretin Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 819–829.

- (82) Ando, Y. Liver transplantation and new therapeutic approaches for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Med. Mol. Morphol.* **2005**, 38, 142–154.
- (83) Tanaka, K.; Yamada, T.; Ohyagi, Y.; Asahara, H.; Horiuchi, I.; Kira, J. Suppression of transthyretin expression by ribozymes: a possible therapy for familial amyloidotic polyneuropathy. *J. Neurol. Sci.* **2001**, 183, 79–84.
- (84) Terazaki, H.; Ando, Y.; Fernandes, R.; Yamamura, K.; Maeda, S.; Saraiva, M. J. Immunization in familial amyloidotic polyneuropathy: counteracting deposition by immunization with a Y78F TTR mutant. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **2006**, 86, 23–31.
- (85) Sekijima, Y.; Kelly, J. W.; Ikeda, S. Pathogenesis of and therapeutic strategies to ameliorate the transthyretin amyloidoses. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, 14, 3219–3230.
- (86) Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, 1907.
- (87) Bird, T. D. Alzheimer Disease Overview. In *GeneReviewsTM*; Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Bird, T. D.; Dolan, C. R.; Fong, C.-T.; Smith, R. J.; Stephens, K., Eds.; University of Washington, Seattle: Seattle (WA), 1993.
- (88) Prince, M.; Prina, M.; Guerchet, M. *World Alzheimer Report 2013: Journey of Caring. An analysis of long-term care for dementia*; Alzheimer's Disease International, London, 2013.
- (89) Hardy, J. A.; Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**, 256, 184–185.
- (90) Goedert, M.; Jakes, R.; Crowther, R. A.; Six, J.; Lübke, U.; Vandermeeren, M.; Cras, P.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, 90, 5066–5070.
- (91) Kang, J.; Lemaire, H. G.; Unterbeck, A.; Salbaum, J. M.; Masters, C. L.; Grzeschik, K. H.; Multhaup, G.; Beyreuther, K.; Müller-Hill, B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **1987**, 325, 733–736.
- (92) Dean, L.; McEntyre, J. The neighborhood of Alzheimer's amyloid precursor protein <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2313/figure/A542/?report=objectonly> (accessed May 26, 2014).
- (93) Puglielli, L. Is ACAT a novel pharmacological target for the treatment of Alzheimer's disease? *Drugs Future* **2002**, 27, 863.
- (94) Smith, F.; Talwalker, S.; Gracon, S.; Srirama, M. The use of survival analysis techniques in evaluating the effect of long-term tacrine (Cognex) treatment on nursing home placement and mortality in patients with Alzheimer's disease. *J. Biopharm. Stat.* **1996**, 6, 395–409.

- (95) Pohanka, M. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 - present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, 22, 871–886.
- (96) Birks, J.; Harvey, R. J. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2006**, CD001190.
- (97) Reisberg, B.; Doody, R.; Stöffler, A.; Schmitt, F.; Ferris, S.; Möbius, H. J. Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348, 1333–1341.
- (98) Doody, R. S.; Thomas, R. G.; Farlow, M.; Iwatsubo, T.; Vellas, B.; Joffe, S.; Kieburtz, K.; Raman, R.; Sun, X.; Aisen, P. S.; et al. Phase 3 Trials of Solanezumab for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 370, 311–321.
- (99) Salloway, S.; Sperling, R.; Fox, N. C.; Blennow, K.; Klunk, W.; Raskind, M.; Sabbagh, M.; Honig, L. S.; Porsteinsson, A. P.; Ferris, S.; et al. Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 370, 322–333.
- (100) Li, X.; Buxbaum, J. N. Transthyretin and the brain re-visited: is neuronal synthesis of transthyretin protective in Alzheimer's disease? *Mol. Neurodegener.* **2011**, 6, 79.
- (101) Ribeiro, C. A.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Stability of the Transthyretin Molecule as a Key Factor in the Interaction with A-Beta Peptide - Relevance in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* **2012**, 7, e45368.
- (102) Li, X.; Zhang, X.; Ladiwala, A. R. A.; Du, D.; Yadav, J. K.; Tessier, P. M.; Wright, P. E.; Kelly, J. W.; Buxbaum, J. N. Mechanisms of transthyretin inhibition of β -amyloid aggregation in vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2013**, 33, 19423–19433.
- (103) Goldgaber, D.; Schwarzman, A. I.; Bhasin, R.; Gregori, L.; Schmechel, D.; Saunders, A. M.; Roses, A. D.; Strittmatter, W. J. Sequestration of amyloid beta-peptide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, 695, 139–143.
- (104) Tsuzuki, K.; Fukatsu, R.; Yamaguchi, H.; Tateno, M.; Imai, K.; Fujii, N.; Yamauchi, T. Transthyretin binds amyloid beta peptides, Abeta1-42 and Abeta1-40 to form complex in the autopsied human kidney - possible role of transthyretin for abeta sequestration. *Neurosci. Lett.* **2000**, 281, 171–174.
- (105) Schwarzman, A. L.; Goldgaber, D. Interaction of transthyretin with amyloid beta-protein: binding and inhibition of amyloid formation. *Ciba Found. Symp.* **1996**, 199, 146–160; discussion 160–164.
- (106) Buxbaum, J. N.; Ye, Z.; Reixach, N.; Friske, L.; Levy, C.; Das, P.; Golde, T.; Masliah, E.; Roberts, A. R.; Bartfai, T. Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of Abeta toxicity. *PNAS* **2008**, 105, 2681–2686.
- (107) Costa, R.; Gonçalves, A.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Transthyretin binding to A-Beta peptide--impact on A-Beta fibrillogenesis and toxicity. *FEBS Lett.* **2008**, 582, 936–942.

- (108) Stein, T. D.; Anders, N. J.; DeCarli, C.; Chan, S. L.; Mattson, M. P.; Johnson, J. A. Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2004**, *24*, 7707–7717.
- (109) Choi, S. H.; Leight, S. N.; Lee, V. M.-Y.; Li, T.; Wong, P. C.; Johnson, J. A.; Saraiva, M. J.; Sisodia, S. S. Accelerated A β Deposition in APP^{swe}/PS1 Δ E9 Mice with Hemizygous Deletions of TTR (Transthyretin). *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 7006–7010.
- (110) Du, J.; Murphy, R. M. Characterization of the interaction of β -amyloid with transthyretin monomers and tetramers. *Biochemistry (Mosc.)* **2010**, *49*, 8276–8289.
- (111) Tumova, S.; Woods, A.; Couchman, J. R. Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, *32*, 269–288.
- (112) Cardin, A. D.; Weintraub, H. J. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arterioscler. Dallas Tex* **1989**, *9*, 21–32.
- (113) Sobel, M.; Soler, D. F.; Kermode, J. C.; Harris, R. B. Localization and characterization of a heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8857–8862.
- (114) Hileman, R. E.; Fromm, J. R.; Weiler, J. M.; Linhardt, R. J. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *BioEssays* **1998**, *20*, 156–167.
- (115) Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **1983**, *22*, 2577–2637.
- (116) Patnaik, S. Alignment And Prediction Of Secondary Structures Of Proteins http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/index.php?page=Protein_secondary_structures.
- (117) Leblanc, B. Biochimie des protéines <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca>.
- (118) Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, *354*, 56–58.
- (119) Battigelli, A.; Ménard-Moyon, C.; Da Ros, T.; Prato, M.; Bianco, A. Endowing carbon nanotubes with biological and biomedical properties by chemical modifications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1899–1920.
- (120) Saifuddin, N.; Raziah, A. Z.; Junizah, A. R. Carbon Nanotubes: A Review on Structure and Their Interaction with Proteins. *J. Chem.* **2012**, *2013*, e676815.
- (121) Wong, B. S.; Yoong, S. L.; Jagusiak, A.; Panczyk, T.; Ho, H. K.; Ang, W. H.; Pastorin, G. Carbon nanotubes for delivery of small molecule drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1964–2015.

- (122) Ali-Boucetta, H.; Kostarelos, K. Pharmacology of carbon nanotubes: Toxicokinetics, excretion and tissue accumulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 2111–2119.
- (123) Scheinberg, D. A.; McDevitt, M. R.; Dao, T.; Mulvey, J. J.; Feinberg, E.; Alidori, S. Carbon nanotubes as vaccine scaffolds. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 2016–2022.
- (124) Wu, H.; Shi, H.; Zhang, H.; Wang, X.; Yang, Y.; Yu, C.; Hao, C.; Du, J.; Hu, H.; Yang, S. Prostate stem cell antigen antibody-conjugated multiwalled carbon nanotubes for targeted ultrasound imaging and drug delivery. *Biomaterials* **2014**, *35*, 5369–5380.
- (125) Bates, K.; Kostarelos, K. Carbon nanotubes as vectors for gene therapy: Past achievements, present challenges and future goals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 2023–2033.
- (126) Fabbro, A.; Prato, M.; Ballerini, L. Carbon nanotubes in neuroregeneration and repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 2034–2044.
- (127) Singh, R.; Torti, S. V. Carbon nanotubes in hyperthermia therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 2045–2060.
- (128) Gong, H.; Peng, R.; Liu, Z. Carbon nanotubes for biomedical imaging: The recent advances. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1951–1963.
- (129) Karousis, N.; Tagmatarchis, N.; Tasis, D. Current progress on the chemical modification of carbon nanotubes. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 5366–5397.
- (130) Jeon, I.-Y.; Wook, D.; Ashok, N.; Baek, J.-B. Functionalization of Carbon Nanotubes. In *Carbon Nanotubes - Polymer Nanocomposites*; Yellampalli, S., Ed.; InTech, 2011.
- (131) Daigle, C. C.; Chalupa, D. C.; Gibb, F. R.; Morrow, P. E.; Oberdörster, G.; Utell, M. J.; Frampton, M. W. Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhal. Toxicol.* **2003**, *15*, 539–552.
- (132) Lam, C.-W.; James, J. T.; McCluskey, R.; Hunter, R. L. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **2004**, *77*, 126–134.
- (133) Sturm, R. Clearance of carbon nanotubes in the human respiratory tract—a theoretical approach. *Ann. Transl. Med.* **2014**, *2*.
- (134) Bhattacharya, K.; Andón, F. T.; El-Sayed, R.; Fadeel, B. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on pulmonary inflammation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 2087–2097.
- (135) Andre, C. Traitement thermodynamique de l'équilibre d'association entre une série de pesticides et diverses molécules cibles: approche biochromatographique et applications biologiques, Université de Franche-Comté: 170, 2005.
- (136) Hage, D. S. Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clin Chem* **1999**, *45*, 593–615.

- (137) André, C.; Guillaume, Y. C. Anti-coagulant rodenticide binding properties of human serum albumin: a biochromatographic approach. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **2004**, *801*, 221–227.
- (138) Bagnost, T.; Guillaume, Y. C.; Thomassin, M.; Berthelot, A.; Demougeot, C.; André, C. Biochromatographic framework for analyzing magnesium chloride salt dependence on nor-NOHA binding to arginase enzyme. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **2008**, *873*, 37–40.
- (139) André, C.; Truong, T. T.; Robert, J. F.; Thomassin, M.; Guillaume, Y. C. Construction and evaluation of a humic acid column: implication for pesticide risk assessment. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4201–4206.
- (140) Melander, W.; Horvarth, C. . *In High-Performance Liquid Chromatography; Advances and Perspectives*; Academic Press.; New York, 1986; Vol. 2.
- (141) Guillaume, Y. C.; Guinchard, C.; Berthelot, A. Affinity chromatography study of magnesium and calcium binding to human serum albumin: pH and temperature variations. *Talanta* **2000**, *53*, 561–569.
- (142) Bagnost, T. Intérêt de l'arginase comme nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension artérielle, Université de Franche-Comté, 2010.
- (143) Ranatunga, R.; Vitha, M. F.; Carr, P. W. Mechanistic implications of the equality of compensation temperatures in chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *946*, 47–49.
- (144) Leite, F. Theoretical Models for Surface Forces and Adhesion and Their Measurement Using Atomic Force Microscopy. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 12773–12856.
- (145) Benson, M.; Breall, J.; Liepnieks, J.; Cummings, O. Biochemical Characterization of Amyloid by Endomyocardial Biopsy. *Amyloid* **2009**, *16*, 352–354.
- (146) Pras, M.; Schubert, M.; Zucker-Franklin, D.; Franklin, E. C. The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J. Clin. Invest.* **1968**, *47*, 924–933.
- (147) Liepnieks, J. J.; Kluve-Beckerman, B.; Benson, M. D. Characterization of amyloid A protein in human secondary amyloidosis: the predominant deposition of serum amyloid A1. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1995**, *1270*, 81–86.
- (148) EDMAN, P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* **1949**, *22*, 475.
- (149) Chen, R. J.; Zhang, Y.; Wang, D.; Dai, H. Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *JACS* **2001**, *123*, 3838–3839.
- (150) Girelli, A. M.; Mattei, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *J Chrom B* **2005**, *819*, 3–16.

- (151) Ibrahim, F.; Guillaume, Y. C.; Thomassin, M.; André, C. Magnesium effect on the acetylcholinesterase inhibition mechanism: a molecular chromatographic approach. *Talanta* **2009**, *79*, 804–809.
- (152) Foss, T. R.; Wiseman, R. L.; Kelly, J. W. The pathway by which the tetrameric protein transthyretin dissociates. *Biochemistry (Mosc.)* **2005**, *44*, 15525–15533.
- (153) Valerio, M.; Porcelli, F.; Zbilut, J. P.; Giuliani, A.; Manetti, C.; Conti, F. pH effects on the conformational preferences of amyloid beta-peptide (1-40) in HFIP aqueous solution by NMR spectroscopy. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 833–843.
- (154) Lai, Z.; McCulloch, J.; Lashuel, H. A.; Kelly, J. W. Guanidine hydrochloride-induced denaturation and refolding of transthyretin exhibits a marked hysteresis: equilibria with high kinetic barriers. *Biochemistry (Mosc.)* **1997**, *36*, 10230–10239.
- (155) Wiseman, R. L.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. Partitioning conformational intermediates between competing refolding and aggregation pathways: insights into transthyretin amyloid disease. *Biochemistry (Mosc.)* **2005**, *44*, 16612–16623.
- (156) Jesus, C. S. H.; Vaz, D. C.; Saraiva, M. J. M.; Brito, R. M. M. The V30M Amyloidogenic Mutation Decreases the Rate of Refolding Kinetics of the Tetrameric Protein Transthyretin. *J. Spectrosc.* **2012**, *27*, 343–348.
- (158) De Paz, J. L.; Seeberger, P. H. Deciphering the glycosaminoglycan code with the help of microarrays. *Mol. Biosyst.* **2008**, *4*, 707–711.
- (159) Borza, D. B.; Morgan, W. T. Histidine-proline-rich glycoprotein as a plasma pH sensor. Modulation of its interaction with glycosaminoglycans by pH and metals. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5493–5499.
- (160) Bouchemal, K. New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 960–972.
- (161) Thompson, L. D.; Pantoliano, M. W.; Springer, B. A. Energetic Characterization of the Basic Fibroblast Growth Factor-Heparin Interaction: Identification of the Heparin Binding Domain. *Biochemistry (Mosc.)* **1994**, *33*, 3831–3840.
- (162) Noborn, F.; O’Callaghan, P.; Hermansson, E.; Zhang, X.; Ancsin, J. B.; Damas, A. M.; Dacklin, I.; Presto, J.; Johansson, J.; Saraiva, M. J.; et al. Heparan sulfate/heparin promotes transthyretin fibrillization through selective binding to a basic motif in the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 5584–5589.
- (163) Faham, S.; Hileman, R. E.; Fromm, J. R.; Linhardt, R. J.; Rees, D. C. Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science* **1996**, *271*, 1116–1120.
- (164) Jairajpuri, M. A.; Lu, A.; Desai, U.; Olson, S. T.; Bjork, I.; Bock, S. C. Antithrombin III Phenylalanines 122 and 121 Contribute to Its High Affinity for Heparin and Its Conformational Activation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15941–15950.

- (165) Ross, P. D.; Subramanian, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry (Mosc.)* **1981**, *20*, 3096–3102.
- (166) Narayanan, C.; Dias, C. L. Hydrophobic interactions and hydrogen bonds in β -sheet formation. *ArXiv13084861 Cond-Mat Physicsphysics Q-Bio* **2013**.
- (167) De Carufel, C. A.; Nguyen, P. T.; Sahnouni, S.; Bourgault, S. New insights into the roles of sulfated glycosaminoglycans in islet amyloid polypeptide amyloidogenesis and cytotoxicity. *Biopolymers* **2013**, *100*, 645–655.
- (168) Elimova, E.; Kisilevsky, R.; Ancsin, J. B. Heparan sulfate promotes the aggregation of HDL-associated serum amyloid A: evidence for a proamyloidogenic histidine molecular switch. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2009**, *23*, 3436–3448.
- (169) Brunden, K. R.; Richter-Cook, N. J.; Chaturvedi, N.; Frederickson, R. C. pH-dependent binding of synthetic β -amyloid peptides to glycosaminoglycans. *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 2147–2154.
- (170) Yokoyama, T.; Mizuguchi, M.; Nabeshima, Y.; Kusaka, K.; Yamada, T.; Hosoya, T.; Ohhara, T.; Kurihara, K.; Tomoyori, K.; Tanaka, I.; et al. Hydrogen-bond network and pH sensitivity in transthyretin: Neutron crystal structure of human transthyretin. *J. Struct. Biol.* **2012**, *177*, 283–290.
- (171) Gustavsson, A.; Engström, U.; Westermark, P. Normal transthyretin and synthetic transthyretin fragments form amyloid-like fibrils in vitro. *B B R C* **1991**, *175*, 1159–1164.
- (172) Cataldo, A. M.; Peterhoff, C. M.; Troncoso, J. C.; Gomez-Isla, T.; Hyman, B. T.; Nixon, R. A. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid β deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 277–286.
- (173) Pasternak, S. H.; Callahan, J. W.; Mahuran, D. J. The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid- β production and the pathophysiology of Alzheimer's disease: reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective. *J. Alzheimers Dis. JAD* **2004**, *6*, 53–65.
- (174) Ferreira, N.; Saraiva, M. J.; Almeida, M. R. Natural polyphenols inhibit different steps of the process of transthyretin (TTR) amyloid fibril formation. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 2424–2430.
- (175) Castillo, G. M.; Lukito, W.; Wight, T. N.; Snow, A. D. The sulfate moieties of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of β -amyloid protein fibril formation. *J Neurochem* **1999**, *72*, 1681–1687.
- (176) McLaurin, J.; Franklin, T.; Zhang, X.; Deng, J.; Fraser, P. E. Interactions of Alzheimer amyloid- β peptides with glycosaminoglycans effects on fibril nucleation and growth. *Eur. J. Biochem. FEBS* **1999**, *266*, 1101–1110.
- (177) Narindrasorasak, S.; Lowery, D.; Gonzalez-DeWhitt, P.; Poorman, R. A.; Greenberg, B.; Kisilevsky, R. High affinity interactions between the Alzheimer's β -amyloid

- precursor proteins and the basement membrane form of heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12878–12883.
- (178) Palanivelu, M. K. Inhibition of β -amyloid (1-40) aggregation and neurotoxicity by dendritic polymers. **2012**.
 - (179) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. Prediction of the Secondary Structure of Proteins from their Amino Acid Sequence. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*; Meister, A., Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2006; pp. 45–148.
 - (180) Pagel, K.; Wagner, S. C.; Samedov, K.; von Berlepsch, H.; Böttcher, C.; Koks, B. Random Coils, β -Sheet Ribbons, and α -Helical Fibers: One Peptide Adopting Three Different Secondary Structures at Will. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2196–2197.
 - (181) Liz, M. A.; Faro, C. J.; Saraiva, M. J.; Sousa, M. M. Transthyretin, a new cryptic protease. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 21431–21438.
 - (182) Geneste, A.; Guillaume, Y. C.; Magy-Bertrand, N.; Andre, C. Effect of Transthyretin and pH on A β (1-40)/ Heparan Sulfate Proteoglycan Association, 2013.
 - (183) Castillo, G. M.; Ngo, C.; Cummings, J.; Wight, T. N.; Snow, A. D. Perlecan binds to the beta-amyloid proteins (A β) of Alzheimer's disease, accelerates A β fibril formation, and maintains A β fibril stability. *J Neurochem* **1997**, *69*, 2452–2465.
 - (184) Kyte, J.; Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 105–132.
 - (185) Barrow, C. J.; Zagorski, M. G. Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science* **1991**, *253*, 179–182.
 - (186) Barrow, C. J.; Yasuda, A.; Kenny, P. T.; Zagorski, M. G. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J. Mol. Biol.* **1992**, *225*, 1075–1093.
 - (187) Pirchl, M.; Marksteiner, J.; Humpel, C. Effects of acidosis on brain capillary endothelial cells and cholinergic neurons: relevance to vascular dementia and Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* **2006**, *28*, 657–664.
 - (188) Yamatsuji, T.; Matsui, T.; Okamoto, T.; Komatsuzaki, K.; Takeda, S.; Fukumoto, H.; Iwatsubo, T.; Suzuki, N.; Asami-Odaka, A.; Ireland, S.; et al. G protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. *Science* **1996**, *272*, 1349–1352.
 - (189) Lu, J.-X.; Qiang, W.; Yau, W.-M.; Schwieters, C. D.; Meredith, S. C.; Tycko, R. Molecular Structure of β -Amyloid Fibrils in Alzheimer's Disease Brain Tissue. *Cell* **2013**, *154*, 1257–1268.
 - (190) Madine, J.; Pandya, M. J.; Hicks, M. R.; Rodger, A.; Yates, E. A.; Radford, S. E.; Middleton, D. A. Site-specific identification of an a β fibril-heparin interaction site by using solid-state NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2012**, *51*, 13140–13143.

- (191) Fielding, C. J.; Fielding, P. E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **1995**, *36*, 211–228.
- (192) Gloeckner, S. F.; Meyne, F.; Wagner, F.; Heinemann, U.; Krasnianski, A.; Meissner, B.; Zerr, I. Quantitative analysis of transthyretin, tau and amyloid-beta in patients with dementia. *J. Alzheimers Dis. JAD* **2008**, *14*, 17–25.

ANNEXES

Liste des figures

- Fig.1. Modèle de la fibrille amyloïde β -plissée et antiparallèle décrite par Glenner (Glenner *et al*, 1980)
- Fig.2. Modèle établi par Blake et al (Blake *et al*, 1996) de l'hélice β -plissée
- Fig.3. Structures de A) 3,5,3',5'-tétraiodothyronine (thyroxine, T4) et B) 3,5,3'-triiodothyronine (T3).
- Fig.4. Structure quaternaire de la transthyréline (Blake *et al* et Kanda *et al*)
- Fig.5. Séquence primaire d'un monomère de la transthyréline
- Fig.6. Structure de la TTR avec le RBP (PDB ID: 1rlb, H.L. Monaco *et al.*)
- Fig.7. Mécanisme de dissociation de la transthyréline établi par Foss et al
- Fig.8. Structure du Vindaquel®
- Fig.9. Structure du diflunisal
- Fig.10. Le Tramiprosate ou acide 3-amino-1-propanesulfonique (ou homotaurine ou NC-531)
- Fig.11. Structure de l'Eprodinate®
- Fig.12. Inhibiteurs de SAP (Pepys et al 2002)
- Fig.13. Formation des fibres amyloïdes par clivage successifs de APP
- Fig.14. Fabrication de A β à partir du précurseur APP. Séquence entière de la forme A β (1-42)
- Fig. 15. La Tacrine
- Fig.16. Modèle de structure de l'HSPG. La partie protéique de l'HSPG contient une ou plusieurs chaînes d'HS attachées de façon covalente. Tumova et al
- Fig.17. Hélices α et hélice π . PBD 3QHB
- Fig.18. Structure des feuillets β parallèles et antiparallèles
- Fig.19. Les différents motifs structuraux formant les structures secondaires (Patneik, 2005)¹¹⁶
- Fig.20. Les quatre niveaux structuraux d'une protéine (Leblanc, 2014)¹¹⁷
- Fig.21. Représentation schématique d'une chaîne chromatographique Liquide Haute Performance (CLHP) (André, 2005)¹³⁵
- Fig.22. Schéma de l'interaction d'un ligand L sur le site récepteur de la macromolécule M
- Fig.23. Formation d'une interaction hydrophobe
- Fig.24. Forces coulombiennes. a) force répulsive, b) force attractive
- Fig.25. Liaison hydrogène entre l'oxygène accepteur de H⁺ et l'azote donneur de H⁺
Structure d'un fullerène
- Fig.26. Forces de Keesom : interaction dipôle-dipôle

Formation d'un NTC

Fig.27. Récapitulatif des différentes forces de Van der Waals. (a) Forces de Keesom. (b) Forces de Debye. (c) Forces de London. (d) Résumés des interactions au niveau charges.(Leite et al., 2012)¹⁴⁴

Fig.28. Structure du NTC mono- et du multi- feuillets

Fig.29. Formation d'un NTC

Dégradation d'Edman (AA : acide aminé)

Immobilisation de l'HSPG sur les particules de silice activées par des groupements aminopropyle.

Fig.30. Structure du NTC mono- et du multi- feuillets

Courbe de van't Hoff de la TTR (a:sTTR, b:wtTTR) à pH=7.4.

Fig.31. Fonctionnalisations possibles des NTCs. a)fonctionnalisation défectueuse du NTC, b) attachement covalent de molécules, c) et d) fonctionnalisation non-covalente par adsorption de molécules à leur surface, e) encapsulation de molécules dans la cavité interne des NTCs (Jeon et al., 2010)¹³⁰

Fig.32. Gel de SDS-PAGE de la sTTR

Fig.33. Dégradation d'Edman (AA : acide aminé)

Fig.34. Immobilisation de l'HSPG sur les particules de silice activées par des groupements aminopropyle suivant notre technique (Ibrahim *et al.*, 2009)¹⁵¹

Fig.35. Chromatogrammes de la sTTR a) pH=7 et T=25°C en début d'utilisation de la colonne b)pH=5,5 et T=35°C en fin d'utilisation de la colonne.

Fig.36. Chromatogrammes de TTR à pH=7,4 et T=25°C a) wtTTR b) sTTR (cf §)

Fig.37. Courbe de Van't Hoff de la TTR (■:sTTR, ●:wtTTR)

Fig.38. $\log k'$ versus pH pour la sTTR (◆) et la wtTTR (■) à 25°C.

Fig.39. Chromatogrammes de la wtTTR pour a) T=25°C et pH=7 et b) T=20°C et pH=5,5

Fig.40. Chromatogrammes de la sTTR à a) pH=7,4 et T=25°C et b) pH=7 et T=25°C.

Fig.41. Nombre de protons liés ou éjectés à 298 K pour wtTTR et sTTR

Fig.42. Les trois acides aminés basiques présents dans la séquence 24-35

Fig.43. Séquence en acides aminés des feuillets A et G. Feuille A : acides aminés 11 à 19, feuille G : acides aminés 105 à 112.

Fig.44. Courbes $\ln k'$ versus ΔH° (kJ.mol⁻¹) déterminées pour wtTTR et sTTR à T = 298K.

sTTR : domaine a : ◆ (6,5≤pH≤7,4)

domaine b : ■ (5,5≤pH≤6,5)

Fig.45. Le rôle du système endosome/lysosome et son fonctionnement. ○ : enzymes lysosomales, ● : matériels extracellulaires, — : bactéries, ○ : matériels non dégradés

Fig.46. Hypothèse : devenir respectif de la wtTTR et de la sTTR lors de leur passage dans le système endosome/lysosome. ● : sTTR sous forme tétramérique, ⚡ : sTTR mal dégradée sous forme monomérique amyloïdogène.

Fig.47. Variation du facteur de rétention d'Aβ en fonction du pH ($x=0 \mu\text{M}$) à 25°C

Fig.48. Nombres de protons éjectés ou acceptés en fonction du pH pour Aβ ($x=0 \mu\text{M}$)

Fig.49. Courbes de Van't Hoff de Aβ et de la TTR ($x=0 \mu\text{M}$)

Fig.50. Compensation enthalpie-entropie de l'association Aβ/HSPG à 25°C.

Domaine a : pH 6,5-7,4. Domaine b : pH 5,5-6,5

Fig.51. Variation du facteur de rétention de Aβ en fonction du pH à 25°C avec $x=2$ (■), 5 (▲), 10 (×), ou 15 (✱) μM

Fig.52. Nombres de protons éjectés ou acceptés en fonction du pH pour Aβ avec $x=2$ (■), 5 (▲), 10 (×), ou 15 (✱) μM

Fig.53. Courbes de Van't Hoff de Aβ en présence $x=2$ (■), 5 (▲), 10 (×), ou 15 (✱) μM

Fig.54. Compensation enthalpie-entropie de l'association Aβ/HSPG à 25°C avec $x=2 \mu\text{M}$.

Domaine a : pH 6,5-7,4. Domaine b : pH 5,5-6,5

Fig.55. k' versus x à pH=5,5 et à T= 25°C

Fig.56. Chromatogrammes à pH=7,4 et T=25°C de a) Aβ sans TTR, b) Aβ incubée avec 15 μM de TTR

Fig.57. logA versus logx à pH= 7,4 and pH=5,5

Fig.58. Fragment obtenu de Aβ obtenu après 3h d'incubation avec la TTR (Costa et al., 2010)¹⁰⁷

Fig.59. La leucine et la cystéine

Fig.60. Courbes de Van't Hoff de TTR-NTC à pH 5,5 (✱), 6 (◆), 6,5 (■), 7 (▲) et 7,4 (×)

Fig.61. Compensation enthalpie entropie de l'association entre l'HSPG et wtTTR-NTCs

Fig.62. Nombre de protons mis en jeu lors de l'association entre l'HSPG et wtTT-NTCs à pH compris entre 5,5 et 7,4

Fig.63. log k' vs pH pour la TTR-NTC et la TTR

Fig.64. a) Structure de la wtTTR fonctionnalisée avec le NTC et b) Structure de la wtTTR avec son ligand la thyroxine T4.

Liste des tableaux

Tableau.1. : Les protéines amyloïdes et leurs précurseurs chez l'homme.

Tableau.2. : Configuration des précurseurs des protéines amyloïdes

Tableau.3. : Stratégies thérapeutiques pour les amyloses à la transthyrétine

Tableau.4. : Séquences des sites de liaison à l'héparine retrouvées dans les précurseurs des protéines amyloïdes.

Tableau.5. : Primers utilisés pour le séquençage de la TTR. Toutes les séquences sont données dans le sens 5' $\longrightarrow$ 3'

Tableau. 6. Paramètres thermodynamiques de l'association de sTTR et de wtTTR à l'HSPG à pH=7,4(ΔH° (kJ.mol⁻¹), ΔS° (pas d'unités)). Les écarts-type sont entre parenthèses.

Tableau.7. Paramètres thermodynamiques de l'association de sTTR et de wtTTR à l'HSPG.

(ΔH° (kJ.mol⁻¹), ΔS° (pas d'unités)). Les écarts-type sont entre parenthèses.

Tableau.8.: Valeurs de l'enthalpie et de l'entropie de l'association A β /HSPG (ΔH° en kJ/mol, ΔS° sans unité) ($x=0$ μ M)

Tableau.9. : Températures de compensation de A β + $x = 0$ μ M

Tableau.10. : Valeurs de l'enthalpie et de l'entropie de l'association A β /HSPG (ΔH° en kJ/mol, ΔS° sans unité) pour $x=2, 5, 10$ et 15 μ M

Tableau.11. : Températures de compensation de A β + $x = 2, 5, 10$ et 15 μ M

Tableau.12. Aire des pics chromatographiques de A β avec $x=0, 2, 5, 10$ et 15 μ M

Tableau.13. : Valeurs des k' pour la wtTTR, les NTCs et wtTTR-NTCs à pH 5,5 et 7,4

Tableau.14. : Valeurs des paramètres thermodynamiques ΔH° et ΔS° pour wtTTR et TTR-NTC à pH 5,5; 6; 6,5; 7 et 7,4 (ΔH° en kJ/mol, ΔS° sans unité)

Liste des congrès

-XIII International Symposium on Amyloidosis Groningen, Pays Bas, 6-10 Mai 2012:

Poster: Transthyretin binding to heparan sulfate proteoglycan: differences between a commercial transthyretin and a senile amyloidogenic transthyretin: a biochromatographic study.

-Forum des jeunes chercheurs, Besançon, France 6-7 Septembre 2012 :

Poster : Etude de la liaison entre l'héparane sulfate protéoglycane et la transthyrétine. Rôle dans les amyloses.

- Forum des jeunes chercheurs, Dijon, France, 13-14 Juin 2013 :

Communication : La transthyrétine = double rôle dans les amyloses.

- Congrès SEP Paris, France, 4-7 Juin 2013 :

Poster: Etude biochromatographique de l'influence de la transthyrétine sur la liaison bêta-amyloïde/héparane sulfate protéoglycane

-AAPS (American Association of Pharmaceutical Sciences), San Antonio, Etats- Unis, 10-14 Novembre 2013:

Poster: Effect of Transthyretin and pH on A β (1-40)/Heparan Sulfate Proteoglycan association

Publications

Ces travaux ont donné lieu à deux publications:

- Une publication acceptée à Biomedical Chromatography.

Thermodynamic study of transthyretin association (wild type and senile forms) with heparan sulfate proteoglycan: pH effect and implication of the reactive histidine residue.

- Une publication acceptée dans Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis

The protease activity of transthyretin reverses the effect of pH on the amyloid- β protein/heparan sulfate proteoglycan interaction: A biochromatographic study.

Thermodynamic study of transthyretin association (wild type and senile forms) with heparan sulfate proteoglycan: pH effect and implication of the reactive histidine residue.

Ambre Geneste¹, Claire André¹, Nadine Magy-Bertrand^{1,2}, Lydie Lethier¹, Tijani Gharbi¹, Yves Claude Guillaume^{1,3}

1 Université de Franche-Comté, UFR SMP, EA 4662 : Nanomedecine, Imagery Therapeutic Lab”, Laboratoire de Chimie Analytique Bioanalytique et Physique, 25030 Besançon, cedex France.

2 Département de Médecine Interne, CHRU Besançon, 25030 Besançon, cedex France.

3 Pôle Pharmacie, CHRU Besançon, 25030 Besançon, cedex France

Abstract

The tetramer destabilization of transthyretin into monomers and its fibrillation are phenomena leading to amyloid deposition. Heparan sulfate proteoglycan (HSPG) has been found in all amyloid deposits. A chromatographic approach was developed to compare binding parameters between wild type transthyretin (wtTTR) and an amyloidogenic transthyretin (sTTR). Results showed a greater affinity of sTTR for HSPG at pH 7.4 compared to wtTTR due to the monomeric form of sTTR. Analysis of the thermodynamic parameters showed that van der Waals interactions were involved at the complex interface for both transthyretin forms. For sTTR, results from the plot representing the number of protons exchanged versus pH showed that the binding mechanism was pH-dependent with a critical value at a pH 6.5. This observation was due to the protonation of a histidine residue as an imidazolium cation, which was not accessible when TTR was in its tetrameric structure. At pH > 6.5, dehydration at the binding interface and several contacts between non polar groups of sTTR and HSPG were also coupled to binding for an optimal hydrogen bond networks. At pH < 6.5, the protonation of the His residue from sTTR monomer when pH decreased broke the hydrogen-bond network, led to its destabilization and thus produced slight conformational changes in the sTTR monomer structure.

Key Words: Amyloidogenic Protein - Transthyretin - Heparan Sulfate Proteoglycan

1. Introduction

Human transthyretin (wild type transthyretin: wtTTR), formerly called prealbumin, is a plasmatic protein (concentration in serum of around 21 to 31 mg.dL⁻¹ (Buxbaum, 2007). Its tetrameric structure (fig.1) is composed of four identical 14-kDa subunits (Blake *et al*, 1971), and each subunit exhibits a high percentage of β -sheets. The misfolding and aggregation of the TTR is known to be associated with TTR amyloidoses (ATTR) (Lindhal *et al*, 2009). Deposition of TTR amyloid fibrils is linked to two different amyloid diseases: senile systemic amyloidosis (SSA) and mutated TTR amyloidosis (Buxbaum, 2007). SSA presents a cardiomyopathy, which results from the deposition wtTTR (Gibbons *et al*, 1988, Gustavsson *et al*, 1994). Amyloidosis is a clinical disorder caused by extracellular deposition of abnormal amyloid fibrils that alter the normal function of tissues. Amyloid fibrils are constituted by insoluble fibrous protein aggregates with a cross β -sheet structure associated with other proteins (Eanes *et al*, 1968). The mechanism of amyloid fibril formation is still unclear and it is assumed that under denaturing conditions, and much more slowly under physiological conditions, TTR is able to dissociate into monomer or dimer and partially or totally misfold with the loss of a significant portion of its native secondary structure allowing the process of amyloidogenesis to begin (Fig.1.) (Lai *et al*, 1996; Foss *et al*, 2005). This phenomenon results in a variety of aggregated morphologies including amyloid fibrils. Physiologically, TTR should pass into the lysosomes or the endosomes ($5 < \text{pH} < 6.5$) to be destroyed (Cuervo *et al*, 2000). The hypothetical pathway in TTR amyloidoses (Baires *et al*, 1998; Colon *et al*, 1991) is that when TTR goes into the endosome/lysosome system, the protein is not in the correct conformation and the degradation is not effective. TTR is then released in the extracellular component misfold. Moreover, *in vitro* studies have shown that at a pH above 5.1, wtTTR normally remains a tetramer (Colon *et al*, 1991). pH must be more acidic (pH 5 to 3.9) to allow a slow dissociation of wtTTR into monomers and the beginning of the misfolding process (Shinohara *et al*, 2003) in physiological conditions. The tetramer was not dissociated in biological conditions in non-denaturant conditions (Lai *et al*, 1997) due to the half-life of about 293 years. Amyloid deposits are composed of a set of components that have been found in all amyloids, including the amyloid enhancing factor (AEF), proteoglycans (i.e heparan sulfate proteoglycan mainly), laminin, entactin, collagen IV, and apo E4 (Xhang *et al*, 2010). Heparan sulfate proteoglycan (HSPG), found ubiquitously at the cell surface of all animal cells, is a major component of extracellular matrices (Gibbons *et al*, 1988) and contributes to the development and homeostasis processes by directing specific cell signaling events. HS is a carbohydrate polymer with sulfate moieties and is one of the most abundant complex glycans

(Tumova *et al*, 2000). HS is reported to be involved in processing amyloid precursor proteins and to mediate amyloid toxicity. HSPG has been demonstrated to accelerate the *in vitro* fibril formation (Zhang *et al*, 2010). However, understanding its exact role in the pathogenesis of ATTR and protein misfolding diseases remains an open question. It was recently proposed that glycosaminoglycans (GAG)/HS act as a scaffold for the growth of amyloid fibrils, based on interactions between the sulfate groups of the GAG and the amyloidogenic proteins (Vilasi *et al*, 2011). Little is known about the *in vivo* amyloid protein-HSPG interactions. Due to the probable major role played by HSPG in *in vivo* amyloidogenesis, it is a valid target for anti-amyloid therapy. Numerous biochemical studies have been conducted and have demonstrated the importance of the basic amino acids in the interactions (Noborn *et al*, 2011). However, in some cases, (Lindhal *et al*, 2010; Yokoyama *et al*, 2012), electrostatic interactions cannot explain all of the bound TTR-HSPG and the structural changes. The protein binding is generally mediated via the HS chains, but it can involve the core protein. A quantitative description of the forces governing molecular associations requires determining the variations of all the thermodynamic parameters, including the enthalpy (ΔH°) and entropy (ΔS°) of the binding process. Understanding the different interactions involved between wtTTR and sTTR with HSPG could improve our knowledge of the fibril formation pathway and therefore clarify the amyloidogenesis process.

2. Theory

2.1. Langmuir distribution isotherms

The determination of the Langmuir distribution isotherms was described in a previous study for the analysis of binding sites of a series of acetylcholine esterase inhibitors on an acetylcholine esterase stationary phase (Ibrahim *et al*, 2009). For this purpose, the perturbation technique was used (Huber *et al*, 1971; Jandera *et al*, 2001; Andre *et al*, 2003). This method makes it possible to determine the adsorption isotherms by measuring the retention times of small sample sizes injected onto a column equilibrated with sample solutions at different concentration levels. In short, the column is firstly equilibrated with a solution containing a single (or several) compound dissolved in a non - absorbable solvent. Then a sample volume containing different concentrations of the single (or several) compounds is injected onto the column. After the injection, the equilibrium condition is disturbed, the perturbation waves reach the column outlet, and a single (or several peaks) are recorded by the detector. For the determination of a single-component Langmuir isotherm, the

solute retention factor (k), which is directly proportional to the slope of its adsorption isotherm, is given by the following equation:

$$k' = \frac{t - t_0}{t_0} = \phi \frac{dC_s}{dC_m} = \phi \left(\frac{\alpha K}{(1 + KC_m)^2} \right) \quad (1)$$

Where C_s and C_m are respectively the total concentration of the sample in the HSPG stationary phase and in the mobile phase, α is the column saturation capacity; K the adsorption constant between the solute molecule and the HSPG stationary phase and ϕ the column phase ratio. By plotting the k' value versus the sample concentration in the mobile phase, the constant K can be determined using equation (1). In contrast, the application of the perturbation technique to a two-component isotherms is less straightforward because although two peaks were observed, the peaks cannot be attributed to the compounds A or B as each peak corresponds to the perturbation of the concentrations of the two sample compounds (Jandera *et al*, 2001). The expected elution times of the two disturbances, t_{R1calc} and t_{R2calc} can be obtained by the following relations:

$$t_{R1calc} = t_0 \left[1 + \phi \left(\frac{\partial C_{sA}}{\partial C_{mA}} + \frac{\partial C_{sA}}{\partial C_{mB}} \left(\frac{dC_{mB}}{dC_{mA}} \right)_1 \right) \right] \quad (2)$$

$$t_{R2calc} = t_0 \left[1 + \phi \left(\frac{\partial C_{sA}}{\partial C_{mA}} + \frac{\partial C_{sA}}{\partial C_{mB}} \left(\frac{dC_{mB}}{dC_{mA}} \right)_2 \right) \right] \quad (3)$$

where t_0 is the column hold up time. For the two-component competitive Langmuir distribution isotherms, the following equations are obtained (Jandera *et al*, 2001)

$$\frac{\partial C_{sA}}{\partial C_{mA}} = \frac{\alpha_A K_A (1 + K_B C_{mB})}{(1 + K_A C_{mA} + K_B C_{mB})^2} \quad (4)$$

$$\frac{\partial C_{sA}}{\partial C_{mB}} = \frac{-\alpha_A K_A (K_B C_{mA})}{(1 + K_A C_{mA} + K_B C_{mB})^2} \quad (5)$$

Analogous equations were obtained for $\partial C_{sB} / \partial C_{mB}$ and $\partial C_{sB} / \partial C_{mA}$. After this substitution, Eq.2 and 3 enable the calculation of the expected retention times of perturbations using the estimated coefficients of the two component Langmuir distribution isotherm α , K_A and K_B . The retention times calculated in this way, t_{R1calc} and t_{R2calc} are compared with the

experimental values of the retention times for all perturbation experiments at different combinations of concentrations C_{mA} and C_{mB} . As there are more experimental retention times measured by perturbation injections of a mixed sample than unknown variables, numerical solution is employed to determine the isotherm coefficients yielding minimum squares of the difference between calculated and experimental retention times, $t_{R1calc} - t_{R1exp}$ and $t_{R2calc} - t_{R2exp}$ at various combinations of C_{mA} and C_{mB} . To this aim, the initial estimates of the isotherm coefficients are subsequently corrected in repeated iterative calculation steps using the Marquardt method of minimization of the objective function OF:

$$OF = \sum_{p=1}^p (t_{R1calc} - t_{R1exp})^2 + \sum_{p=1}^p (t_{R2calc} - t_{R2exp})^2 \quad (6)$$

where p is the number of all perturbation experiments. The values of the best fit competitive isotherm coefficients corresponding to the minimum OF represent the desired solution for the competitive Langmuir isotherm. The initial estimated values of the isotherm coefficients for the calculation of t_{R1calc} and t_{R2calc} can be set equal to the single component isotherm coefficients (Jandera et al, 2001).

2.2. Thermodynamic approach

The k' retention factor of each TTR form can be also expressed by the well known equation (Andre et al, 2004)

$$\ln k' = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ \quad (7)$$

In this equation, $\Delta S^\circ = \Delta S^\circ/R + \ln \phi$, where R is the gas constant, T is the column temperature in Kelvin, ϕ is the column phase ratio and ΔH° and ΔS° are the solute enthalpy and entropy variations occurring during the transfer of wtTTR or sTTR from the bulk solvent to the HSPG surface, respectively. If the HSPG stationary phase, wtTTR, sTTR and solvent properties are temperature invariant, a linear van't Hoff plot is obtained, and ΔH° and ΔS° can be calculated from the slope and intercept.

3. Experimental

3.1. Reagents

Heparan sulfate proteoglycan (HSPG), isolated from the basement membrane of Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma (molecular weight >500 kDa), and transthyretin, from human plasma (wtTTR), were obtained from Sigma-Aldrich (Paris, France). Amyloidogenic transthyretin (senil transthyretin= sTTR) was obtained via the method described below (see

3.2.). Potassium dihydrogen phosphate and dipotassium hydrogen phosphate, used for the preparation of the mobile phases, were of analytical grade and purchased from Merck (Paris, France).

3.2. Isolation of amyloid fibrils from ground tissue and characterization of the amyloid protein

The isolation and characterization of the amyloid fibrils were realized in Dpt-Pathology and Lab Medecine: Benson Merrill DMD, 635 Barnhill Dr Indianapolis, IN 462021 Etats Unis, under the guidance of Pr Benson.

3.2.1. Isolation of amyloid fibrils

The amyloid-laden tissues from an 80 year old man, who died of cardiac failure with an SSA, were obtained post-mortem and stored and frozen until the time of preparation. The diagnosis of amyloidosis was confirmed by Congo red staining, which showed a characteristic apple-green birefringence (Westermarck *et al*, 2005). The heart tissue, used for the isolation of amyloid fibrils, was modified by using the procedure of Pras *et al* (Pras *et al.*, 1968). Approximately 37 g of heart were fragmented with a mortar, suspended in a 0.1 M sodium citrate buffer and homogenized in a tissue grinder. After centrifugation at 12,000 RPM for 30 minutes at 8°C, the supernatant was removed and the pellet was resuspended and homogenized four more times with a NaCl/Citrate buffer. 3 or 4 washes were carried out with a NaCl buffer until the absorbance at 280 nm of the supernatant was down to 0.1-0.07. Then, 4 water washes with one hour spin were performed. All water washes and the final pellet were put into dialysis using MWCO 3500 tubing, against water at 4°C. The final pellet was lyophilized overnight.

3.2.2. Isolation of the amyloid subunit protein

The obtained pellet was suspended in 3 mL of 6-8 M guanidine hydrochloride (HCl), 0.5 M Tris (pH 8.2-8.3) containing 1 mg EDTA mL⁻¹, then reduced for a couple of days with 10 mg/mL dithiothreitol at room temperature, alkylated with iodoacetic acid and stirred during 30 minutes. 25µL of β-mercaptoethanol were added and insoluble material was removed by centrifugation at 12,000 RPM at 4°C for one hour: the pellet was discarded. The supernatant was fractionated by size-exclusion chromatography on a Sepharose CL-6B column equilibrated with 4M guanidine-HCl and 0.05M Tris (pH 8.2). The fractions were then lyophilized.

3.2.3. Characterization of the protein

A SDS-PAGE analysis using the Laemmli's method (Liepnieks *et al*, 1995) followed by a Western-Blot was used to confirm the protein. The protein was then submitted to the Edman degradation to determine peptide sequence (Benson *et al*, 2009).

3.3 Chromatography

The HPLC system consisted of a Shimadzu LC-10ATvp pump (Champs-sur-Marne, France), a Rheodyne 7725 injection valve (Cotati, CA, USA) fitted with a 20 μ L sample loop, and a Shimadzu UV-visible detector. The MODULO-CART HS UPTISPHERE 3 NH₂ (50 $\times$ 4.6 mm ID), where the amino support (terminal -NH₂ groups) was bound onto 3 μ m silica, particle size of 120 Å pore diameter (i.e. the AP column), was purchased from Interchim (Montluçon, France). The preparation of the HSPG column via the *in situ* technique is described below (see 3.4)

3.4. Covalent immobilization technique of HSPG on silica-NH₂ particles

The “*in situ*” immobilization technique was used to prepare this new HSPG column. The immobilization of HSPG, via the amino groups of the protein, onto an amino propyl silica (Girelli *et al*, 2005) pre-packed column (i.e. the commercial AP column), by the Schiff base method activated with glutaraldehyde, was carried out as follows. Firstly, the column was washed with phosphate buffer saline (PBS), pH 6.5, for 30 min at a flow-rate of 0.5 mL/min. Then the silica-NH₂ particles were activated by recycling 10% of glutaraldehyde in PBS for 10 h at the same flow-rate, followed by washing with PBS during 1 h. A solution of 200 μ g of HSPG was dissolved in 50 mL of PBS and this solution continuously circulated through the column at a flow-rate of 0.3 mL/min for at least 24 h. The column was then washed with PBS for 1 h and 0.1 M of sodium cyanoborohydride in 100 mL PBS circulated during 5 h for reductive amination. The column was then washed with PBS for 1 h and a solution of 0.2 M ethanolamine was injected for 3 h to deactivate the aldehyde groups. To finish, 0.1 % of sodium azide circulated during 1 h for column conservation purposes. HSPG immobilized onto the silica-NH₂ particles and formed the stationary phase. The total mass of HSPG (192 μ g) in the column was determined by elemental analysis. For this analysis, four fractions of the stationary phase were removed from the head to the end of the column. The maximum relative difference of the amount of immobilized HSPG between these different

measurements was always 0.5 %, therefore providing a homogeneous HSPG distribution in the column from the ends to the centre.

3.5. Operating conditions for the thermodynamic approach

The binding of both TTR forms to HSPG has been examined in this work by injecting the proteins into the HSPG column. The mobile phase consisted of a phosphate buffer (0.01 M). The phosphate buffer was prepared by mixing equimolar solutions of mono- and dibasic sodium phosphate to produce the desired eluent pH adjusted to values equal to 5.5, 6, 6.5, 7 and 7.4. The experiments were carried out over the temperature 283-313K range and at a detection wavelength of 214 nm. The chromatographic system was allowed to equilibrate at each temperature for at least 1 h prior to each experiment. To study this equilibrium, the retention time of each TTR form was measured every hour for 5h and again after 23 and 24h. The maximum relative difference of the retention of each form was always 5% making the chromatographic system sufficiently equilibrated for use after 1h. Throughout the study, the flow-rate was maintained constant and equal to 0.3 mL/min. 20 μ L of the most concentrated sample was injected and the retention time was measured at each temperature and pH.

3.6 Operating conditions for the Langmuir approach

The mobile phases were prepared by mixing the components in the required ratios and degazed by ultrasonication before use. Single component isotherms of wtTTR and sTTR (each in the concentration range 0.01-0.1 mol/L) and a two component isotherms of a mixture of wtTTR and sTTR (at a constant concentration ratio (0.01:0.01 to 0.1:0.1 mol/L) were measured in a phosphate buffer (0.01M)-pH=7.4 at 20°C. Each isotherm data point was measured in 11 subsequent steps after equilibrium of the column with a solution containing a sample compound wtTTR or sTTR (0, 0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.0125, 0.015, 0.0175, 0.02, 0.0225, 0.025 mol/L) or of a mixture of wtTTR and sTTR ($C_{wtTTR} + C_{sTTR} = 0, 0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.0125, 0.015, 0.0175, 0.02, 0.0225, 0.025$ mol/L) until a stable detector response obtained. Small volume 5 μ L of the most concentrated sample was injected on to the column and the apparent retention time was measured.

4. Results

4.1. SDS page analysis

The SDS page analysis was given in Fig.2. The amino acid sequence analysis identified TTR with no mutation as the amyloid, therefore proving the diagnosis of senile systemic amyloidosis. Results were identical to those obtained by Benson et al (Benson *et al*, 2009).

4.2. Structure of the sTTR

The guanidine-HCl, at concentration 6-8 M (Lai *et al*, 1997), dissociated the TTR tetramer into monomers and denatured the monomer. However Lai *et al* (Lai *et al*, 1997) showed that when the concentration of Guanidine-HCl decreased, the forward and the reverse reaction could be possible but not in the same conditions. Jesus *et al* (Jesus *et al*, 2012) measured the refolding kinetics of the TTR and their results showed that the unfolded TTR was able to refold completely but after at least 12h in a refolding buffer. In our case, the solution was directly lyophilized. Moreover, the partitioning of protein into the pathways aggregation or reassembly depends on three parameters: 1) The relative concentrations of natively folded monomer and the amyloidogenic intermediate, 2) the relative rate constants of the reassembly and aggregation process, and 3) the relative concentrations of reassembly intermediates and soluble TTR aggregates (Wiseman *et al*, 2008). The reassembly pathway was initiated by natively folded monomer. As our solution originated from amyloid fibrils was reduced and alkylated, it didn't contain any natively folded monomer; we could conclude that sTTR might be in a monomeric partially unfolded form and couldn't refold again in its native quaternary structure.

4.3. Competitive bi-Langmuir approach and column stability

The single component distribution data of wtTTR and sTTR were measured by the perturbation technique. The Langmuir model (Eq.1) was found to describe adequately the experimental data (non-linear coefficients were always higher than 0.997). The best values of the constants of Eq.1 obtained by nonlinear regression were calculated. The column saturation factor for wtTTR and sTTR were respectively equal to 124 and 165 respectively. The experiments for the determination of the two-component Langmuir isotherms, were carried out with various wtTTR and sTTR concentrations in the bulk solvent. The retention times of the two induced responses, t_{R1} and t_{R2} were obtained. For the evaluation of the coefficients of the two component Langmuir isotherms, the iterative Marquadt approach was used to fit the best isotherm coefficient values. There is a very good agreement between theoretical and experimental data also confirmed by the low standard deviation for all total isotherm derivative; $\varepsilon = 1.20$. The adsorption constants of wtTTR and sTTR on the HSPG surface i.e.,

K_{wtTTR} and K_{sTTR} values were respectively equal to 1.610^8 and 4.510^8 . Further in this paper, the k' values of wtTTR and sTTR representing their retention on the HSPG stationary phase were thus determined for a sample concentration in the mobile phase equal to zero; i.e. $C_m = 0$. Un example of chromatogram was given in Fig.3. for wtTTR and sTTR at a physiological pH.

4.4. Thermodynamic data of the association process

All the experiments were repeated at least three times and the variation coefficients of the k' values were all less than 5 %, therefore indicating a high reproducibility and good stability of the chromatographic systems for sTTR and wtTTR. The van't Hoff plots ($\ln k'$ vs $1/T$) obtained, for each pH value, were all linear for both wtTTR and sTTR (Fig.4.). The correlation coefficients for the linear fits were in excess of 0.98. The slope and intercept of the linear plot of $\ln k'$ against $1/T$ were used to calculate ΔH° and ΔS° . Table.1 showed ΔH° and ΔS° values for both TTR forms at all pH values being studied.

An additional thermodynamic approach to analyze the physicochemical process between TTR and HSPG was enthalpy–entropy compensation (Guillaume *et al*, 1999). This investigation tool has been previously used in chromatographic procedures to analyze and compare the retention or complexation mechanism for a group of compounds. Mathematically, the enthalpy–entropy compensation could be expressed by the following equation:

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{\beta} \right) - \frac{\Delta G^\circ_\beta}{R\beta} - \ln \Phi \quad (8)$$

ΔG°_β was the corresponding Gibbs free energy variation at the compensation temperature β . A $\ln k'$ plot (for $T = 298$ K), calculated for each TTR form, versus $-\Delta H^\circ$ was drawn. For wtTTR, the plot was linear with a determination coefficient, r^2 , for the linear fit equal to 0.92 (Fig.5.). This correlation can be regarded as an adequate verification of enthalpy-entropy compensation. However, for sTTR, the plot contained a break at a critical ΔH° value ($\Delta H^\circ = -10.06$ kJ/mol) (Fig.5.). Two distinct domains, a (pH 6.5 to pH 7.4) and b (pH 5.5 to pH 6.5), were thus exhibited.

The regression lines for the two proteins were:

$$\text{For wtTTR: } \ln k' = 0.097 \Delta H^\circ + 2,112 \quad r^2 = 0.91 \quad (9)$$

$$\text{For sTTR: } \ln k'(a) = -0.457 \Delta H^\circ - 2.636 \quad r^2 = 0.98 \quad (10)$$

$$\ln k'(b) = 0.630 \Delta H^\circ + 8,126 \quad r^2 = 0.89 \quad (11)$$

It appeared that the slopes were different and exhibited different β compensation temperatures, calculated from the slope of previous straight lines, of 1230 K for wtTTR and of -190 K and 262 K for sTTR, for domains a and b, respectively.

4.5. Bulk solvent pH effects

When the pH of the bulk solvent changed, a fuller description was essential, which explicitly maintained the conservation of mass of each species and took into account the binding of H^+ to the TTR, HSPG and TTR-HSPG complex:



where $n_{H^+} = C - (A+B)$ was the number of protons linked to this TTR association reaction to HSPG.

n_{H^+} could be calculated using the following equation:

$$\frac{\partial \log k'}{\partial pH} = n_{H^+} \quad (13)$$

Fig.6. reported, at 303K, all the data acquired on the variations of the retention factors of TTR when the bulk solvent pH increased from 5.5 to 7.4. Looking at the experimental data, the trends were not linear. This is highlighted by the following quadratic function:

$$\log k' = \log k'_0 + \lambda_1 pH + \lambda_2 pH^2 \quad (14)$$

where k'_0 was the retention factor extrapolated at $pH=0$ and $\lambda_{1,2}$ were constants related to the structure of TTR. These constants were determined from the non-linear $\log k'$ versus pH plot by using Eq.(14) for sTTR and wtTTR. For example, the $\log k'_0$, λ_1 , and λ_2 were equal to 2.909, -0.905 and 0.078, respectively, with $r^2=0.983$ for sTTR at 303K, and to 3.818, -0.719 and 0.029, respectively, with $r^2=0.999$ for wtTTR. From Eq.(13), the slope of the $\log k'$ versus pH curve gave the number of protons H^+ (n_{H^+}) linked to the TTR association reaction to HSPG and its variation according to the pH (Fig.7.).

5. Discussion

5.1 Association mechanism of wtTTR/HSPG

The effect of pH on the wtTTR/HSPG association was examined. For wtTTR, the van't Hoff plot (Fig.4.) showed that the plots were all linear for all pH studies, which meant that there was no change in the association mechanism of wtTTR/HSPG in relation to temperature. This result was confirmed by enthalpy-entropy compensation (Fig.5.) with a linear fit demonstrating that the wtTTR/HSPG association was not dependent on the wtTTR structure.

This result also confirmed that, at pH>5.1, wtTTR was unable to form fibrils and remained a tetramer (Lashuel *et al*, 1998). Related ΔH° and ΔS° values were given in Table.1. The thermodynamic parameters were all negative and decreased linearly with the pH (for example at pH=5.5 $\Delta H^\circ = -9.78$ kJ/mol, at pH = 7.4 $\Delta H^\circ = -13.48$ kJ/mol). These values showed that the association mechanism was enthalpy-driven and the preponderant bonds involved in the wtTTR/HSPG interaction were van der Waals and hydrogen-type bonds. The sulfur or oxygen atoms of heparan sulfate could create van der Waals interactions with the aromatic amino acids of wtTTR, such as reported in many examples (Raman *et al*, 2003). In addition, TTR contained an asparagine amino acid, which could form a hydrogen bond via its hydrogen binding-amide containing a side chain with hydroxyl or the carboxylic group of the iduronic acid of the GAG. It has been known for several years that the interactions between ionic species in aqueous solution are characterized by small positive enthalpy changes and positive entropy changes (Ross *et al*, 1981; Guillaume *et al*, 1999). Thompson *et al* (Thompson *et al*, 1994) reported that only 30 % of the binding free energy between the FGF2 and heparin was due to pure electrostatic interactions. This meant that hydrogen bonding and van der Waals forces would make up most of the energy in the interactions but ionic interactions played a secondary role in the binding process. The decrease of the thermodynamic data with pH accompanied by a decrease of the wtTTR binding with HSPG (Fig.6.) was then due to a reduction of the secondary electrostatic interactions between sTTR and the ionizable groups of HSPG. To conclude, the interactions involved in the wtTTR/HSPG association mechanism were principally van der Waals and hydrogen bonds and the wtTTR always remained in a tetrameric form at all pHs being studied. When the pH increased from 5.5 to 7.4 the wtTTR/HSPG binding decrease was due to a reduction of the secondary ionic interactions. When the wtTTR went into the endosome/lysosome system to be destroyed, the acidic pH (5<pH<6.5) caused the complete degradation of the protein which was in its correct tetrameric conformation.

5.2. Association mechanism of sTTR/HSPG

Fig.2. showed that, at pH=7.4, according to the van't Hoff plot, sTTR had a higher affinity for HSPG than wtTTR and the plot for sTTR was also linear at all pH values being studied. This favorable affinity was confirmed by the fact that at pH=7.4, the TTR adsorption constant on the HSPG surface was higher for sTTR ($4.5 \cdot 10^8$) than for wtTTR ($1.6 \cdot 10^8$). This result could be explained by the higher affinity of the monomeric form of sTTR compared to that of the tetrameric form of wtTTR (Noborn *et al*, 2011). Table.2 showed that the association

mechanism sTTR/HSPG was also enthalpy-driven. This means that van der Waals interactions and hydrogen bonding (both characterized by negative enthalpy changes) are engaged at the complex interface confirming strong sTTR/HSPG hydrogen bond networks. However, the curve of $\ln k'$ versus ΔH° (Fig.5.) included a break at pH=6.5. For pH>6.5, when the pH increased, the enthalpic and entropic values increased (for example, $\Delta H^\circ_{\text{pH}6.5} = -12.37$ kJ/mol $\Delta H^\circ_{\text{pH}7.4} = -10.13$ kJ/mol; $\Delta S^\circ_{\text{pH}6.5} = -4.05$, $\Delta S^\circ_{\text{pH}7.4} = -2.80$) which can be justified by hydrophobic forces (Ross et al, 1981). Hydrophobic interactions could be generated by a valine residue, which can form a hydrophobic bond with the N-acetyl group of HSPG (Faham *et al*, 1996). As well, In the association of a protein to a ligand, several contacts between nonpolar groups of sTTR and HSPG are engaged. The interaction between apolar groups of the sTTR monomeric form and HSPG requires their dehydration and thus there is an entropic gain from the transfer of interfacial water into the bulk solvent. For pH<6.5, when pH decreased from 6.5 to 5.5 the enthalpic values increased strongly ($\Delta H^\circ_{\text{pH}5.5} = -12.37$ kJ/mol, $\Delta H^\circ_{\text{pH}6.5} = -8.88$ kJ/mol). These results showed that, at an acidic pH (pH<6.5), ionic interactions appeared in the association mechanism. The ionic interactions could have been created by the 24-35 sequence (PAINVAVHVFRK), known as mutational “hot spot” areas in sTTR (Gustavsson *et al*, 1994). It was partially embedded in the wtTTR and could be reachable in the sTTR monomeric form (Lashuel *et al*, 1998). This sequence contained 3 basic amino acids (histidine, arginine and lysine) and arginine and lysine were nearly always charged positively (pKa arginine = 12.48 and pKa lysine = 10.2). HSPG had high COO⁻ and SO₃⁻ contents, which could interact with these basic amino acids (Paz *et al*, 2008). Moreover, Cardin *et al* (Cardin *et al*, 1989) reported a consensus sequence: XBBXB (X, hydrophobic, B basic residues) found in many protein-heparin binding domains, which looked like the 24-35 sequence. Also, ionic interactions could have been created by HSPG, which interacted via its sulfate groups with the TTR oligomers (Bourgault *et al*, 2011). Moreover, as a general rule, molecular interactions, which occurred to a certain degree depending on the pH, reflected the connection between the association of a ligand and the binding of protons (proton linkage). The molecular basis of the linkage was due to the alteration of pKa values of ionizable amino acid groups concomitant with binding. Furthermore, Fig.7. showed that n_{H^+} values increased with the pH. At 308K, the n_{H^+} values were equal to zero at a pH above 6. The number of protons exchanged was negative, which meant that a residue of the HSPG surface or of the sTTR monomer should decrease its pKa value as a consequence of binding and the release of protons. This result suggested that the affected ionizable group could be the imidazole ring of a histidine amino acid with a pKa

normally of around 6-6.5. The protonation of the His residue from sTTR monomer at acidic pH broke the hydrogen-bond network, led to its destabilization. Therefore, When sTTR passed into the endosome/lysosome system, the acidic pH ($5 < \text{pH} < 6.5$) caused slight conformational changes in the sTTR monomer structure which thus cannot be destroyed. This result was consistent with the Yokoyama study (Yokoyama *et al*, 2012) which studied the pH effect on the TTR tetramer structure. This corroborated the hypothesis that the protonation of a histidine residue was an important step in the TTR-HSPG association (Ancsin, 2003; Kisilevsky *et al*, 2007). Indeed, the role of the His protonation in the binding of amyloidogenic polypeptide to sulfated GAGs has already been described for IAPP (De Carufel *et al*, 2013), for prion protein (Elimova *et al*, 2009) and beta-amyloid peptide (Brunden *et al*, 1993).

Conclusion

In this paper, a biochromatographic column was developed to study the pH effect on the binding affinity of a native transthyretin and of a transthyretin obtained from a patient with senile systemic amyloid, with heparan sulfate proteoglycan. For this purpose, HSPG was immobilized via its amino groups on a chromatographic support using an “*in situ*” immobilization technique. The adsorption constant of wtTTR and sTTR on HSPG at pH=7.4 were calculated using Langmuir distribution isotherms and were respectively equal to $1.6 \cdot 10^8$ and $4.5 \cdot 10^8$. This result showed that, at a physiological pH, the sTTR monomer protein had a higher affinity for HSPG than the wtTTR tetramer. Analysis of the thermodynamic data revealed that the association mechanism between both transthyretin forms and HSPG was enthalpy-driven at all pH values showing that van der Waals interactions and hydrogen bonding are engaged at the complex interface and confirming strong transthyretin - HSPG hydrogen bond networks. However for sTTR, the enthalpy entropy compensation presented a break at $\text{pH} \approx 6.5$. These results showed that the sTTR/HSPG association mechanism was pH-dependent with a critical value around 6.5, therefore demonstrating that ionic and hydrophobic interactions appeared in the binding process. Furthermore, the plot representing the number of protons exchanged versus pH was equal to zero at pH around 6.5. This value was consistent with the protonation of a histidine residue as an imidazolium cation. This explained the ionic interactions at pH below 6.5 which broke the hydrogen-bond network thus leading to a destabilization and a slight conformational change in the sTTR monomer structure and supported the implication of a protonated histidine in the TTR amyloid

formation. Additional experiments are currently in progress in our laboratory to study the pH dependence of other amyloidogenic proteins.

This work was supported by a grant from the French Research Ministry. We thank Pr. Benson for the acceptance of Ambre Geneste in his Lab. From Indianapolis University where the experiments concerning the extraction of senile transthyretin from patients were carried out.

References

- J.B. Ancsin, Historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans as a major culprit, *Amyloid*, 2003; 10; 67-79.
- C. André, Y.C. Guillaume, Reanalysis of Chiral Discrimination of Phenoxypropionic Acid Herbicides on a Teicoplanin Phase Using a Bi-Langmuir Approach, *Chromatographia*, 2003; 58; 193 - 200.
- C. André, Y.C. Guillaume, Saccharose effects on surface association of phenol derivatives with porous graphitic carbon, *J. Chrom. A*, 2004; 1029; 21 - 28.
- P.W. Baires, S.A. Peterson, J.W. Kelly, Discovering transthyretin amyloid fibril inhibitors by limited screening, *Bioorg. & Med. Chem.* 1998; 6; 1389-1401
- M.D. Benson, J. Breall, O.W. Cummings, J.J. Liepknieks, Biochemical characterization of amyloid by endomyocardial biopsy, *Amyloid*, 2009; 16; 9-14.
- C.C.F. Blake, I.D.A. Swan, C. Rerat, J. Berthou, A. Laurent, B. Rerat, An X-ray study of the subunit structure of prealbumin, *J. Mol. Biol.* 1971; 61; 217-224, 1.
- S. Bourgault, J.P. Solomon, N. Reixach, J.W. Kelly, Sulfated glycosaminoglycans accelerate transthyretin amyloidogenesis by quaternary structural conversion, *Biochemistry*, 2011; 50; 1001-1015, 6.
- K. R. Brunden, N. J. Richter-Cook, N. Chaturvedi, R. C. A. Frederickson, pH-Dependent Binding of Synthetic β -Amyloid Peptides to Glycosaminoglycans, *J. Neurochem.* 1993; 61; 2147-2154, 6.
- J.N. Buxbaum, Transthyretin and the transthyretin amyloidoses. In: *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases, Part B: Molecular Mechanisms of Conformational Diseases*. Uversky, V.N., Fink, A. (Eds.). Springer, New York, 2007, p. 259.

- A.D. Cardin, H.J. Weintraub, Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions, *Arteriosclerosis*, 1989; 9; 21-32.
- W. Colon, J.W. Kelly, Transthyretin acid induced denaturation is required for amyloid fibril formation in vitro, *Application of enzyme biotechnology*, Plenum Press, New York, 1991.
- A.M. Cuervo, J.F. Dice, When lysosomes get old, *Experimental Gerontology*. 2000; 35; 119-131.
- C.A. De Carufel, P.T. Nguyen, S. Sahnouni, S. Bourgault, New insights into the roles of sulfated glycosaminoglycans in islet amyloid polypeptide amyloidogenesis and cytotoxicity, 2013; 100; 645-55, 6.
- T. R. Foss, R. Wiseman, J. W. Jelly, The pathway by which the tetrameric protein transthyretin dissociates, *Biochemistry*; 2005; 44; 15525-15533.
- E.D. Eanes, G.G. Gleener, X-ray diffraction studies on amyloid filaments, 1968; *J. Histochem. Cytochem.* 16; 673-677.
- E. Elimova, R. Kisilevsky, J.B. Ancsin, Heparan sulfate promotes the aggregation of HDL-associated serum amyloid A: evidence for a proamyloidogenic histidine molecular switch, *Faseb J.* 2009; 10; 3436-48.
- S. Faham, R.E. Hileman, J.R. Fromm, R.J. Linhardt, D.C. Rees. Heparin Structure and Interactions with Basic Fibroblast Growth Factor, *Science*, 1996; 271; 1116–1120.
- G. Gibbons, Cornwell III., K. Sletten, B. Johansson, P. Westermark, Evidence that the amyloid fibril protein in senile systemic amyloidosis is derived from normal prealbumin, *B.B.R.C.* 1988; 154 648-653.
- Y.C. Guillaume, E. Peyrin, A. Berthelot, Chromatographic study of magnesium and calcium binding to immobilized human serum albumin, *J. Chrom B*, 1999 ; 728; 167-174.
- Å. Gustavsson, U. Engström, P. Westermark, Mechanisms of transthyretin amyloidogenesis. Antigenic mapping of transthyretin purified from plasma and amyloid fibrils and within in situ tissue localizations, *American Journal of Pathology*, 1994; 144; 1301-1311.
- J.F.K. Huber, R.G. Gerriste, Evaluation of dynamic gas chromatographic methods for the determination of adsorption and solution isotherms, *J.chromatogr.* 1971; 58; 137 - 141
- F. Ibrahim, Y.C. Guillaume, M. Thomassin, C. Andre, Magnesium effect on the acetylcholinesterase inhibition mechanism: a molecular chromatographic approach, *Talanta*, 2009; 79; 804 - 809.

- P. Jandera, S. Berncekova, K. Mhlbachler, G. Guiochon, V. Backovska, J. Planeta, Fitting adsorption isotherms to the distribution data determined using packed micro-columns for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.A* 925; 2001; 19 – 29.
- C.S. H. Jesus, D. C. Vaz, M. J. M. Saraiva, R. M. M. Brito, The V30M Amyloidogenic Mutation Decreases the Rate of Refolding Kinetics of the Tetrameric Protein Transthyretin; *Spectroscopy*; 2012; 27; 343-348; 5-6.
- R. Kisilevsky, J.B. Ancsin, W.A Szarek, S. Petanceska, Heparan sulfate as a therapeutic target in amyloidogenesis: prospects and possible complications, *Amyloid*, 2007; 14; 21-32.
- Z. Lai, W. Colón, J.W. Kelly, The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid, *Biochemistry*; 1996; 35; 6470–6482.
- Z. Lai, J. McCulloch, H. A. Lashuel, J. W. Kelly, Guanidine Hydrochloride-induced denaturation and refolding of transthyretin exhibits a marked hysteresis: equilibria with high kinetic barriers, *Biochemistry*; 1997; 36; 10230-10239.
- H.A. Lashuel, Z. Lai, J.W. Kelly, Characterization of the transthyretin acid denaturation pathways by analytical ultracentrifugation: implications for wild-type, V30M, and L55P amyloid fibril formation, *Biochemistry*; 1998; 37; 17851-17864.
- J.J. Liepnieks, B. Kluge-Beckerman, M.D. Benson, Characterization of amyloid A protein in human secondary amyloidosis: the predominant deposition of serum amyloid A1, *B. B. A.* 1995; 1270; 81-86; 1.
- U. Lindhal, J.P. Li, Interactions between heparan sulfate and proteins-design and functional implications, *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 2009; 276; 105-159.
- F. Noborn, P. O'Callaghan, E. Hernansson, X. Zhang, J.B. Ancsin, A.M. Damas, I. Dacklin, J. Presto, J. Johansson, M.J. Saraiva, E. Lundgren, R. Kisilevsky, P. Westermark, J.P. Li, Heparan sulfate/heparin promotes transthyretin fibrillization through selective binding to a basic motif in the protein, *P. N. A. S.* 2011; 108; 5584-5589.
- M. Pras, M. Schubert, D. Zucker-Franklin, The characterization of soluble amyloid prepared in water; *J. Clin. Invest.* 1968; 47; 924-933.
- R. Raman, G. Venkataraman, S. Ernst, V. Sasisekharan, R. Sasisekharan. *P. N. A. S.* 100 (2003) 2357–2362.
- P.D. Ross, S. Subramanian, Thermodynamic of protein association reaction: force contributing to stability, *Biochemistry*. 1981, 20, 3096.

- Y. Shinohara, M. Mizuguchi, K. Matsubara, M. Takeuchi, A. Matsuura, Biophysical analyses of the transthyretin variants, Tyr114His and Tyr116Ser, associated with familial amyloidotic polyneuropathy, *Biochemistry*, 2003; 42; 15053-15060.
- L.D. Thompson, M.W. Pantoliano, B.A. Springer, Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain, *Biochemistry*, 1994; 33; 3831-3840.
- S. Tumova, A. Woods, J.R. Couchman. Heparan Sulfate Chains from Glypican and Syndecans Bind the Hep II Domain of Fibronectin Similarly Despite Minor, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2000; 32; 269-288.
- S. Vilasi, R. Sarcina, R. Maritato, A. De Simone, G. Irace, I. Sirangelo. Heparin Induces Harmless Fibril Formation in Amyloidogenic W7FW14F Apomyoglobin and Amyloid Aggregation in Wild-Type Protein In Vitro, *Plos One*, 2011; 6; 1-13.
- P. Westermark, G.T. Westermark, Purification of transthyretin and transthyretin fragments from amyloid-rich human tissues. In: *Protein Methods in Molecular Biology, Part III: In Vivo-related assays*. Uversky, E.M. Sigurdsson, A. Humana Press, 2005, p. 255.
- R. L. Wiseman, E. T. Powers, J. W. Kelly; Partitioning Conformational Intermediates Between Competing Refolding and Aggregation Pathways: Insights into Transthyretin Amyloid Disease; *Biochemistry*; 2005; 44; 16612-16623; 50.
- T. Yokoyama, M. Mizuguchi, Y. Nabeshima, K. Kusaka, T. Yamada, T. Hosoya, T. Ohhara, K. Kurihara, K. Tomoyori, I. Tanaka, N. Niimura, Hydrogen-bond network and pH sensitivity in transthyretin: neutron crystal structure of human transthyretin, *J. Struct. Biol.* 2012; 177; 283-290.
- X. Zhang, J.P. Li, Heparan sulfate proteoglycans in amyloidosis, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; 2010; 93; 309-334.

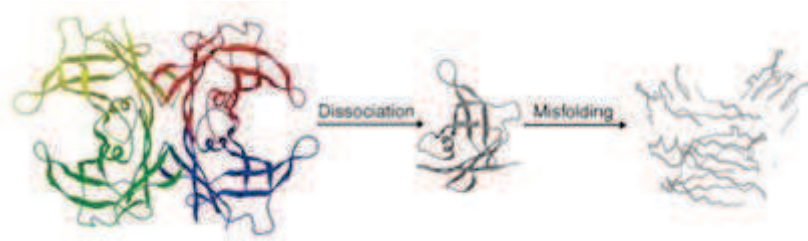


Fig.1. The pathway by which transthyretin might dissociate and misfold at the beginning of the amyloidogenesis. (Foss et al, 2009) PDB 1002

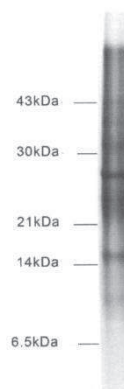


Fig. 2. SDS page analysis

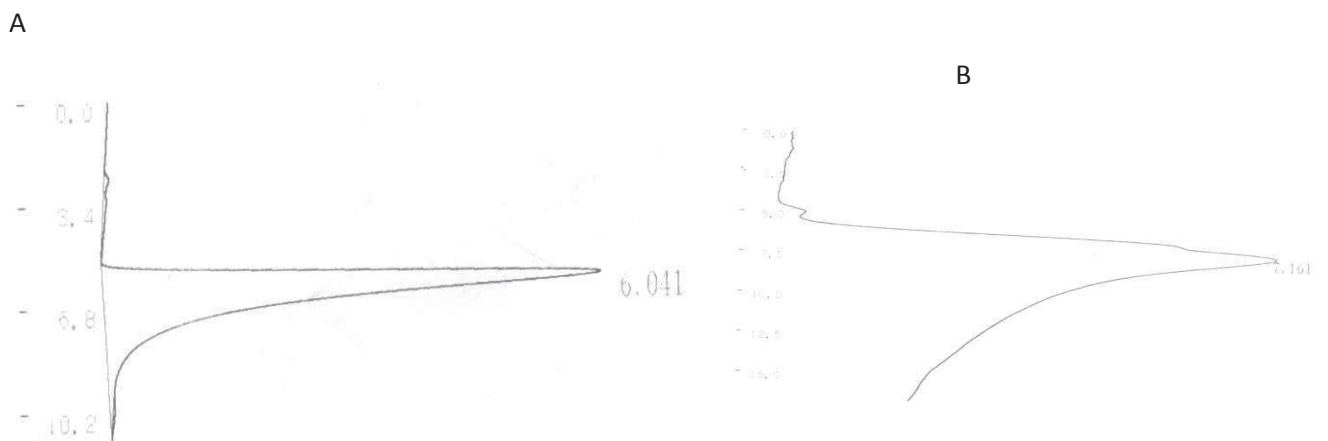


Fig. 3. HPLC chromatograms (retention times in min) for wtTTR (A) and sTTR (B) chromatographic conditions : Mobile phase phosphate buffer 0.01M ; pH = 7.4 ; Flow-rate 0.3 mL/min ; Column temperature : 20°C

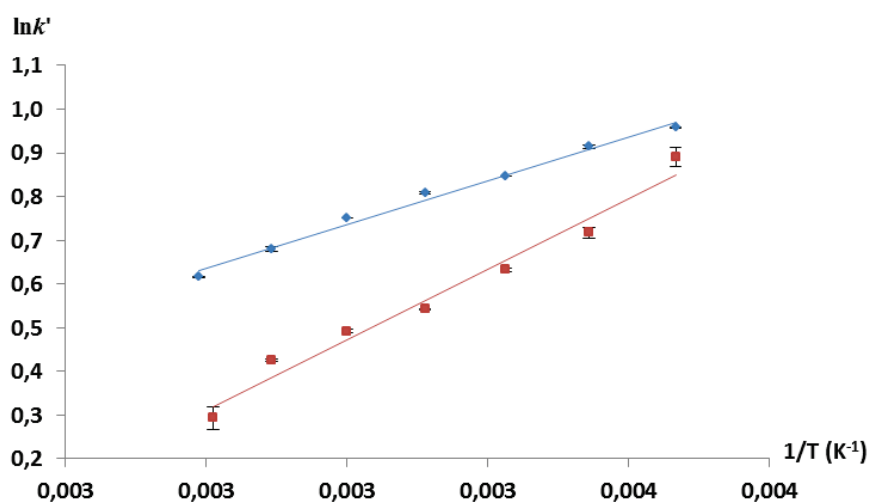


Fig. 4. Temperature dependence of the $\ln k'$ values of TTR ($\bullet$ = sTTR, $\blacksquare$ = wtTTR) at pH=7.4.

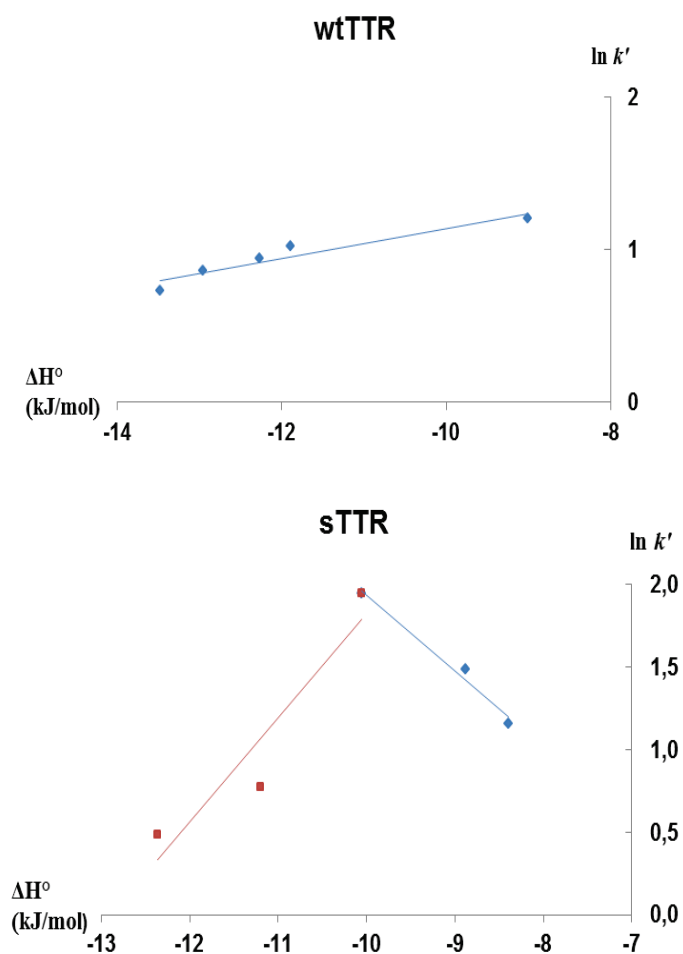


Fig. 5. $\ln k'$ versus ΔH° ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) plot determined for wtTTR and sTTR at $T = 298\text{K}$.

For sTTR: domain a: $\bullet$ $6.5 \leq \text{pH} \leq 7.4$

domain b: $\blacksquare$ $5.5 \leq \text{pH} \leq 6.5$

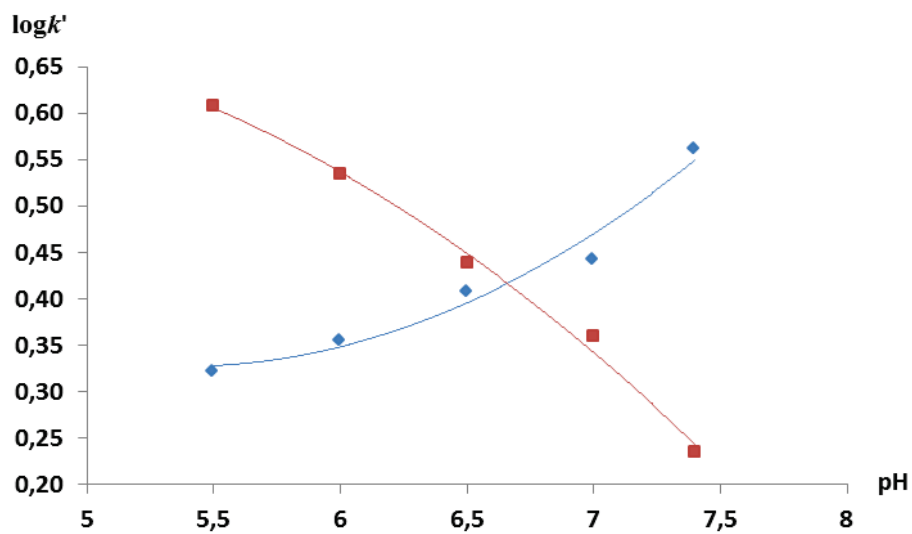


Fig. 6. pH dependence of the $\log k'$ values for transthyretin ($\diamond$ = sTTR, $\blacksquare$ = wtTTR) at 298 K

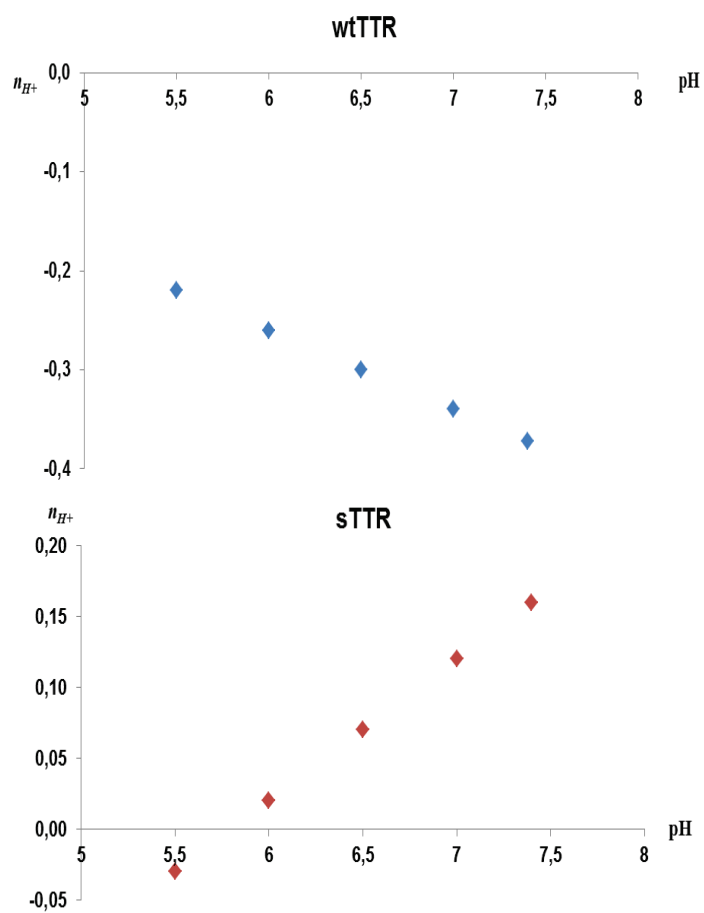


Fig.7. pH dependence of the linked protons n_{H^+} at 298 K

pH	ΔH° (sTTR)	ΔS° *(sTTR)	ΔH° (wtTTR)	ΔS° *(wtTTR)
5.5	-8.39 (0.06)	-2.65 (0.04)	-9.78 (0.03)	-1.77 (0.01)
6	-8.88 (0.12)	-2.95 (0.31)	-10.41 (0.32)	-2.74 (0.12)
6.5	-12.37 (0.12)	-4.05 (0.04)	-12.27 (0.16)	-3.95 (0.03)
7	-11.21 (0.57)	-3.46 (0.27)	-12.96 (0.43)	-4.57 (0.17)
7.4	-10.13 (0.05)	-2.80 (0.04)	-13.48 (0.09)	-5.10 (0.04)

*Table. 1 Thermodynamic parameters for the binding of sTTR or wtTTR to HSPG. (ΔH° (kJ.mol⁻¹), ΔS° * (no unit)). Standard deviations are in parentheses.*



The protease activity of transthyretin reverses the effect of pH on the amyloid- β protein/heparan sulfate proteoglycan interaction: A biochromatographic study



Ambre Geneste^a, Yves Claude Guillaume^{a,c,*}, Nadine Magy-Bertrand^{a,b}, Lydie Lethier^a, T. Gharbi^a, Claire André^a

^a Université de Franche-Comté, UFR SMP, EA 4662, Nanomédecine, Imagerie Thérapeutique Lab, Pôle Chimie Analytique Bioanalytique et Physique, 25030 Besançon cedex, France

^b Département de Médecine Interne, CHRU Besançon, 25030 Besançon cedex, France

^c Pôle Pharmaceutique, CHRU Besançon, 25030 Besançon cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2014

Received in revised form 18 April 2014

Accepted 21 April 2014

Available online 2 May 2014

Keywords:

Transthyretin

pH effect

Heparan sulfate proteoglycan.

ABSTRACT

Patients suffering of Alzheimer's disease (AD) are characterized by a low transthyretin (TTR) level in the brain. The effect of pH and TTR concentration in the medium on the β -amyloid protein (A β)/heparan sulfate proteoglycan (HSPG) association mechanism were studied using a biochromatographic approach. For this purpose, HSPG was immobilized via amino groups onto the amino propyl silica pre-packed column, activated with glutaraldehyde, by using the Schiff base method. Using an equilibrium perturbation method, it was clearly shown that A β can be bound with HSPG. This approach allowed the determination of the thermodynamic data of this binding mechanism. The role of the pH was also analyzed. Results from enthalpy–entropy compensation and the plot of the number of protons exchanged versus pH showed that the binding mechanism was dependent on pH with a critical value at pH = 6.5. This value agreed with a histidine protonation as an imidazolium cation. Moreover, the corresponding thermodynamic data showed that at pH > 6.5, van der Waals and hydrogen bonds due to aromatic amino acids as tyrosine or phenylalanine present in the N-terminal (N_T) part governed the A β /HSPG association. A β remained in its physiological structure in a random coil form (i.e. the non-amyloidogenic structure) because van der Waals interactions and hydrogen bonds were preponderant. At acidic pH (pH < 6.5), ionic and hydrophobic interactions, created by histidine protonation and hydrophobic amino acids, appeared in the A β /HSPG binding. These hydrophobic and ionic interactions led to the conversion of the random coil form of A β into a β -sheet structure which was the amyloidogenic folding. When TTR was incubated with A β , the A β /HSPG association mechanism was enthalpy driven at all pH values. The affinity of A β for HSPG decreased when TTR concentration increased due to the complexation of A β with TTR. Also, the decrease of the peak area with the increase of TTR concentration demonstrated that this A β /TTR association led to the cleavage of A β full length to a smaller fragment. For acidic pH (pH < 6.5), it was shown that the importance of the hydrophobic and ionic interactions decreased when TTR concentration increased. This result confirmed that A β was cleaved by TTR in a part containing only the N_T part. Our results demonstrated clearly that TTR reversed the effect of acidic pH and thus played a protective role in AD.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is one of the major causes of dementia and death among the elderly (Hardy et al., 1992). In this pathology, brains are characterized by neurofibrillary tangles and the presence of senile plaques (SPs). SPs primarily consist of amyloid β protein (A β). A β is a 4 kDa protein with two common isoforms, A β (1–40) (which is the major A β sequence ~90% found circulating

* Corresponding author at: Pôle Pharmaceutique, CHRU Besançon, 25030 Besançon cedex, France. Tel.: +33 3 81 66 55 44; fax: +33 3 81 66 56 55. E-mail address: yves.guillaume@univ-fcomte.fr (Y.C. Guillaume).

in cerebrospinal fluid (CSF) [1] and A β (1–42) [2] generated from the proteolytic cleavage of a large transmembrane glycoprotein, amyloid β precursor protein (APP). Hardy and Higgins [3] and Hardy and Selkoe [4] hypothesized that the deposition of A β is the causative agent of AD and neurofibrillary tangles, cell loss, vascular damage, and dementia as a direct result of the deposition, which is known as the “amyloid cascade hypothesis”. As A β has a high propensity to form aggregated β -sheet [5] protein deposits in the SPs, AD is considered as the most common form of amyloidosis in the brain. Structurally, two domains in A β can be distinguished: a hydrophilic N-terminal (N_T) region with residues 1–28 and a hydrophobic C-terminal (C_T) region with residues 29–40, which always exists as a β -sheet, independently of the pH and the temperature. The structure of the N_T region depends on the type of interactions involved. Zhang et al. [6] showed that the stabilization of the random coil conformation was due to van der Waals bonds [7], and the β -sheet structure is formed by hydrophobic and ionic interactions [8,9]. It is well-known that extrinsic or environmental factors, such as the pH, influence the relative proportions of the random coil, α -helix and β -sheet solution structures and modulate the aggregation of the A β peptide into amyloid. The relative proportions of these structures and the fibrillogenesis are highly pH-dependent [5]; pH greatly influences the conformation of the first 28 amino acids. This segment unfolds into a random-coil conformation between pH 1–4 and above pH 7. Between pH 4 and 7, Soto et al. [5] demonstrated that it rapidly precipitates into an oligomeric β -sheet structure. The structure of the N_T region determines the beginning of the fibrillogenesis. Physiologically, A β is probably degraded as a physiological event in the endosomal/lysosomal pathway, where the pH is below 4 in the lysosomes and below 6.5 in the endosomes [10]. Moreover, acidosis in the brain, where the pH value is under 6.6, is correlated with AD [11]. As in many amyloidoses, several other proteins with the ability to modulate amyloid fibril formation accumulate in SPs, particularly heparan sulfate proteoglycan (HSPG) [12], which has been found to be associated with all amyloid deposits. HSPG is a biologic macromolecule characterized by a core protein to which glycosaminoglycan side-chains (GAG) are covalently attached. The main role of HSPG is still unknown but it seems to be a scaffold for amyloid fibril formation. Although, due to the sulfur group of HSPG, electrostatic interactions contribute a great amount of the binding energy, hydrogen-bonding, van der Waal interactions, and hydrophobic effects are also involved in the interactions with proteins [13]. It has been reported that A β is sequestered by extracellular proteins present in CSF as apolipoprotein E, apolipoprotein J, and APP [14]. Furthermore, Schwarzman et al. [15] demonstrated that TTR could bind to A β and they hypothesized that TTR sequestered A β in CSF and plasma, therefore preventing amyloid fibril formation and deposition. TTR is a thyroxine and retinol protein transporter, which is located in both serum and CSF. In serum, TTR can lead to transthyretin amyloidosis. However, in the brain, its role is undefined. Studies have shown that the TTR level in the brain is correlated with the presence of SPs. The TTR level decreases with the SP growth [16].

In order to understand the role of the TTR in the A β -aggregation, the effect of pH and different concentrations of TTR in the medium on the A β (1–40)/HSPG association was analyzed using a biochromatographic approach.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Heparan sulfate proteoglycan (HSPG), isolated from basement membrane of Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma, and transthyretin from human plasma were obtained from

Sigma-Aldrich (Paris, France). Amyloid β protein: the A β (1–40) isoform was purchased from Abcam (London, England). Potassium dihydrogen phosphate and dipotassium hydrogen phosphate, used for the preparation of the mobile phases, were of analytical grade and purchased from Merck (Paris, France).

2.2. Apparatus

The HPLC system consisted of a Shimadzu LC-10ATvp pump (Champs-sur-Marne, France), a Rheodyne 7725 injection valve (Cotati, CA, USA) fitted with a 20 μ L sample loop, and a Shimadzu SPD-10A UV–vis detector (Noisiel, France). The Silice Uptisphere® 120 Å 3 μ m NH₂ column (50 mm $\times$ 4.6 mm column size) was furnished by Interchim (Montluçon, France). The preparation of the heparan sulfate proteoglycan column via the *in situ* technique is described below. Throughout the study, a constant flow-rate of 0.3 mL/min was maintained and the temperature varied between 10 and 40 °C.

2.3. Covalent immobilization technique of HSPG on silica-NH₂ particles

The “*in situ*” immobilization technique to prepare this new HSPG column was previously used by our group [17] for the immobilization of acetylcholinesterase on an ethylenediamine (EDA) monolithic convective interaction media (CIM) disk. The immobilization of HSPG, via the amino groups of the protein, onto the amino propyl silica pre-packed column, activated with glutaraldehyde, by using the Schiff base method, was thus carried out as follows. Firstly, the column was washed with phosphate buffer saline (PBS) (pH 6.5, 0.01 M) for 30 min at a flow-rate of 0.5 mL/min. Then, the silica-NH₂ particles were activated by recycling 10% of glutaraldehyde in PBS (pH 6.5, 0.01 M) for 10 h at the same flow-rate, followed by washing with PBS (pH 6.5, 0.01 M) during 1 h. 0.2 mg of HSPG was dissolved in 50 mL of PBS (pH 7.4, 0.01 M) and the protein solution continuously circulated through the column at a flow-rate of 0.3 mL/min for at least 24 h. The column was then injected with PBS (pH 7.4, 0.01 M) for 1 h and 0.1 M of sodium cyanoborohydride in 100 mL PBS (pH 7.4, 0.01 M) circulated during 5 h for reductive amination. The column was then washed with PBS (pH 7.4, 0.01 M) for 1 h and a solution of 0.2 M ethanolamine was injected for 3 h to deactivate the aldehyde groups. To finish, 0.1% of sodium azide circulated during 1 h for column conservation purposes.

The total mass of HSPG (192 μ g) in the column was determined by elemental analysis. For this analysis, four fractions of the stationary phase were removed from the head to the end of the column. The maximum relative difference of the amount of immobilized HSPG between these different measurements was always 0.5%, therefore providing a homogeneous HSPG distribution in the column from the ends to the center.

2.4. A β incubation with TTR and chromatographic operating conditions

The effect of different concentrations of TTR on A β /HSPG binding was determined by using the experimental method described below. A β , at a concentration of 20 μ M, was incubated at room temperature during 3 h with different concentrations of TTR (x) (x = 0, 2, 5, 10, 15 μ M). 20 μ L of A β + x in PBS 0.01 M at pH = 7.4 were injected and the resulting retention factor was determined at seven temperatures, i.e. 283, 288, 293, 298, 303, 308 and 313 K. 20 μ L of TTR, at a concentration of 20 μ M, were also injected in the chromatographic system in similar conditions. The mobile phase consisted of a phosphate buffer saline (0.01 M), which was prepared by mixing equimolar solutions of mono- and dibasic sodium phosphate to

produce the desired eluent pH adjusted to values equal to 7.4, 7, 6.5, 6, and 5.5. A total aqueous mobile phase was used so as to obtain a maximal retention of A β on the HSPG column. The experiments were carried out at a detection wavelength of 214 nm with a 10-nm bandwidth. The chromatographic system was left to equilibrate at each temperature for at least 1 h prior to each experiment.

2.5. Langmuir distribution isotherms

A β could tightly bind to the matrix of the column by using the HSPG stationary phase. The determination of the Langmuir distribution isotherms was described in a previous study for the analysis of specific binding sites of a series of acetylcholine esterase inhibitors on an acetylcholine esterase stationary phase [17]. For this purpose, the perturbation technique was used [18–21]. This method makes it possible to determine the adsorption isotherms by measuring the retention times of small sample sizes injected onto a column equilibrated with sample solutions at different concentration levels. In this work, the equilibration was carried out with 10 different concentrations of A β (0–20 μ M) in the mobile phase used to obtain a stable detection. Then, 20 μ L containing the most concentrated A β solution are injected onto the column. After the injection, the equilibrium condition is disturbed, the perturbation waves reach the column outlet, and a peak is recorded by the detector and its retention time is measured. Therefore, if A β is bound to two sites on the stationary phase, i.e. a specific site (site A with an adsorption constant, K_A , and a column saturation capacity, α_A) and second site, which is non-specific (site B with an adsorption constant, K_B , and a column saturation capacity, α_B), then the solute retention factor (k'), which is directly proportional to the slope of its adsorption isotherm, is given by the following equation:

$$k' = \frac{t - t_0}{t_0} = \phi \frac{dC_S}{dC_m} = \phi \left(\frac{\alpha_A K_A}{(1 + K_A C_m)^2} + \frac{\alpha_B K_B}{(1 + K_B C_m)^2} \right) \quad (1)$$

ϕ is the column phase ratio (volume of the stationary phase divided by the volume of the mobile phase), C_S and C_m are respectively the total concentration of A β in the stationary phase and that in the mobile phase. Eq. (1) was adapted to the solute retention factor, k' , by a non-linear regression and the parameters $k'_A = \phi K_A \alpha_A$ and $k'_B = \phi K_B \alpha_B$ corresponding to the retention contributions of the two types of sites under linear conditions were calculated.

2.6. Van't Hoff plot of the A β -HSPG binding process

Valuable information about the processes driving the A β -HSPG association mechanism can be further gained by examining the temperature dependence of A β [22,23]. Under linear conditions, the temperature dependence of the retention factor is given by the following relationship:

$$\ln k' = \frac{-\Delta H^\circ + \Delta S^\circ}{RT} \quad (2)$$

where $\ln k' = f(1/T)$ is called van't Hoff plot.

In this equation, $\Delta S^\circ = \Delta S/R + \ln \phi$, where R is the gas constant, T is the column temperature in Kelvin, ϕ is the column phase ratio and ΔH° and ΔS° are the solute enthalpy and entropy variations occurring during the transfer of A β from the bulk solvent to the HSPG surface, respectively. If the HSPG stationary phase, A β and solvent properties are temperature invariant, a linear van't Hoff plot is obtained and ΔH° and ΔS° can be calculated from the slope and intercept.

Table 1

Values of the retention contribution of the two types of sites, k'_A and k'_B , the retention factor k' ($k' = k'_A + k'_B$) (extrapolated at $C_m = 0$) and the non-linear regression coefficients, r^2 and F (Langmuir model, Lang), for A β , standard deviations are in parentheses.

Solute molecule	k'_A	k'_B	k'	r^2 ; F -Lang
A β	0.142 (0.028)	0.004 (0.001)	0.146 (0.007)	0.9996; 7552

3. Results

3.1. Langmuir distribution isotherm results and column stability

As the immobilization of HSPG on a silica support could lead to non-specific interactions, there retention contributions of these two types of sites, i.e. k'_A and k'_B , were determined from Eq. (1) at pH 7.4 and 298 K. For each A β molecule and for each solute concentration in the bulk solvent, the most concentrated sample was injected three times into the chromatographic system and its retention factor was determined (see 'Langmuir distribution isotherms' section). The variation coefficients of the k' values were <0.3%, therefore indicating a high reproducibility and a good stability of the chromatographic system. With a weighted non-linear regression (WNLIN) which was used in earlier chromatographic studies [24], the k' values at various A β concentrations in the mobile phase were fitted in Eq. (1). After the WNLIN procedure, the constants of Eq. (1) were used to estimate the k' values with the measured values at the different A β concentrations in the mobile phase. The slope of the curve representing the variation of the estimated retention factors (k') (Eq. (1)) versus the experimental values (0.9999; the ideal value is 1.0000) and r^2 (0.998) indicate that there is an excellent correlation between the predicted and experimental retention factors. The non-linear regression coefficient r^2 and the F value (from the Fisher test with a confidence level at 95%) [24] were determined. These values are shown in Table 1. The F value constitutes a more discriminating parameter than the r^2 value when assessing the significance of the model equation [24]. From the full regression model, a student t -test was used to provide the basis for the decision as to whether or not the model coefficients were significant. Results of the student's t -test show that no variable can be excluded from the model. These results showed that Eq. (1) accurately describes the association behavior of A β with HSPG. Furthermore, an important conclusion can be drawn from these data i.e. the interactions between A β with the matrix of the stationary phase were disregarded (the k'_A and k'_B values are given in Table 1 and $k_B \ll k_A$). This important result was confirmed by the fact that A β was not retained on the aminopropyl silica column (i.e. the commercial AP column) under similar chromatographic conditions. Therefore, the non-specific binding sites of the HSPG column could be negligible. In order to evaluate the column reproducibility, three columns were prepared under identical conditions as described above: the retention factors at pH 7.4 (standard deviations equal to 0.024 for A β) were obtained with A β (0.143). The mobile phase was a PBS (pH 7.4, 0.01 M) mixture with a flow-rate of 0.3 mL/min and a column temperature equal to 308 K. The results showed that the temperature was reliable and reproducible. In addition, the standard reproducibility of this column expressed as the retention time measured as a relative standard deviation was <5%. After half a year and more than 300 injections, the decrease of the retention factor values of the column was <1.2%. Further in this paper, the k' values of A β representing its retention on the HSPG stationary phase were thus determined for a sample concentration in the mobile phase equal to zero; i.e. $C_m = 0$.

Table 2
Values of the peak areas of A β with TTR ($x = 0, 2, 5, 10$ or $15 \mu\text{M}$).

$x (\mu\text{M})$	pH 5.5	pH 6	pH 6.5	pH 7	pH 7.4
0	2594295	2250050	2092899	2486154	2871451
2	1347617	1669877	1616071	1286884	1863466
5	1232481	1617110	1110524	1000000	1218179
10	225289	93965	1052514	101124	495148
15	78228	46730	51045	47443	52606

3.2. pH and TTR concentration effects on the A β /HSPG association process

All the experiments were repeated at least three times and the variation coefficients of the k' values were all less than 5% for all pH and x values, therefore indicating a high reproducibility and good stability of the chromatographic systems.

The chromatograms showed that the retention times decreased with the increase of TTR concentration. An example is given in Fig. 1, which shows that the retention times for $x = 0 \mu\text{M}$ and for $x = 15 \mu\text{M}$ were respectively 13.551 min ($k' = 4.80$) and 7.129 min ($k' = 2.98$).

The plot of k' versus x was drawn for all pHs being studied. All the curves exhibited a similar variation with a quadratic function. For example, Fig. 2 represented k' versus x at pH = 5.5 and at 298 K with the following equation:

$$k' = 0.01x^2 - 0.44x + 6.28 \quad r^2 = 0.99 \quad (3)$$

The related peak areas (A) were also investigated. The peak areas, determined at all pHs being studied, are included in Table 2. The $\log A$ versus $\log x$ curve, plotted for all pH values, showed that the area decreased when the TTR concentration increased. The trends obtained from Fig. 3 were not linear and the following associated equations were provided as examples:

$$\text{At pH} = 7.4: \log A = -1.42x^2 + 0.22x + 6.33 \quad r^2 = 0.96 \quad (4)$$

$$\text{At pH} = 5.5: \log A = -1.31x^2 + 0.34x + 6.33 \quad r^2 = 0.96 \quad (5)$$

Valuable information about the processes driving the A β /HSPG association mechanism could be further gained by examining the pH dependence on the A β /HSPG association.

When the pH of the bulk solvent changed, a fuller description was essential, which explicitly maintained the conservation of mass

Table 4
Thermodynamic parameters of the A β /HSPG association with TTR ($x = 0, 2, 5, 10, 15 \mu\text{M}$) (ΔH° (kJ/mol), ΔS° (no unit), RSD = 0.70).

$x (\mu\text{M})$	pH 5.5		pH 6		pH 6.5		pH 7		pH 7.4	
	ΔH°	ΔS°	ΔH°	ΔS°	ΔH°	ΔS°	ΔH°	ΔS°	ΔH°	ΔS°
0	-1.51	1.10	-4.00	-0.21	-10.83	-3.27	-14.90	-4.70	-16.30	-5.06
2	-3.17	0.41	-5.81	-0.99	-12.36	-4.06	-13.64	-4.33	-18.47	-6.00
5	-4.39	-0.28	-4.63	-0.75	-11.13	-3.61	-13.64	-4.83	-15.15	-4.80
10	-4.30	-0.53	-5.06	-0.97	-11.14	-3.71	-13.51	-3.65	-15.58	-4.98
15	-7.70	-2.04	-7.97	-2.33	-12.40	-4.53	-11.10	-5.69	-15.48	-6.21

**Fig. 1.** Chromatograms at pH = 7.4 and $T = 298 \text{ K}$ of (a) A β without TTR, (b) A β + TTR ($x = 15 \mu\text{M}$).**Table 3**
Values of the parameters of the $\log k' = \log k_0 + \lambda_1 \text{pH} + \lambda_2 \text{pH}^2$ plot for all x values at pH = 7.4 and $T = 298 \text{ K}$.

$x (\mu\text{M})$	0	2	5	10	15
$\log k_0$	0.90	12.90	10.47	10.15	5.51
λ_1	-2.82	-3.81	-3.90	-3.03	-1.51
λ_2	0.22	0.29	0.24	0.23	0.11
r^2	0.88	0.90	0.97	0.95	0.91

of each species and took into account the binding of H^+ to HSPG, A β and the HSPG/A β complex:



where $n_{\text{H}}^+ = C - (A + B)$ was the number of protons linked to this A β binding reaction of HSPG.

n_{H}^+ could be calculated using the following equation [25]:

$$\frac{\partial \log k'}{\partial \text{pH}} = n_{\text{H}}^+ \quad (7)$$

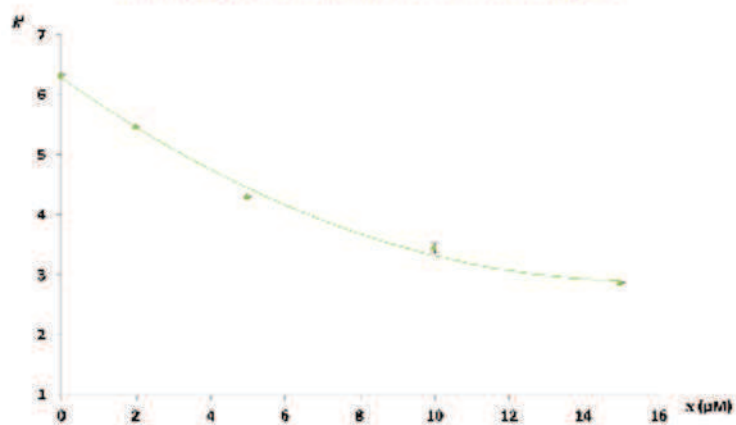
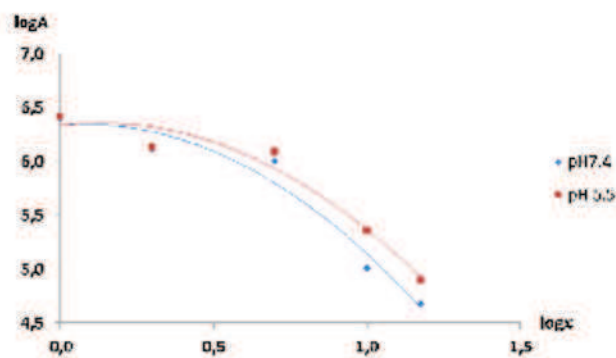
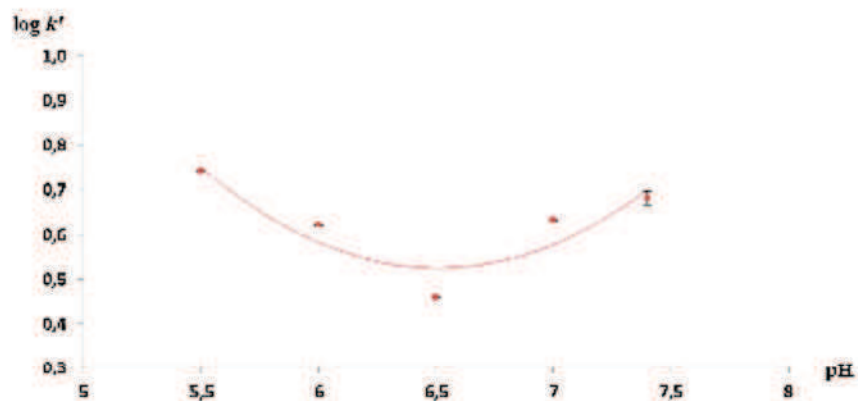
Fig. 4 reported all the data acquired on the variations of the retention factors of A β when the bulk solvent pH increased from 5.5 to 7.4. Looking at the experimental data, it was evident that the trend was not linear. This was highlighted by the following quadratic function:

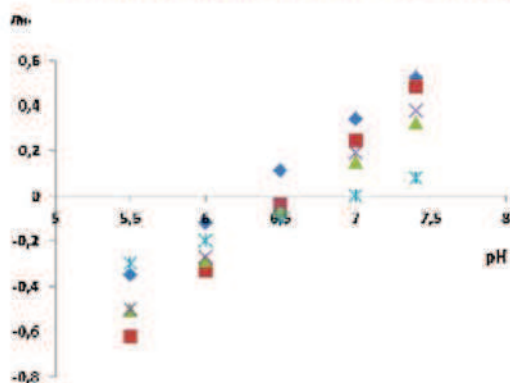
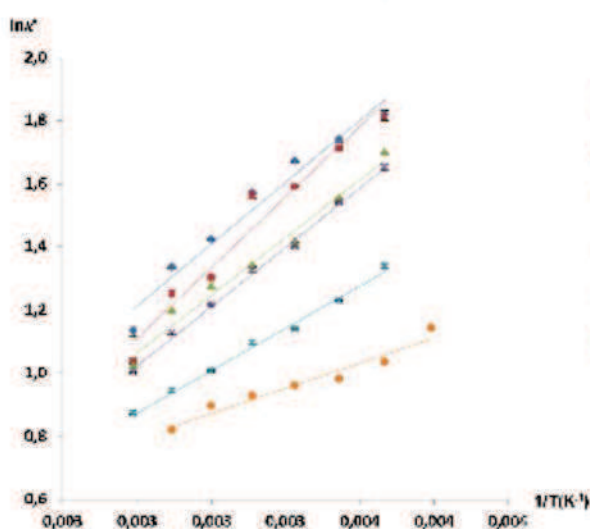
$$\log k' = \log k_0 + \lambda_1 \text{pH} + \lambda_2 \text{pH}^2 \quad (8)$$

where k_0 is the retention factor extrapolated at pH = 0 and $\lambda_{1,2}$ were constants related to the structure of A β . A quadratic relationship was obtained for all the x values. These constants were determined from the non-linear $\log k'$ versus pH plot by using Eq. (8). The $\log k_0$, λ_1 , λ_2 and r^2 values are given in Table 3 for all x values. The slope of the $\log k'$ versus pH curve, determined from Eq. (8), gave the number of protons, n_{H}^+ , involved in the binding process of A β /HSPG. Fig. 5 showed how the n_{H}^+ values increased linearly with the pH and was practically equal to zero at pH = 6.5 for all x values.

3.3. Thermodynamic data of the A β /HSPG association process

The retention factor of A β on HSPG was calculated over the entire pH range ($5.5 \leq \text{pH} \leq 7.4$) and x value range ($0 \mu\text{M} \leq x \leq 15 \mu\text{M}$) with column temperatures (283–313 K). The $\ln k'$ versus $1/T$ plot was determined from these retention factors

Fig. 2. k' versus x at pH=5.5 and at 298 K.Fig. 3. $\log A$ versus $\log x$ at pH=7.4 and pH=5.5.Fig. 4. $\log k'$ versus pH at 298 K.

Fig. 5. pH dependence of the linked protons of Aβ with $x=0$ (♦), 2 (■), 5 (▲), 10 (×), 15 (✱) μM at $T=298\text{ K}$.Fig. 6. van't Hoff plots of transthyretin (●) and of Aβ with $x=0$ (♦), 2 (■), 5 (▲), 10 (×), or 15 (✱) μM at $\text{pH}=7.4$.

for different pH values. Fig. 6 represents, for example, the van't Hoff plots at $\text{pH}=7.4$ for all x values. These plots were all linear and the related correlation coefficients were in excess of 0.96.

The linear van't Hoff plots were used to calculate values of the thermodynamic parameters (ΔH° and ΔS°). Table 4 provides the ΔH° and ΔS° values at all pH and x values.

A further thermodynamic approach to the analysis of a pH-dependent physicochemical process between Aβ, incubated with different TTR concentrations, and HSPG, was the enthalpy–entropy compensation [26], which is used in chromatographic procedures to analyze and compare the association or complexation mechanism for a group of compounds. Mathematically, the enthalpy–entropy compensation could be expressed by the following equation:

$$\ln K' = -\frac{\Delta H^\circ}{k} \left(\frac{1}{s} - \frac{1}{\beta} \right) - \frac{\Delta G^\circ_\beta}{k\beta} - \ln \phi \quad (9)$$

ΔG°_β was the corresponding Gibbs free energy variation at the β compensation temperature. Fig. 7 shows the plot of $\ln K'$ (for $T=298\text{ K}$) versus ΔH° for $x=0\text{ }\mu\text{M}$. The plot presented a break at $\text{pH}=6.5$ with two distinct domains, a (6.5–7.4) and b (5.5–6.5). The associated regression lines were:

$$\text{For domain a: } \ln K' = -0.08\Delta H^\circ + 0.13 \quad r^2 = 0.98 \quad (10)$$

$$\text{For domain b: } \ln K' = -0.07\Delta H^\circ + 1.76 \quad r^2 = 0.97 \quad (11)$$

It appeared that the slopes were different and exhibited different β compensation temperatures; at 298 K , $\beta=259\text{ K}$ for domain a and $\beta=398\text{ K}$ for domain b. The break was also observed for all x values and the associated β compensation temperatures are indicated in Table 5.

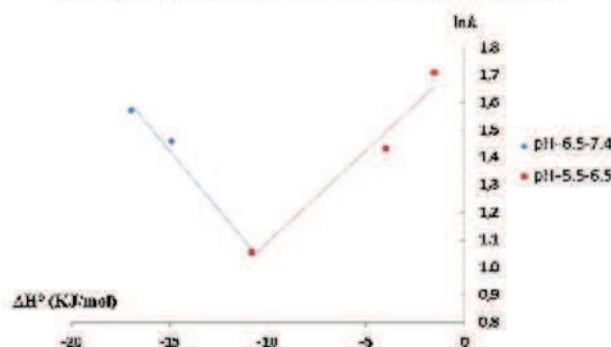


Fig. 7. Enthalpy-entropy compensation for Aβ at 298 K.

Table 5
Compensation temperatures of Aβ + x = 0, 2, 5, 10 and 15 μM.

x (μM)	β pH 6.5–7.4	β pH 5.5–6.5
0	259	398
2	251	402
5	259	401
10	263	444
15	251	456

4. Discussion

4.1. Association mechanism of Aβ/HSPG without TTR in the medium

The association mechanism of Aβ with HSPG without TTR in the medium (i.e. x = 0 μM) was analyzed at all pH values. Table 4 shows that the ΔH° values were always negative at all pH values, therefore demonstrating that van der Waals and hydrogen bonds played a major role in the Aβ/HSPG association mechanism. Aβ(1–40) included, in the 1–28 segment, aromatic amino acids such as one tyrosine at position 10 and three phenylalanines at positions 4, 19 and 20. Numerous studies have demonstrated that sulfate moieties of glycosaminoglycans were critical in Aβ interactions [27], the importance of the sulfate groups was already confirmed by a decrease in Aβ fibril formation in the presence of desulfated HS [28]. Van der Waals interactions could be explained by the interactions involving delocalized electrons from the aromatic ring systems of the Aβ aromatic amino acids with the sulfur atoms of HSPG. Also, interactions between aromatic amino acids themselves could induce van der Waals interactions, such as in APP interactions with HSPG [29].

However, the $\ln K$ versus ΔH° plot (Fig. 7) presented a break at pH = 6.5 and the n_{H^+} versus pH plot (Fig. 5) presented a positive n_{H^+} value for pH > 6.5 and a negative n_{H^+} value for pH < 6.5.

For pH > 6.5, when the pH increased, the ΔH° values decreased, therefore showing that van der Waals and hydrogen bonds were preponderant in the association mechanism and were involved at the complex interface forming a strong Aβ/HSPG hydrogen bond network. The hydrogen bond formation was confirmed by positive n_{H^+} values showing that protons were taken up upon binding, which meant that a residue of the HSPG surface or of the Aβ molecule had increased its pK_a . The imidazole sidechain of the Histidine (His) residue had a pK_a of around 6. The imidazole polar hydrogen atom, which was a hydrogen-bond donor, could form a hydrogen bond interaction with amino acids from the core protein of HSPG.

Therefore, the van der Waals interactions mainly maintained the N_T part of Aβ(1–40) as a random coil, which was the physiological structure.

For pH < 6.5, when the pH decreased, ΔH° and ΔS° values strongly increased, and for pH < 5.5, ΔS° had a positive value ($\Delta H^\circ_{pH 7.4} = -16.3$ kJ/mol and $\Delta S^\circ_{pH 7.4} = -5.06$, $\Delta H^\circ_{pH 5.5} = -1.51$ kJ/mol and $\Delta S^\circ_{pH 5.5} = 1.10$). This result demonstrated that ionic and hydrophobic interactions appeared in the Aβ/HSPG association mechanism. The interactions between ionic species and hydrophobic interactions in an aqueous solution were characterized by small positive enthalpy variations and positive entropy variations [27]. Aβ possessed 3 His residues in the 14 first amino acids at positions 6, 13 and 14. The ionic interactions might be due to the protonation of His residues. The basic nitrogen atom on the protonated imidazole ring could have interacted with the negative charges (sulfur groups) of HSPG and with the amino acids from the core protein of HSPG [29]. This fact was corroborated by negative n_{H^+} values (Fig. 5). This result confirmed McLaurin's study [28], which showed that residues 13–16 (His-His-Gln-Lys) of Aβ were considered critical for GAG interactions because their interactions with the sulfur atoms of HSPG were inhibited at pH values higher than 7 [30]. The hydrophobic interactions could be due to hydrophobic amino acids, which have interacted with the core part of the HSPG. Aβ possessed 11 hydrophobic amino acids in the N_T part, such as leucine (Leu) 17 and valine (Val) 18. Furthermore, studies have showed that these two amino acids were involved in hydrophobic interactions and were often found in proteins with a β-sheet structure [31]. Moreover, studies have suggested that the presence of amino acids with a high propensity for a β-sheet secondary structure in a sequence, that is otherwise designed for an α-helical character, made the second structural motif possible [32]. Therefore, the hydrophobic and ionic interactions added to the β-sheet conformation of the C_T part were responsible for the conformational change of the N_T part of Aβ into a β-sheet structure.

Our results have clearly demonstrated the role played by pH in the conversion of the random coil form of Aβ into a β-sheet structure, which is the amyloidogenic folding.

4.2. Effect of transthyretin on Aβ/HSPG association

Figs. 1 and 2, respectively show that both the retention time and thus the retention factor decreased with the increase of TTR concentrations. These results have demonstrated that the presence of TTR decreased the affinity of Aβ for HSPG due to the association of Aβ with TTR in the medium [15]. This decrease was observed at all pH values. The Aβ/TTR complex did not interact with HSPG.

Table 2 and Fig. 3 indicate that the peak area decreased when the TTR concentration increased at all pH values. These results were due to the proteolytic activity of TTR. Proteolytic activity was assigned to TTR as a cerebral physiological function [33].

According to Table 4, for $\text{pH} > 6.5$, there were no significant differences in the values of the thermodynamic data at all TTR concentrations (at $\text{pH} = 7.4$: $\Delta H_{\text{A}\beta+\text{K}:0\mu\text{M}}^{\circ} = -16.3 \text{ kJ/mol}$, $\Delta S_{\text{A}\beta+\text{K}:0\mu\text{M}}^{\circ} = -5.06$ and $\Delta H_{\text{A}\beta+\text{K}:15\mu\text{M}}^{\circ} = -15.48 \text{ kJ/mol}$, $\Delta S_{\text{A}\beta+\text{K}:15\mu\text{M}}^{\circ} = -6.21$). These data demonstrated that van der Waals and hydrogen bonds were preponderant in the association process. Therefore, A β remained in a random coil form, which was not the amyloidogenic structure.

For $\text{pH} < 6.5$, the decrease of the thermodynamic values with the TTR concentration (at $\text{pH} = 5.5$: $\Delta H_{\text{A}\beta+\text{K}:15\mu\text{M}}^{\circ} = -1.51 \text{ kJ/mol}$ and $\Delta S_{\text{A}\beta+\text{K}:0\mu\text{M}}^{\circ} = 1.10$, $\Delta H_{\text{A}\beta+\text{K}:15\mu\text{M}}^{\circ} = -7.70 \text{ kJ/mol}$ and $\Delta S_{\text{A}\beta+\text{K}:15\mu\text{M}}^{\circ} = -2.04$) demonstrated that the predominance of the hydrophobic and ionic interactions decreased as the TTR concentration increased. These results showed that the hydrophobic amino acids and/or the His residues were less involved in the binding when TTR concentration increased. These results confirmed the cleavage of A β by TTR. In addition, Costa et al. [34] showed that TTR cleaved the A β peptide after 3 h of incubation into one segment of 1698 Da corresponding to 1–14 amino acids. Thus, this cleavage removed a big part of A β with the C₁ part included. Therefore, the higher the concentration of TTR incubated with A β , the greater the amount of cleaved A β . The level of A β in its entire length corresponding to free A β decreased. Residues 13–16, critical for GAG interactions, and many hydrophobic residues, such as Val18 and Leu17, responsible for hydrophobic interactions, were almost all removed during the cleavage; the importance of hydrophobic and ionic interactions in the association mechanism was therefore reduced [35]. The A β fragment remained in a random coil form and did not aggregate with HSPG.

5. Conclusion

For the first time, a new biochromatographic column was developed to study the effect of pH and the TTR concentration (x) on the A β /heparan sulfate proteoglycan (HSPG) association mechanism. For this purpose, HSPG was immobilized via its amino groups on a chromatographic support using an "in situ" immobilization technique. It was shown that the A β /HSPG binding mechanism was dependent on pH and x. For $\text{pH} > 6.5$ and for all TTR concentrations being studied, van der Waals and hydrogen bonds were preponderant in the A β /HSPG binding process and the N₁ part of A β was stabilized in a random coil form. For acidic pH values ($\text{pH} < 6.5$), the effect of pH was dependent on TTR concentrations: (i) for $x = 0 \mu\text{M}$ (i.e. without TTR), ionic and hydrophobic interactions (due to residues such as His, Leu and Val) appeared and were responsible for the random coil $\rightarrow$ β -sheet conversion, (ii) for $2 \mu\text{M} \leq x \leq 15 \mu\text{M}$ and all pH values, the affinity of A β for HSPG and the peak area decreased as the TTR concentration increased, therefore demonstrating a complex formation between A β and TTR, followed by a cleavage of A β by TTR. Moreover, at $\text{pH} < 6.5$, the importance of the ionic and hydrophobic interactions decreased with the increase of the TTR concentration. So, when the TTR concentration increased, the conversion of the random coil form of A β into the β -sheet structure decreased. These results demonstrated that A β was cleaved by TTR in a small fragment containing only the N₁ part, which remained in a random coil form and didn't form amyloidogenic deposits. Our results have clearly demonstrated that TTR reverses the effect of pH and therefore plays a protective role in Alzheimer's disease.

References

- [1] M. Hashimoto, H. Md Shuhail, S. Yamashita, M. Katakura, Y. Tanabe, H. Fujiwara, S. Gamoh, T. Miyazawa, H. Arai, T. Shimada, O. Shido, DHA disrupts in vitro amyloid β 1–40 fibrillation and concomitantly inhibits amyloid levels in cerebral cortex tissue of Alzheimer's disease model rats, *J. Neurochem.* 107 (2008) 1634–1646.
- [2] D.B. Teplow, Structural and kinetic features of amyloid β -protein fibrillogenesis, *Amyloid* 5 (1998) 121–142.
- [3] J.A. Hardy, G.A. Higgins, Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis, *Science* 256 (1992) 184–185.
- [4] J. Hardy, D.J. Selkoe, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science* 297 (2002) 353–356.
- [5] C. Soto, M.C. Irfalles, J. Alvarez, N.C. Inestrosa, The alpha-helical to beta-strand transition in the amino-terminal fragment of the amyloid beta-peptide modulates amyloid formation, *J. Neurochem.* 63 (1994) 1191–1198.
- [6] S. Zhang, K. Iwata, M.J. Lachmann, J.W. Peng, S. Li, E.B. Stimson, Y.A. Li, M. Felix, J.F. Maggio, J.P. Lee, The Alzheimer's peptide A β adopts a collapsed coil structure in water, *J. Struct. Biol.* 130 (2000) 130–141.
- [7] K. Pagel, T. Vagt, B. Knösch, Directing the secondary structure of polypeptides at will: from helices to amyloids and back again? *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005) 3843–3850.
- [8] M. Almeida Jr., C.J. Faro, M.J. Saraiva, M. Mendes Sousa, Transthyretin, a new cryptic protease, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 21431–21438.
- [9] S. Deechongkit, E.T. Powers, S.L. You, J.W. Kelly, Controlling the morphology of cross β -sheet assemblies by rational design, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 8562–8570.
- [10] H. Dong, D. Hartgerink, Role of hydrophobic clusters in the stability of α -helical coiled coils and their conversion to amyloid-like β -sheets, *Biomacromolecules* 8 (2007) 617–623.
- [11] J. Li, T. Kaneko, M. Shimohara, Y. Zhang, M.J. LaDu, H. Xu, C. Bu, Differential regulation of amyloid- β endocytic trafficking and lysosomal degradation by apolipoprotein E isoforms, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 44593–44601.
- [12] M. Pirchi, J. Marksteiner, C. Humpel, Effects of acidosis on brain capillary endothelial cells and cholinergic neurons: relevance to vascular dementia and Alzheimer's disease, *Neurol. Res.* 28 (2006) 657–664.
- [13] A.D. Snow, H. Mar, O. Nothlin, K. Kimata, M. Sato, S. Suzuki, J. Hassell, T.N. Wight, The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease, *Am. J. Pathol.* 133 (1988) 456–463.
- [14] S. Sarrazin, W.C. Lamanna, J.D. Esko, Heparan sulfate proteoglycans, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2011) 1–33.
- [15] W.J. Strittmatter, K.H. Weisgraber, D.Y. Huang, L.M. Dong, G.S. Salvesen, M. Pericak-Vance, D. Schmechel, D.E. Saunders, A.M. Goldgaber, A.D. Roses, Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 8098–8102.
- [16] A.L. Schwartzman, L. Gregori, M.P. Vitek, S. Lyubski, W.J. Strittmatter, J.J. Engelhardt, R. Blasin, J. Silverman, K.H. Weisgraber, P.K. Coyle, M.G. Zagorski, J. Talbot, M. Eisenberg, A.M. Saunders, A.D. Roses, D. Goldgaber, Transthyretin sequesters amyloid β protein and prevents amyloid formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 8368–8372.
- [17] E.M. Castano, A.E. Roher, C.L. Esh, T.A. Kokjohn, T. Beach, Comparative proteomics of cerebrospinal fluid in neuropathologically confirmed Alzheimer's disease and non-demented elderly subjects, *Neurol. Res.* 28 (2006) 155–163.
- [18] F. Ibrahim, Y.C. Guillaume, M. Thomassin, C. Andre, Magnesium effect on the acetylcholinesterase inhibition mechanism: a molecular chromatographic approach, *Talanta* 79 (2009) 804–809.
- [19] J.F.K. Huber, R.C. Gerrist, Evaluation of dynamic gas chromatographic methods for the determination of adsorption and solution isotherms, *J. Chromatogr. A* 58 (1971) 137–141.
- [20] C. Blumel, P. Hugo, A. Seidel Morgenstern, Quantification of single solute and competitive adsorption isotherms using a closed-loop perturbation method, *J. Chromatogr. A* 865 (1999) 51–71.
- [21] P. Jandera, S. Bernackova, K. Mithibachier, G. Guiochon, V. Bakojeva, J. Planeta, Fitting adsorption isotherms to the distribution data determined using packed micro-columns for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 925 (2001) 19–29.
- [22] C. André, Y.C. Guillaume, Reanalysis of chiral discrimination of phenoxycarboxylic acid herbicides on a teicoplanin phase using a Bi-Langmuir approach, *Chromatographia* 58 (2003) 201–206.
- [23] Y.C. Guillaume, C. Guiochon, Retention mechanism of weak polar solutes in reversed phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2869–2873.
- [24] C. André, Y.C. Guillaume, Saccharose effects on surface association of phenol derivatives with porous graphitic carbon, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 21–28.
- [25] C. André, C. Guyon, Y.C. Guillaume, Rodenticide – humic acid adsorption and role of humic acid on their toxicity on human keratinocytes: chromatographic approach to support biological data, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 295–302.
- [26] T. Bagnost, Y.C. Guillaume, M. Thomassin, J.F. Robert, A. Berthelot, A. Kiclama, C. André, Immobilization of acetylase and its application in an enzymatic chromatographic column: thermodynamic studies of non-NADH/acetylase binding and role of the reactive histidine residue, *J. Chromatogr. B* 856 (2007) 113–120.
- [27] Y.C. Guillaume, E. Peyrin, A. Berthelot, Chromatographic study of magnesium and calcium binding to immobilized human serum albumin, *J. Chromatogr. B* 728 (1999) 167–174.

- [27] G.M. Castillo, W. Lukito, T.N. Wigh, A.D. Snow, The sulfate moieties of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of beta-amyloid protein fibril formation, *J. Neurochem.* 72 (1999) 1681–1687.
- [28] J. McLaurin, T. Franklin, X.X. Zhang, J. Deng, P.E. Fraser, Interactions of Alzheimer amyloid-beta peptides with glycosaminoglycans effects on fibril nucleation and growth, *Eur. J. Biochem.* 266 (1999) 1101–1110.
- [29] S. Narindrasarak, D. Lowery, P. Gonzalez-Dewitt, T.A. Poorman, B. Greenberg, R. Kisilevsky, High affinity interactions between the Alzheimer's P-amyloid precursor proteins and the basement membrane form of heparan sulfate proteoglycan, *J. Biol. Chem.* 286 (1991) 12878–12883.
- [30] C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C. Masters, K. Beyreuther, Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease, *J. Mol. Biol.* 218 (1991) 149–163.
- [31] P.Y. Chou, C.D. Fasman, Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47 (1978) 45–148.
- [32] K. Pagel, S.C. Wagner, K. Samedov, H. von Berlepsch, C. Böttcher, B. Koksich, Random coils, β -sheet ribbons, and α -helical fibers: one peptide adopting three different secondary structures at will, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2196–2197.
- [33] M. Almeida Liz, C.J. Faro, M.J. Saraiva, M. Mendes Sousa, Transthyretin: a new cryptic protease, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 21431–21438.
- [34] R. Costa, A. Gonçalves, M.J. Saraiva, I. Cardoso, Transthyretin binding to A-beta peptide – impact on A-beta fibrillogenesis and toxicity, *FEBS Lett.* 582 (2008) 936–943.
- [35] A. Geneste, Y. Guillaume, N. Magy-Bertrand, C. Andre, Effect of transthyretin and pH on A β (1–40)/heparan sulfate proteoglycan association, in: *AAIPS Symposium*, 2013.