

Communauté française de Belgique

FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES
AGRONOMIQUES DE GEMBLoux

**Contribution à l'étude des peptides obliques
impliqués dans les phénomènes de
transconformation :**

Les protéines amyloïdogéniques

Année académique 2002-2003

Promoteur : Prof. R. Brasseur

Co-Promoteur : Dr. L. Lins

Mémoire de fin d'étude présenté par :

CROWET Jean-Marc

**En vue de l'obtention du grade
d'ingénieur chimiste et des bio-
industries**

© Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de la Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux.

Le présent document n'engage que son auteur.

A l'issue de ce travail, je voudrais remercier :

- Monsieur Robert Brasseur, promoteur de ce travail, pour son accueil au centre de Biophysique Moléculaire Numérique,
- Madame Laurence Lins, qui m'a initié à la modélisation moléculaire, pour son aide, ses conseils et sa motivation tout au long de la réalisation et de la rédaction de ce travail,
- Les techniciennes du laboratoire, ainsi que tout le personnel du CBMN pour leur accueil et leur sympathie,
- Ma famille, mes amis et plus particulièrement Elisa, pour leur soutien tout au long de mes études et de ce mémoire de fin d'étude.

Résumé

Les protéines amyloïdogéniques forment une famille de protéines dont l'étude est très importante pour la compréhension des phénomènes de transconformation. Ces protéines ont cette seule caractéristique commune de subir une modification de conformation conduisant à la formation de fibrilles très structurées. Cependant, ces protéines sont difficiles à étudier expérimentalement, de par leur faible solubilité et leur agrégation rapide en conformation anormale dues à une structure riche en β .

Récemment, des peptides obliques ont été détectés dans des protéines de ce type. Ces peptides sont de courts fragments protéiques (11 à 18 résidus) adoptant une orientation oblique lorsqu'ils interagissent avec une interface hydrophile/hydrophobe. Leur propriété d'obliquité provient du gradient d'hydrophobicité que ces peptides possèdent lorsqu'ils sont hélicoïdaux. Ces peptides sont capables de déstabiliser des systèmes organisés avec lesquels ils interagissent. Les protéines amyloïdogéniques possédant de tels peptides sont la protéine PrP, le peptide β amyloïde et les prions bactériens Ure2p et Sup35p.

La présence de tels fragments dans des protéines transconformationnelles suggère que les peptides obliques pourraient être impliqués dans les processus de transconformation. Ces peptides pourraient jouer un rôle de par leurs propriétés déstabilisantes et/ou leur labilité structurelle propre.

Le but de ce travail est de mettre en évidence des peptides obliques parmi d'autres protéines amyloïdogéniques décrites dans la littérature par des méthodes de modélisation moléculaire. Un des peptides obliques potentiels est testé expérimentalement quant à ses capacités fusogènes vis-à-vis des liposomes. A l'issue de cette étude, cinq peptides obliques, appartenant à quatre protéines amyloïdogéniques différentes, ont pu être mis en évidence parmi un ensemble de 27 protéines étudiées. Le peptide oblique détecté dans la séquence de l' α -synucléine, protéine impliquée dans la maladie de Parkinson, a été synthétisé. Ce dernier induit la fusion des phases lipidiques de liposomes, ce qui indique son caractère déstabilisateur. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une implication des peptides obliques dans les phénomènes de transconformation.

Abstract

The study of the amyloidogenic proteins is important to understand the transconformational processes. These proteins have a unique common feature : they undergo a conformational change leading to the formation of highly structured fibrils that are mainly β conformed. These proteins are difficult to study experimentally due to their low solubility and their tendency to aggregate rapidly.

Recently, tilted peptides have been detected in such proteins. These peptides are short fragments (11 to 18 residues) that adopt a tilted orientation when they interact with a hydrophilic/hydrophobic interface. This property is due to the presence of an asymmetric hydrophobicity gradient when they are helical. Those peptides are able to destabilize organized molecular systems. Amyloidogenic proteins containing such peptides are the PrP protein, the A β peptide, and the bacterial prions Ure2p and Sup35p.

The presence of such fragments in transconformational proteins has led to the hypothesis that tilted peptides could be implied in the conformational change of amyloidogenic proteins. These peptides could play a role through their destabilizing properties and/or their structural lability.

The aim of this work was to detect tilted peptides among other amyloidogenic proteins by molecular modelling. One of the detected peptides is tested experimentally to evidence its lipid destabilizing properties. Five tilted peptides from four different proteins have been detected among 27 amyloidogenic proteins. The tilted fragment from the α -synuclein sequence, a protein involved in Parkinson disease, has been synthetized and tested for lipid fusion. The fusogenic assays pointed out its destabilizing properties. These results support the hypothesis that tilted peptides could be involved in transconformational processes.

Table des matières :

I.	Introduction.....	1
I.1.	Les protéines amyloïdogéniques et les fibrilles amyloïdes.....	1
I.1.1.	Nature des dépôts amyloïdes.....	1
I.1.2.	Caractéristiques des fibrilles amyloïdes.....	2
I.1.3.	Problématique de l'étude des protéines amyloïdogéniques.....	3
I.1.4.	Les modèles structurels.....	3
I.1.5.	La cinétique de formation des fibrilles.....	4
I.1.6.	Le phénomène de transconformation.....	5
I.2.	Les protéines impliquées dans des maladies transconformationnelles.....	7
I.2.1.	Les prions.....	8
I.2.1.1.	Découverte des prions.....	8
I.2.1.2.	Conformation de la protéine PrP.....	9
I.2.1.3.	Etude de la transconformation.....	10
I.2.1.4.	La barrière inter-espèce et les souches de prions.....	11
I.2.1.5.	Modèles de propagation de la PrP ^{sc}	12
I.2.2.	Le peptide β amyloïde.....	13
I.2.2.1.	Origine du peptide β amyloïde.....	13
I.2.2.2.	Etudes conformationnelles du peptide β amyloïde.....	15
I.2.2.3.	Conformation du peptide β amyloïde dans les fibrilles.....	15
I.2.2.4.	Mécanisme de formation des fibrilles.....	16
I.2.3.	L' α -synucléine.....	17
I.2.3.1.	Pathologies associées à l' α -synucléine.....	17
I.2.3.2.	Structure de l' α -synucléine.....	18
I.2.3.3.	Interaction entre l' α -synucléine et les liposomes.....	18
I.2.3.4.	Effets des mutations A30P et A53T.....	19
I.2.3.5.	Particularités de l' α -synucléine et mise en évidence d'un peptide amyloïdogénique.....	19

I.3.	Les peptides obliques.....	21
I.3.1.	Propriétés des peptides obliques.....	21
I.3.2.	Importance biologique des peptides obliques.....	22
I.3.3.	Les peptides obliques et les protéines amyloïdogéniques.....	23
II	But du travail.....	24
III.	Matériel et méthodes.....	25
III.1	Matériel.....	25
III.1.1.	Modélisation moléculaire.....	25
III.1.2.	Partie expérimentale.....	25
III.2.	Méthodes.....	26
III.2.1.	Approche de modélisation moléculaire.....	26
III.2.1.1.	Analyse de la séquence.....	26
a)	La méthode HCA (Hydrophobic Cluster Analysis).....	26
b)	La méthode de Jähnig.....	27
c)	Les prédictions de structures secondaires.....	28
d)	Détermination de l'hydrophobicité moyenne $\langle H \rangle$	28
III.2.1.2.	Construction et minimisation des peptides.....	29
III.2.1.3.	Calcul des potentiels d'hydrophobicité moléculaires.....	29
III.2.1.4.	Méthode IMPALA	29
a)	Représentation de la bicouche phospholipidique.....	30
b)	Contrainte hydrophobe.....	31
c)	Contrainte de perturbation lipidique.....	31
III.2.2.	Méthodes expérimentales.....	32
III.2.2.1	Préparation des liposomes.....	32
a)	Les liposomes multilamellaires (MLV).....	32
b)	Les liposomes unilamellaires de grande taille (LUV).....	32
c)	Les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV).....	33
III.2.2.2.	Détermination de la concentration en phospholipides.....	33
III.2.2.3.	Mesures de fusion de phases lipidiques.....	33
III.2.2.4.	Mesures de spectroscopie infra-rouge FTIR.....	34

a) Préparation de la plaque.....	35
b) Détermination de la structure secondaire du peptide.....	35
IV. Résultats.....	37
IV.1. Recherche de protéines amyloïdogéniques.....	37
IV.2. Recherche de peptides obliques.....	39
IV.2.1. Stratégie de recherche.....	39
IV.2.2. Sélection sur base des données bibliographiques.....	40
IV.2.3. Sélection sur base des graphiques HCA.....	40
IV.2.4. Méthode de Jähnig.....	42
IV.2.5. Structure secondaire et prédiction de structure secondaire.....	44
IV.2.6. Calcul de la moyenne d'hydrophobicité.....	46
IV.2.7. Construction et minimisation des peptides.....	47
IV.2.8. Méthode Impala.....	48
IV.2.9. Présentation des peptides obliques des protéines amyloïdogéniques....	51
IV.3. Approche expérimentale.....	55
IV.3.1. Mesures de fusion de phase lipidique.....	55
IV.3.1.1. LUV.....	56
IV.3.1.3. SUV.....	58
IV.3.2. Détermination de la structure secondaire du peptide.....	59
V. Discussion.....	60
VI. Perspectives.....	65
VII. Bibliographie.....	67
VIII. Annexes.....	74

I. Introduction

I.1. *Les protéines amyloïdogéniques et les fibrilles amyloïdes*

Les protéines amyloïdogéniques forment une famille croissante de protéines dont le point commun est de subir, sous certaines conditions, une modification conformationnelle. La nouvelle conformation qu'elles adoptent permet aux protéines de s'assembler pour former des fibrilles amyloïdes (Kelly J.W., 1996) qui vont ensuite former des agrégats sous forme de plaques amyloïdes extracellulaires, d'enchevêtrements neuro-fibrillaires ou autres inclusions intracytoplasmiques ou intranucléaires (Žerovnik E., 2002).

I.1.1. Nature des dépôts amyloïdes

C'est Rudolph Virchow qui, en 1854, introduit le terme 'amyloïde' pour désigner les dépôts formés par ces protéines. Ceux-ci présentaient une réaction positive à la coloration à l'iode et il en a donc déduit que ces dépôts étaient formés d'hydrates de carbone. Cependant, des études ultérieures menées par Friedreich et Kekule ont démontré que les dépôts amyloïdes étaient principalement formés de protéines. Par la suite, il a été montré que les protéines formant ces dépôts correspondaient à des protéines assumant un rôle physiologique. En 1970, Glenner et ses collègues ont été les premiers à identifier la protéine constituant un dépôt amyloïde : il s'agissait de chaînes légères d'immunoglobuline (Glenner G.G. *et al.*, 1970). Aujourd'hui, plus de vingt protéines possédant des propriétés amyloïdogéniques sont connues (Jaskólski M., 2001). Les dépôts amyloïdes ne se composent pas uniquement des protéines amyloïdogéniques, d'autres composants sont présents. Ceux-ci incluent la protéine amyloïde P du sérum (SAP), l'héparane sulfate protéoglycane et l'apolipoprotéine E. Bien que le sérum amyloïde P et les protéoglycanes soit toujours présents *in vivo*, des fibrilles peuvent être formées *in vitro* en leur absence. De plus, comme les fibrilles formées *in vitro* et *in vivo* possèdent des propriétés similaires, elles sont généralement considérées comme identiques au point de vue biochimique et structurel (Sipe J.D. *et al.*, 2000).

I.1.2. Caractéristiques des fibrilles amyloïdes

Les dépôts amyloïdes possèdent plusieurs propriétés qui permettent de les caractériser. Le premier critère fut décrit par Divry et Florkin en 1927. Sous une lumière polarisée, les dépôts amyloïdes colorés au rouge Congo possèdent une biréfringence vert pomme caractéristique (Divry P. *et al.*, 1927). D'autre part, des études de microscopie électronique menées en 1959 par Cohen et ses collègues sur ces dépôts ont permis de montrer que les dépôts amyloïdes sont composés de fibrilles de 60 à 130 Å de large dont la longueur varie entre 1.000 et 16.000 Å (Figure I.1.) (Cohen A.S. *et al.*, 1959). Par la suite, de nombreuses études ont établi une structure consensus pour les fibrilles amyloïdes dans laquelle la fibrille est composée d'au moins deux protofibrilles de 25 à 35 Å de large s'enroulant l'une autour de l'autre de façon hélicoïdale (Figure I.2.) (Shirahama T. *et al.*, 1967 ; Jaskólski M., 2001 ; Dobson C.M., 1999).

Enfin, la diffraction aux rayons X a montré que les fibrilles amyloïdes ont une structure ordonnée dans laquelle les chaînes polypeptidiques adoptent une conformation β perpendiculaire à l'axe d'élongation de la fibrille. Cette structure est appelée "cross β " (Figure I.2.) (Blake C. *et al.*, 1996 ; Jaskólski M., 2001).

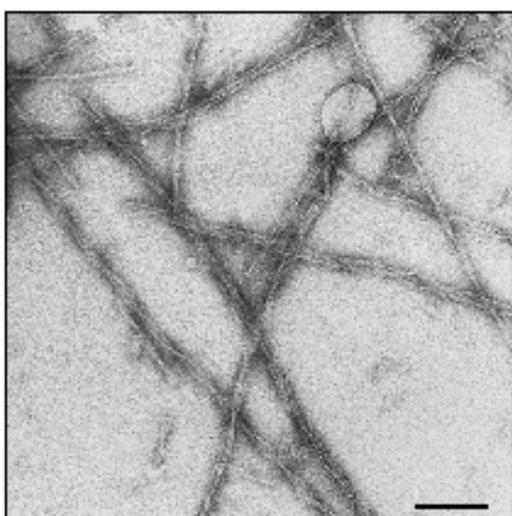


Figure I.1. : Fibrilles vues par microscopie électronique

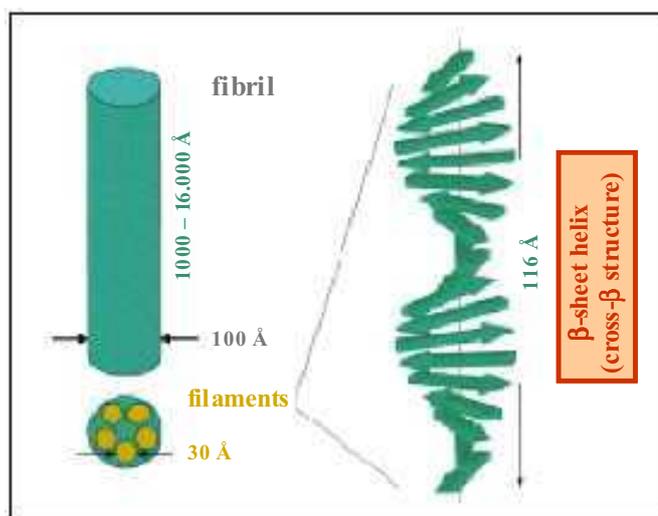


Figure I.2. : Schéma montrant la structure et la taille des fibrilles et des protofibrilles

I.1.3. Problématique de l'étude des protéines amyloïdogéniques

L'étude de la transconformation et de l'agrégation des protéines amyloïdogéniques a un grand intérêt car ces phénomènes sont étroitement liés à l'apparition de maladies incurables et très connues telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou de Creutzfeldt-Jakob (Žerovnik E., 2002). L'étude de ces protéines dans leur conformation amyloïdogénique est particulièrement difficile car elles ont tendance à s'agréger rapidement en solution pour former des fibrilles insolubles et résistantes à la protéolyse. Ceci explique pourquoi la conformation amyloïdogénique d'aucune de ces protéines n'a encore été déterminée expérimentalement (Sipe J.D. *et al.*, 2000).

A l'état natif, les protéines amyloïdogéniques possèdent peu d'homologies de séquence et de structure entre elles (Kelly J.W., 1996). Leur conformation native peut en effet être hélicoïdale ou en feuillet β en passant par des protéines non structurées. Cependant, le changement conformationnel qu'elles subissent accroît généralement leur contenu en β (Grateau G., 2000). De plus, bien que l'on considère généralement que la transconformation de ces protéines est associée à une pathogénicité, plusieurs études récentes réalisées *in vitro* ont montré que des protéines, telles que l'apo-myoglobine et le domaine SH3 de la phosphatidylinositol-3-kinase, pouvaient former des fibrilles sans pour autant être associées à une maladie. Ces observations ont poussé Dobson et ses collègues à proposer l'hypothèse selon laquelle toutes les protéines peuvent former des fibrilles amyloïdes si les conditions déstabilisantes sont suffisantes (Dobson C.M., 1999 ; Fändrich M. *et al.*, 2001).

I.1.4. Les modèles structurels

La structure des fibrilles amyloïdes n'est actuellement pas connue avec précision. Cependant, sur base de données expérimentales, les études structurelles ont proposé plusieurs modèles. Le modèle des feuillets β organisés en hélice présenté à la figure I.2 est le plus répandu. Celui-ci a été construit à partir de l'étude par diffraction aux rayons X de fibrilles formées par un mutant de la transthyretine (Blake C. *et al.*, 1996).

Selon Jaskólski, les brins β formeraient des feuilletts β antiparallèles (Jaskólski M., 2001). Cependant, les spots de diffraction ne peuvent déterminer si les brins β sont parallèles, antiparallèles ou les deux (Jenkins J. *et al.*, 2001).

Perutz M.F. *et al.* font part d'une autre organisation des protofibrilles dans laquelle les brins β s'organiseraient de façon cylindrique pour former une hélice β (voir figure I.3.) (Perutz M.F. *et al.*, 2002). Dans ce type de structure déjà déterminée pour des protéines non amyloïdogéniques (cf. l'UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase), les brins β de l'hélice créent des ponts hydrogène avec leurs voisins pour former un feuillet β parallèle (Wetzel R., 2002). Une structure de ce type a également été proposée par l'équipe de Prusiner sur base de données de microscopie électronique obtenues pour la protéine PrP (Wille H. *et al.*, 2002) et pour d'autres protéines comme la β -2-microglobuline (Wetzel R., 2002).



Figure I.3. : Hélice β parallèle formée par les résidus 1-178 de l'UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase (Protein Data Bank code 1 lxa) (Wetzel R., 2002)

I.1.5. La cinétique de formation des fibrilles

Le phénomène de transconformation et de formation des fibrilles au point de vue moléculaire et énergétique reste très mal connu. Selon Kelly, la formation de fibrilles amyloïdes résulterait d'une combinaison de facteurs incluant la structure primaire et de paramètres thermodynamiques de l'environnement (Kelly J.W., 1998). Différents facteurs déclenchant ces processus ont par ailleurs été déterminés. Il s'agit notamment de la protéolyse, de la présence de mutations, de l'augmentation de la concentration et des modifications du pH ou de la température (Grateau G., 2000). Les mutations connues pour être associées à des amyloïdoses héréditaires semblent agir par déstabilisation de l'état natif

de la protéine. Dans le cas de la transthyretine, une diminution du pH déstabilise les tétramères et produit un monomère qui est l'intermédiaire amyloïdogénique (Kelly J.W., 1996).

La formation des fibrilles dépend de la concentration en protéine aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* et les études cinétiques suggèrent un mécanisme de nucléation conduisant à la formation des fibrilles (Figure I.4.) (Jenkins J. *et al.*, 2001). Ce mécanisme est caractérisé par une étape de latence dans laquelle une série d'interactions défavorables se produisent de manière lente et réversible pour former un noyau oligomérique. Ensuite vient l'étape de croissance dans laquelle le noyau grossit rapidement pour former des polymères plus larges (Harper J.D. *et al.*, 1997).

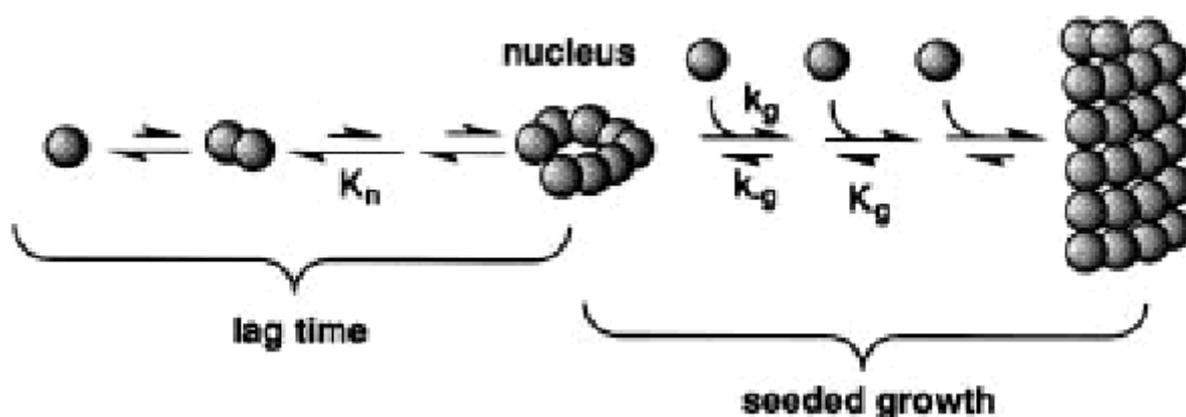


Figure I.4. : Schéma du mécanisme de nucléation-polymérisation. Pendant la phase de latence, une série d'associations protéine-protéine avec une constante d'équilibre défavorable (K_n) conduit à la formation d'un noyau. Ensuite, la phase de croissance se déroule. Dans celle-ci, l'association est favorisée (K_d) et conduit à la formation des fibrilles (Harper J.D. *et al.*, 1997).

I.1.6. Le phénomène de transconformation

En 1972, Anfinsen et ses collègues émettent l'hypothèse selon laquelle la séquence des acides aminés d'une protéine contient toutes les informations nécessaires pour le repliement correct de celle-ci dans sa conformation native (Anfinsen C.B., 1973). Selon cette hypothèse, une séquence particulière ne pourrait adopter qu'une seule conformation. Le repliement des protéines résulterait de la combinaison des préférences locales et globales des acides aminés à travers la séquence protéique (Cohen B.I. *et al.*, 1993).

Cependant, le nombre de protéines connues pour adopter plus d'une conformation ne cesse de s'accroître. Les recherches des Kabsch et Sander ont par ailleurs montré que des pentapeptides pouvaient se trouver aussi bien en conformation α dans une protéine et qu'en β dans une autre (Kabsch W. *et al.*, 1984). Cela suggère que les paramètres de l'environnement ont de l'importance dans le repliement des protéines.

En 1991, Kelly a pu montrer que de la transthyretine purifiée pouvait être convertie en fibrilles amyloïdes par l'intermédiaire d'un changement de conformation induit par une diminution de pH (Colon W. *et al.*, 1991). Cependant, l'idée qu'un changement de conformation était à la base du processus de formation des fibrilles amyloïdes n'a pas été acceptée immédiatement par la communauté scientifique. A cette époque, les chercheurs pensaient que la protéolyse était nécessaire à la formation des fibrilles (Kelly J.W., 1998). Aujourd'hui, cette hypothèse est largement admise et est supportée par de nombreuses publications.

I.2. Les protéines impliquées dans des maladies transconformationnelles

Depuis 1970, année durant laquelle Glenner identifia pour la première fois une protéine constitutive des dépôts amyloïdes, plus d'une vingtaine d'autres ont été identifiées (Table I.1.). Celles-ci correspondent à des protéines naturelles assumant un rôle physiologique et possèdent des séquences, des structures et des fonctions différentes. Cependant, ces protéines sont capables, sous certaines conditions, d'adopter une nouvelle conformation, dite amyloïdogénique, principalement β qui leur permet de former des fibrilles. De plus, ce phénomène de transconformation est généralement associé à une pathogénicité.

Protéines liées à l'immunité/inflammation

- fragments d'immunoglobuline
- β 2-microglobuline
- serum amyloid A
- lysozyme
- fibrinogène α
- cystatine C

Protéines liées au système endocrinien

- islet amyloid polypeptide
- atrial natriuretic factor
- procalcitonine
- prolactine
- insuline

Protéines de transport

- transthyretine
- apolipoprotéine AI
- lactoferrine

Protéines liées au système nerveux

- peptide A β
- protéine PrP
- α -synucléine

Protéines de la mobilité cellulaire

- gelsoline

Table I.1. : Protéines humaines associées à des dépôts amyloïdes (Jaskólski M., 2001)

De nombreuses études ont été réalisées sur ces protéines pour mieux comprendre le phénomène de transconformation et la pathogénicité qui lui est associée. Dans ce chapitre,

trois protéines amyloïdogéniques causant des maladies neurodégénératives très connues sont présentées. Il s'agit de la protéine PrP, du peptide β amyloïde et de l' α -synucléine.

I.2.1. Les prions

Les prions sont des agents pathogènes causant des maladies neurodégénératives humaines et animales dont l'origine peut aussi bien être d'ordre infectieux, génétique ou sporadique. Les maladies à prions humaines incluent le kuru, la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD), le syndrome de Gerstman-Straussler-Scheinker (GSS) et l'insomnie familiale fatale (FFI). En ce qui concerne les espèces animales, les maladies à prions incluent entre autres le scrapie et l'encéphalopathie spongiforme bovine (BSE) (ou maladie de la vache folle) (Prusiner S.B., 1996).

Ces maladies sont dues au changement de conformation d'une protéine normale retrouvées dans les cellules de mammifères, la protéine PrP. La PrP^c, qui désigne la protéine dans sa forme native, va être convertie en PrP^{sc}, qui désigne la protéine dans sa conformation pathogène. Au cours de cette conversion, une portion de la structure hélicoïdale et random-coil de la PrP^c va être transformée en feuillet β . (Prusiner S.B., 1998)

I.2.1.1. Découverte des prions

En 1982, Prusiner introduit le terme 'prion' (proteinaceous infectious particles) pour distinguer ces agents infectieux des virus. Les virus possèdent un matériel génétique, ADN ou ARN. Malgré les nombreuses études réalisées, aucune séquence nucléotidique associée à ces particules infectieuses n'a pu être mise en évidence.

En 1967, Alper et ses collègues ont démontré que l'agent pathogène du scrapie était très résistant au rayonnement ultra-violet qui dégrade normalement l'ADN (Alper T. *et al.*, 1967). Les études de Prusiner ont ensuite montré que le pouvoir infectieux n'était pas réduit par les méthodes qui dégradent l'ADN mais par les méthodes qui dénaturent les protéines. Prusiner proposa alors l'hypothèse selon laquelle les prions sont des particules protéiques transmissibles ne possédant pas d'ADN. Peu après, la protéine PrP fut identifiée.

Cette protéine est codée par un gène chromosomal et se trouve sous deux formes, l'une normale et sensible aux protéases, PrP^c, et l'autre pathogène, insoluble et résistante, PrP^{sc}. Cette dernière est l'agent pathogène formant les prions. La PrP^{sc}, dont la conformation est anormale, serait également responsable de la propagation de la maladie car elle est capable de transformer PrP^c en PrP^{sc} (Prusiner S.B., 1996). C'est cette hypothèse qui valut à Prusiner de recevoir le prix Nobel de médecine en 1997.

I.2.1.2. Conformation de la protéine PrP

Les deux isoformes de la protéine PrP possèdent la même séquence de 254 résidus et les études de spectrométrie de masse ont montré que leurs modifications posttranslationnelles ne permettaient pas de les distinguer. Elles ne se différencient donc que par leur conformation. Des études de spectroscopie infra-rouge (FTIR) et de dichroïsme circulaire ont démontré que la PrP^c contient 42% d'hélice α et 3% de feuillet β alors que la PrP^{sc} contient 30% d'hélice α et 43% de feuillet β (Prusiner S.B., 1996).

Dans un premier temps, à partir de la comparaison des séquences des protéines PrP de différentes espèces, de données expérimentales et d'études de modélisation moléculaire, quatre régions en hélice α ont pu être proposées et un modèle tridimensionnel de PrP^c a été généré (Figure I.5.A.). Ces hélices correspondent à la séquence 109-122 (hélice 1), 129-141 (hélice 2), 178-191 (hélice 3) et 202-213 (hélice 4).

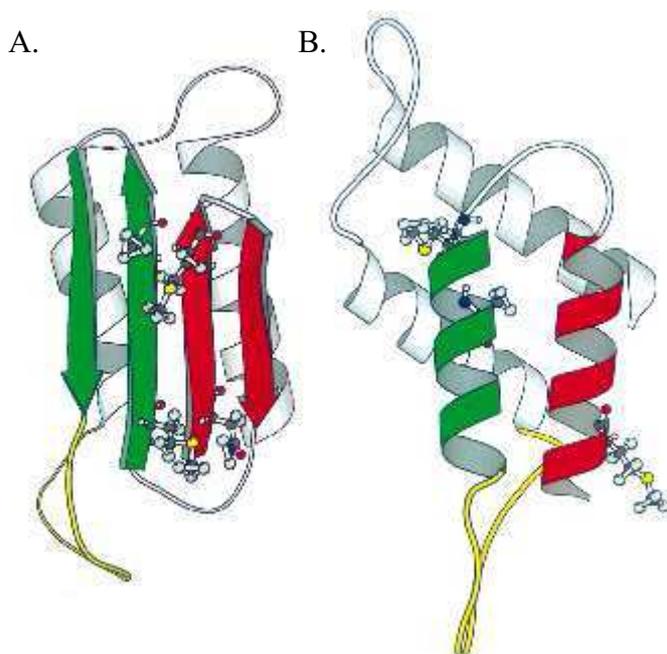


Figure I.5. : Modèles plausibles pour la conformation de la PrP^{sc} (A) et de la PrP^c (B) (Huang Z. *et al.*, 1995)

Les figures I.5.A. et I.5.B. représentent des modèles plausibles pour la structure tertiaire de PrP^c et de PrP^{sc}. Cette dernière a été modélisée en tenant compte de résultats expérimentaux sur la conformation de fragments de PrP (voir plus loin) et a été choisie parmi six autres modèles car sa structure présentait notamment une meilleure corrélation avec les résidus impliqués dans la barrière inter-espèce (Harrison P.M. *et al.*, 1997).

La structure tertiaire de PrP^c, correspondant à la séquence PrP(121-230), a très récemment été déterminée par spectroscopie RMN (Figure I.6.) (Riek R. *et al.*, 1996). Cette structure comporte trois hélices α et deux brins β de quatre résidus (128-131 et 161-164). Ces derniers ne se retrouvent pas dans le modèle de la figure I.5.B. (Harrison P.M. *et al.*, 1997).

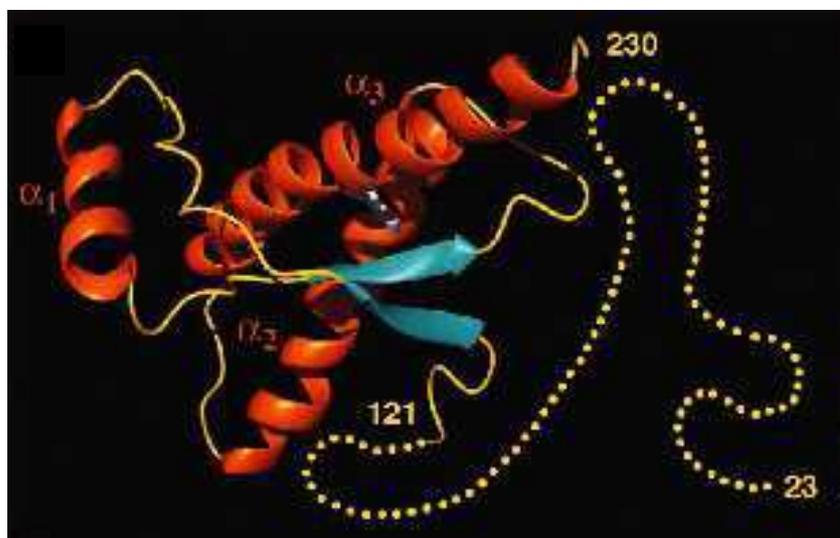


Figure I.6. : Schéma de la structure tridimensionnelle de la protéine prion humaine hPrP (23-230). Les hélices α sont représentées en rouge, les brins β en bleu et le domaine C-terminal non structuré en jaune (Zahn R. *et al.*, 2000).

I.2.1.3. Etude de la transconformation

La spectroscopie infra-rouge (FTIR) a montré que les peptides correspondant aux quatre régions prédites en hélice α ainsi que les segments PrP(113-127) et PrP(113-120) pouvaient aussi bien adopter une conformation α que β , en fonction de leur environnement. En solution, ces peptides, excepté PrP(129-141), adoptent une conformation β et précipitent lentement sous forme de fibrilles amyloïdes. Le peptide PrP(113-120) est le plus amyloïdogénique

(Harrison P.M. *et al.*, 1997). Nguyen *et al.* ont également montré que la région PrP(109-122) est importante pour le processus de conversion de PrP^c en PrP^{sc}. De petites quantités de PrP(109-122) sont capables d'induire la formation d'agrégats riches en structure β chez les fragments PrP(104-122) et PrP(129-141) qui ont normalement une structure hélicoïdale ou random-coil en solution (Nguyen J. *et al.*, 1995). De plus, la séquence 109-122, correspondant à l'hélice 1, est la région la plus conservée à travers les espèces et la présence de mutations dans cette région est associée à des formes héréditaires des maladies à prions (Harrison P.M. *et al.*, 1997).

I.2.1.4. La barrière inter-espèce et les souches de prions

Dans les années 1970, Gajdusek démontra que le scrapie pouvait être transmise d'un animal à un autre via l'injection intracérébrale d'une préparation de tissu de cerveau infecté (Gajdusek D.C. *et al.*, 1966). Cependant, la transmission de la maladie d'une espèce à une autre peut se révéler difficile, voire impossible. Ce phénomène est appelé 'barrière inter-espèce' et différentes expériences utilisant des souris transgéniques ont montré que c'est uniquement la différence entre la séquence des gènes des deux espèces qui est responsable de cette barrière. On parlera donc de souches de PrP. A ce sujet, les maladies à prions ont pris un nouvel aspect avec l'apparition de cas de CJD atypique chez de jeunes patients anglais alors que dans ce pays, plusieurs milliers de bovins mouraient de la BSE. Il semble donc possible que les prions bovins puissent passer aux hommes par le biais de l'alimentation (Prusiner S.B., 1996 ; Coulthart M.B. *et al.*, 2001).

Les maladies à prions peuvent aussi avoir une origine familiale et à ce jour, on connaît plus de 20 mutations du gène de la PrP causant les formes héréditaires de ces maladies (Figure I.7.). Certaines de ces mutations sont connues pour induire la forme familiale de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, la maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker et l'insomnie fatale familiale (Prusiner S.B., 1994).

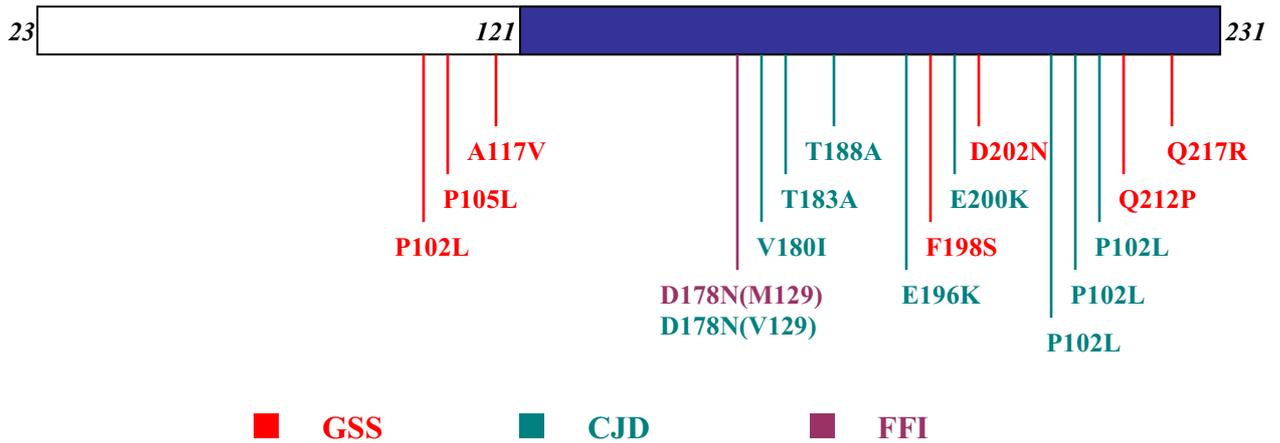


Figure I.7.: Mutations de la protéine PrP associées aux formes familiales des maladies à prions (GSS = Gerstmann-Sträussler-Scheinker, CJD = Creutzfeldt-Jakob Disease et FFI = Insomnie Fatale Familiale)

I.2.1.5. Modèles de propagation de la PrP^{Sc}

Deux modèles de propagation de la PrP^{Sc} ont été proposés : le premier est le modèle catalytique ou “template-assistance model” (Figure I.8.) et le deuxième est le modèle de nucléation-polymérisation (Figure I.9.). Pour le premier modèle, un monomère ou un dimère de PrP^{Sc} va se lier à une ou deux chaînes de PrP^C ou de PrP*. Cette dernière correspond à un intermédiaire métastable ou partiellement déplié par lequel pourrait passer PrP lors de sa conversion en PrP^{Sc}. Cette liaison va diminuer l’énergie d’activation pour la formation de PrP^{Sc} qui pourra ensuite interagir avec d’autres protéines normales.

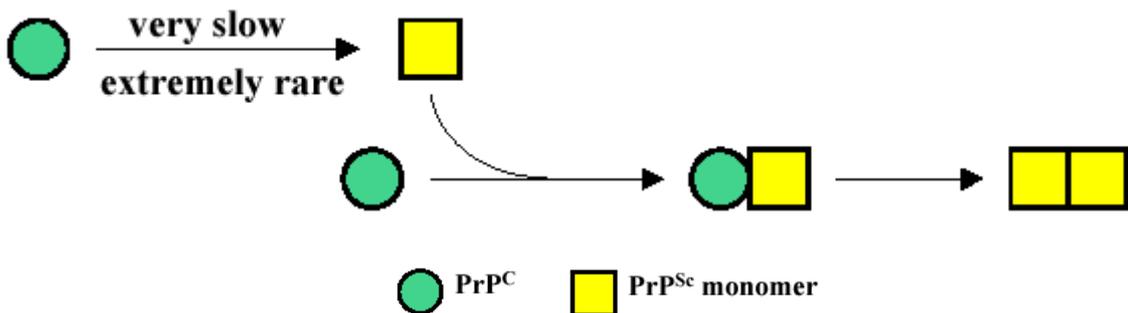


Figure I.8.: Représentation schématique du modèle catalytique

Le modèle de nucléation-polymérisation a été décrit précédemment. Brièvement, la première étape consiste en la formation d'un noyau prenant la forme d'un multimère de PrP^{sc} et mène au processus de polymérisation dans lequel des monomères de PrP sont ajoutés au noyau (Harrison P.M. *et al.*, 1997).

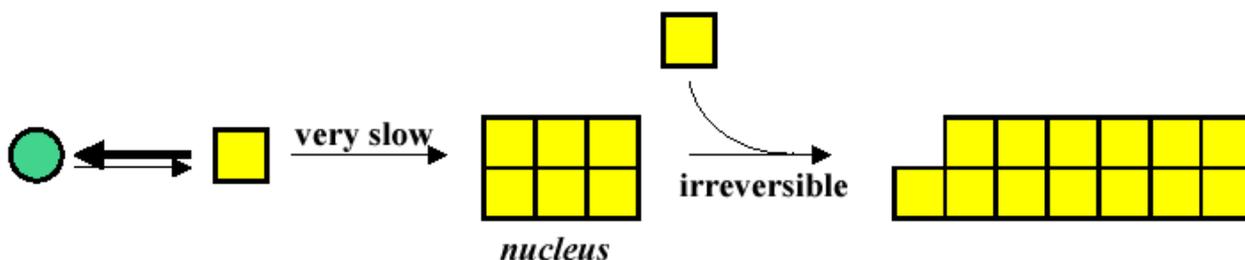


Figure I.9. : Représentation schématique du modèle de nucléation-polymérisation

Ces modèles se basent sur un mécanisme où seule la protéine prion interagirait. Cependant, des études menées sur des souris transgéniques ont montré qu'une protéine, appelée protéine X, pourrait être une chaperonne moléculaire impliquée dans le repliement de la PrP^{sc} (Telling G.C. *et al.*, 1995).

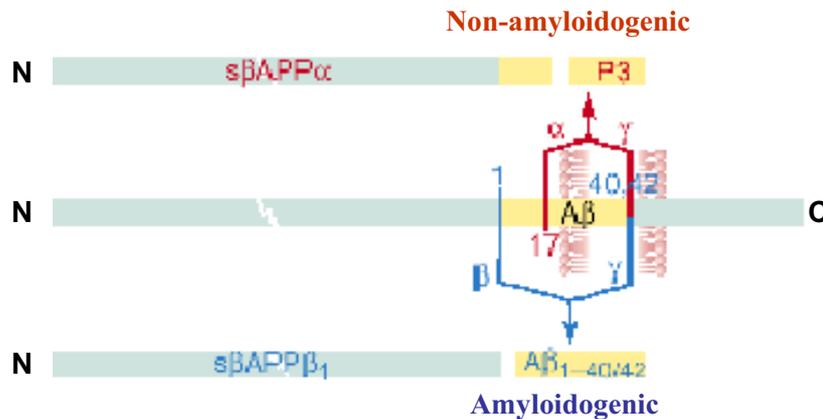
I.2.2. Le peptide β amyloïde

Le peptide β amyloïde (ou A β) est le composant majeur des plaques séniles extracellulaires trouvées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Masters C.L. , 1985). Cette dernière est une maladie neurodégénérative associée à une perte progressive de la mémoire et est caractérisée par la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires, constitués de la protéine Tau anormalement phosphorylée, et des plaques séniles extracellulaires, constituées de fibrilles amyloïdes formées à partir du peptide A β (Mager P.P. *et al.*, 2002 ; Kelly J.W., 1996).

I.2.2.1. Origine du peptide β amyloïde

Le peptide A β , dont la taille varie entre 39 et 43 résidus, est le produit normal du clivage d'une protéine transmembranaire appelée APP (β -amyloid precursor protein) et se retrouve dans le fluide cérébrospinal. Cependant, sa fonction biologique reste inconnue (Sisodia S.S. *et al.*, 1995). Le clivage de l'APP peut avoir lieu de deux façons différentes et fait intervenir trois enzymes : l' α -, la β -, et la γ -secrétase (Figure I.10.). Si l'APP est clivée par l' α -secrétase

puis par la γ -secrétase, il va y avoir production du peptide p3 qui est considéré comme non-amyloïdogénique. Par contre, si l'APP est clivée par la β -secrétase puis par la γ -secrétase, il va y avoir production du peptide A β amyloïdogénique. Cependant, le site de clivage de la γ -secrétase peut varier et les résidus 39 à 43 peuvent correspondre au résidu C-terminal du peptide A β (Clippingdale *et al.*, 2001).



Domaine extracellulaire

Domaine intracellulaire

Figure I.10. : Représentation schématique du clivage de l'APP. La voie de formation du fragment P3 emprunte les flèches rouges et la formation des différents fragments A β , les flèches bleues. La membrane est schématisée en rose (Gasparini L. *et al.*, 2002).

Les formes A β 1-40 et A β 1-42 représentent environ 90 et 10% de la quantité de peptides A β retrouvée chez des individus sains. Cependant, le peptide A β 1-42 est l'espèce prédominante dans les plaques séniles et il s'agrège plus vite que le peptide A β 1-40 (Clippingdale *et al.*, 2001). Ceci suggère qu'une petite élongation de la région hydrophobe du côté C-terminal modifie la tendance qu'a ce peptide à s'agréger (Jarrett J.T. *et al.*, 1993).

Des mutations dans le gène de la protéine APP sont associées à des formes héréditaires de la maladie. La plupart provoquent une augmentation de la production de A β (1-42). Il a également été montré que des mutations de la préséniline sont associées au développement de la maladie d'Alzheimer et provoquent aussi une augmentation de la production de A β (1-42). Ces données suggèrent que l'espèce (1-42) est plus pathogène que A β (1-40) (Selkoe D.J., 1997).

I.2.2.2. Etudes conformationnelles du peptide β amyloïde

Les études conformationnelles de $A\beta$ en solution sont compliquées en raison de sa tendance à s'agréger. De plus, ces études ont montré qu'*in vitro*, le peptide $A\beta$ pouvait adopter des conformations différentes en fonction des conditions expérimentales et de la longueur du fragment étudié. Dans le cas du peptide $A\beta$ cette flexibilité conformationnelle est intéressante puisqu'elle peut être associée à une transition d'une structure α et random-coil à une structure β causant l'agrégation du peptide et la formation des fibrilles amyloïdes (Crescenzi O. *et al.*, 2002).

Plusieurs études réalisées en solution montrent que le peptide $A\beta$ adopte plutôt une conformation random-coil. Cependant, des études RMN des peptides $A\beta$ 1-40 et $A\beta$ 1-42 menées dans différents solvants mimant l'interface entre un milieu aqueux et apolaire, comme des micelles de SDS, et dans des solvants reproduisant un microenvironnement apolaire, comme une solution de trifluoroéthanol, ont permis de mettre en évidence deux régions hélicoïdales (8-25 et 28-38) séparées par un β -turn. Il est intéressant de voir que la seconde hélice correspond à la région transmembranaire de l'APP et qu'elle pourrait donc s'insérer dans les membranes (Coles M. *et al.*, 1998).

De plus, la similarité de cette structure avec celle du domaine de fusion de l'influenza hemagglutinine ainsi que l'homologie de séquence entre le domaine C-terminal du peptide $A\beta$ et le domaine de fusion de ce virus suggère un mécanisme direct de neurotoxicité (Crescenzi O. *et al.*, 2002). Une explication possible pour la neurotoxicité de ce peptide pourrait être la formation de pores dans la membrane causant la mort neuronale (Kawahara M. *et al.*, 2000).

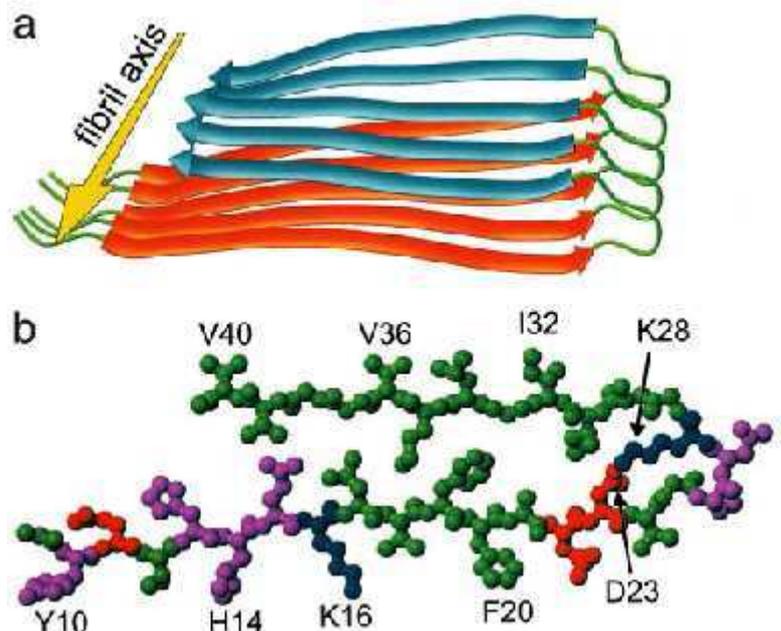
I.2.2.3. Conformation du peptide β amyloïde dans les fibrilles

En ce qui concerne la conformation du peptide $A\beta$ dans les fibrilles amyloïdes, plusieurs modèles moléculaires ont été proposés. Un modèle récent est présenté à la figure I.11. Celui-ci a été construit à partir de données expérimentales obtenues, entre autres, par RMN en phase solide. Dans ce modèle, les dix premiers résidus ne sont pas structurés tandis que les résidus 12-24 et 30-40 adoptent une conformation en brin β et forment des feuillets β parallèles. Cette structure, qui correspond à une protofibrille, formerait les fibrilles en juxtaposant les faces hydrophobes de deux protofibrilles (Petkova A.T. *et al.*, 2002).

Figure I.11. : Modèle structurel du peptide A β dans les protofibrilles.

A) Représentation schématique d'une protofibrille. L'axe est indiqué par une flèche jaune et les feuillets parallèles, en rouge (résidus 12-24) et en bleu (résidus 30-40).

B) Détail des acides aminés. Les acides aminés hydrophobes sont représentés en vert, les polaires en mauve, les chargés négativement en rouge et les chargés positivement en bleu (Petkova A.T. *et al.*, 2002).



En général, les modèles proposés antérieurement étaient basés sur une structure en feuillet β antiparallèle. Cependant, les études RMN en phase solide ont montré que cette structure était peu probable. Plusieurs groupes ont également suggéré un modèle en hélice β pour certaines fibrilles amyloïdes mais elle n'a pas été établie pour le peptide A β (Petkova A.T. *et al.*, 2002).

I.2.2.4. Mécanisme de formation des fibrilles

Comme pour la PrP, le peptide A β suivrait un mécanisme de nucléation-polymérisation (Harper J.D. *et al.*, 1997). Plusieurs études ont démontré l'importance du domaine C-terminal dans l'agrégation et la stabilisation des fibrilles (Lansbury P.T.J. *et al.*, 1995). Un rôle a également été suggéré pour le domaine central du peptide A β . Hughes *et al.* ont démontré que le peptide A β pouvait interagir avec lui-même et suggéré que cette interaction pourrait être une étape dans la formation des fibrilles (Hughes S.R. *et al.*, 1996). De plus, le peptide A β 1-42 pourrait agir comme un noyau de nucléation pour l'agrégation du peptide A β 1-40 (Jarrett J.T. *et al.*, 1993).

I.2.3. L' α -synucléine

L' α -synucléine est une petite protéine cytosolique de 140 acides aminés appartenant à une famille de protéines regroupant la β -synucléine, la γ -synucléine et le synoretine. La fonction et la conformation de l' α -synucléine ne sont pas connues avec précision. Cependant, cette abondante protéine présynaptique pourrait réguler le relargage de neurotransmetteurs et contribuer à la plasticité synaptique. L' α -synucléine est principalement exprimée dans les neurones du système nerveux central et est concentrée dans le terminus présynaptique (Chandra S. *et al.*, 2003).

I.2.3.1. Pathologies associées à l' α -synucléine

L' α -synucléine est associée à plusieurs pathologies incluant la maladie de Parkinson, la variante à corps de Lewy de la maladie d'Alzheimer, la démence avec corps de Lewy, la "multiple system atrophy" et la maladie de Hallervorden-Spatz (Giasson B.I. *et al.*, 2001). Deux mutations dans le gène de l' α -synucléine sont également associées à des formes précoces de la maladie de Parkinson. Ces variants correspondent au remplacement d'une alanine par une proline en position 30 (A30P) et d'une alanine par une thréonine en position 53 (A53T) (McLean P.J. *et al.*, 2000). Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, un fragment de 35 résidus (acides aminés 61-95) appelé NAC (Non-Amyloid Component) se retrouve dans les plaques amyloïdes (Uéda K. *et al.*, 1993). Dans les neurones, l' α -synucléine anormale forme des fibrilles qui vont former les corps de Lewy ou d'autres corps d'inclusion.

En ce qui concerne la pathogénicité, des articles récents montrent que les oligomères d' α -synucléine ont une plus grande affinité pour des liposomes que les monomères ou les fibrilles et que ces oligomères sont capables de perméabiliser les liposomes en adoptant une structure de type canal (Lee H.J. *et al.*, 2002). Cependant, l' α -synucléine et le fragment NAC libèrent des radicaux hydroxyles lorsqu'elles sont incubées avec du Fer II, au contraire de la β - et la γ -synucléine. Cela suggère que la production de peroxyde d'hydrogène à partir d'agrégats d' α -synucléine pourrait induire des dommages oxydatifs menant à la mort des cellules neuronales (Turnbull S. *et al.*, 2001).

I.2.3.2. Structure de l' α -synucléine

L' α -synucléine est composée de sept répétitions imparfaites de onze résidus du côté N-terminal et d'une queue hydrophile du côté C-terminal. En solution, l' α -synucléine n'est pas structurée. Cependant, celle-ci adopte une conformation en hélice α lorsqu'elle interagit avec les phospholipides de la membrane. Son contenu en hélice α passe de 3% à environ 80%. Dans l' α -synucléine repliée, les 98 résidus du côté N-terminal sont structurés alors que les 42 résidus du côté C-terminal sont en configuration random-coil (Davidson W.S. *et al.*, 1998 ; Chandra S. *et al.*, 2003).

L'analyse de la séquence de l' α -synucléine révèle cinq hélices α amphipathiques potentielles (Davidson *et al.*, 1998). Grâce à différentes techniques expérimentales, Chandra S. *et al.* ont montré que la région N-terminale est composée de deux hélices α (1-43 et 46-98). Ils suggèrent qu'elles se formeraient seulement à l'interface protéine/liposomes (Chandra S. *et al.*, 2003).

Dans les corps de Lewy, l' α -synucléine se trouverait sous forme d'agrégats de brins β . Selon Lee H.J. *et al.*, l'agrégation de l' α -synucléine en dimères et multimères semble être favorisée par l'environnement lipidique qui induit cependant une conformation α de la protéine. Ces derniers ont également montré que, sous sa forme hélicoïdale, l' α -synucléine a une propension plus grande à s'agréger que la forme cytosolique non structurée et que les agrégats formés accélèrent l'agrégation des protéines cytosoliques. De plus, leurs résultats montrent que la structure β pourrait se former à partir de petit oligomères d' α -synucléine conservant une partie de leur structure en hélice (Lee H.J. *et al.*, 2002).

I.2.3.3. Interaction entre l' α -synucléine et les liposomes

Davidson *et al.* rapportent que l' α -synucléine se lie préférentiellement à de petites vésicules formées d'une monocouche contenant des phospholipides acides. La liaison semble être stabilisée par des interactions ioniques entre l' α -synucléine chargée positivement et les phospholipides chargés négativement. De plus, la protéine a une plus grande affinité pour des vésicules de petit diamètre (20-25 nm) par rapport aux plus grandes dont le diamètre avoisine 125 nm (Davidson W.S. *et al.*, 1998).

I.2.3.4. Effets des mutations A30P et A53T

D'un point de vue structurel, la mutation A30P désorganiserait la région correspondante en hélice et limiterait la conversion en β par la présence de la proline. Par contre, la mutation A53T pourrait faciliter la transition en brins β . Ces deux mutations augmentent le taux d'oligomérisation de l' α -synucléine. Cependant, l'A53T augmente la vitesse de formation des fibrilles alors que l'A30P la diminue. Toutefois, la morphologie des fibrilles des protéines mutées et non-mutées est similaire (Bussel R. *et al.*, 2001).

L'hypothèse selon laquelle une accélération de la formation des fibrilles conduit à une forme plus précoce de la maladie n'est pas vérifiée puisque les fibrilles de l'A30P prennent plus de temps pour se former. L'agent toxique doit donc se trouver dans un état oligomérique et non sous forme de fibrilles. Les données cinétiques *in vitro* indiquent qu'il existe probablement plusieurs intermédiaires conformationnels, aussi bien monomériques qu'oligomériques. Les deux mutations modifieraient la transition entre ces différents intermédiaires et pourraient donc favoriser la formation d'un intermédiaire toxique sans accélérer la formation de fibrilles (Bussel R. *et al.*, 2001).

I.2.3.5. Particularités de l' α -synucléine et mise en évidence d'un peptide amyloïdogénique

L' α -synucléine est unique parmi la famille des synucléines car sa seconde hélice est plus longue que celle de la β -synucléine et elle a un domaine hydrophobe plus important que celui de la γ -synucléine ou de la synoretine. Ces différences pourraient expliquer pourquoi l' α -synucléine a une propension plus grande à former des agrégats (Chandra S. *et al.*, 2003).

Il a été montré qu'un motif de douze acides aminés (71-82) du domaine hydrophobe de l' α -synucléine est nécessaire et suffisant pour sa fibrillation. La β -synucléine qui est très homologue à l' α -synucléine, ne possède pas ce motif et ne forme pas de fibrilles. Deuxièmement, l'introduction d'un résidu chargé dans ce motif diminue le taux de polymérisation et une délétion empêche la formation de polymères. Enfin, ce polypeptide peut polymériser seul et accentue la fibrillation de l' α -synucléine (Giasson BI. *et al.*, 2001).

D'autres auteurs rapportent que le fragment 68-78 est le plus petit fragment possédant les propriétés d'agrégation et de toxicité. Il est à noter que les résidus 61-78 présentent une similarité de séquence avec des régions cruciales pour l'agrégation et la toxicité d'autres protéines amyloïdogéniques telles que la protéine prion, le peptide β amyloïde et l'IPP (Islet Amyloïde Polypeptide) comme montré en figure I.12. (El-Agnaf O.M.A. *et al.*, 2002).



Figure I.12. : Comparaison des séquences du NAC, du peptide A β , de la protéine PrP et de l'IAPP. La séquence GAVV du NAC et les séquences GAXX des régions amyloïdogéniques des trois autres protéines sont grisées. Cet alignement montre un certain nombre d'identité de séquence entre ces quatre peptides pris par paire (résidus soulignés) (El-Agnaf O.M.A. *et al.*, 1998).

I.3. *Les peptides obliques*

Les peptides obliques sont de courts fragments de protéines de 11 à 18 résidus que l'on qualifie d'obliques car ils adoptent une orientation oblique lorsqu'ils interagissent avec une interface hydrophile/hydrophobe. Quand ils sont sous forme d'hélice α , les peptides obliques possèdent un gradient d'hydrophobicité le long de leur axe. C'est cette distribution particulière de l'hydrophobicité qui permet leur insertion oblique (Figure I.13.) (Brasseur R. *et al.*, 1990).

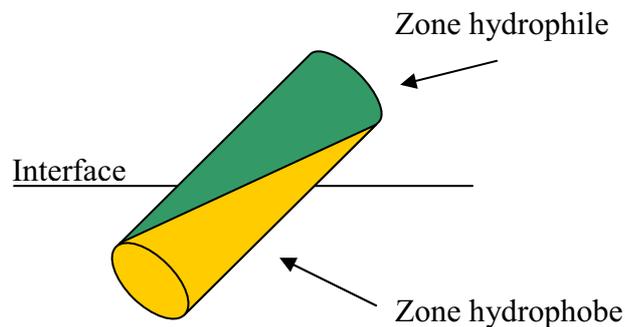


Figure I.13. : Représentation schématique d'un peptide oblique

I.3.1. **Propriétés des peptides obliques**

Les peptides obliques ont été découverts il y a plus de dix ans par modélisation moléculaire. Le premier peptide oblique a été mis en évidence dans la séquence de la protéine d'enveloppe du virus NDV (Newcastle Disease Virus) (Brasseur R. *et al.*, 1988). Celui-ci correspondait à la séquence 104-121 de cette protéine. Depuis, de nombreux peptides obliques ont pu être détectés mais ce n'est qu'en 2000 que des études utilisant la diffraction de neutrons ont confirmé l'existence de ces peptides dans les bicouches lipidiques (Bradshaw J.P. *et al.*, 2000).

Les peptides obliques, outre leur gradient d'hydrophobicité, possèdent d'autres propriétés. Ces peptides s'insèrent dans les membranes avec un angle généralement compris entre 30 et 60°. Cette propriété n'avait pas été envisagée avant leur découverte, les peptides interagissant avec la membrane étant soit amphipathiques, soit transmembranaires. Dans le premier cas, les peptides sont orientés parallèlement à la bicouche, dans le second, ils s'insèrent perpendiculairement au plan de la bicouche (Brasseur R. *et al.*, 1997). Les peptides

obliques possèdent une hydrophobicité moyenne (calculée selon l'échelle d'hydrophobicité consensus d'eisenberg) comprise entre 0,2 et 0,9. Des études en spectroscopie infrarouge et en dichroïsme circulaire suggèrent que les peptides obliques adoptent plutôt une conformation β en solution et une conformation α lors de leur interaction avec les lipides (Martin I. *et al.*, 1994).

I.3.2. Importance biologique des peptides obliques

Les peptides obliques semblent être impliqués dans divers processus biologiques. Il a notamment été montré que les peptides obliques des protéines virales sont impliqués dans la fusion de la membrane du virus et de celle de la cellule hôte. En plus du peptide oblique découvert dans la protéine de fusion du NDV, il en existe également dans la protéine de fusion du SIV (Simian Immunodeficiency Virus ; Horth M. *et al.*, 1991), du BLV (Bovine Leukemia Virus ; Vonèche V. *et al.*, 1992), du HIV (Brasseur R., 1991), d'Ebola (Peuvot J., 1999), ...

Des peptides obliques ont également été mis en évidence dans des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides (Peelman F. *et al.*, 1997 ; Pérez-Méndez O. *et al.*, 1998 ; Lins L. *et al.*, 2000), dans des séquences signal (Talmud P. *et al.*, 1996), dans des protéines membranaires (Rahman M. *et al.*, 1997) et dans des protéines neurotoxiques (Pillot T. *et al.*, 1996 ; Pillot T. *et al.*, 1997). Un peptide oblique pourrait également intervenir dans la fécondation puisque la fertiline, protéine impliquée dans la fusion du spermatozoïde avec l'ovule, en possède un (Schanck A. *et al.*, 1998). Les peptides obliques semblent donc impliqués dans les mécanismes associés à la naissance, la vie ou la mort cellulaire (Peuvot J. *et al.* 1999).

Le mécanisme par lequel les peptides obliques peuvent déstabiliser les membranes serait le suivant :

1. Le peptide oblique s'insère obliquement dans les lipides
2. Cette insertion oblique perturbe le parallélisme des chaînes acylées
3. Cette déstabilisation de la bicouche va favoriser la formation des micelles inverses

I.3.3. Les peptides obliques et les protéines amyloïdogéniques

Récemment, des peptides obliques ont été mis en évidence dans deux protéines causant des maladies neurodégénératives. Ces protéines sont le peptide β amyloïde dont le fragment 29-42 (ou 29-40) a été déterminé comme oblique et la protéine PrP dont le peptide oblique correspond au fragment 118-135 (Pillot T. *et al.*, 1996 ; Pillot T. *et al.*, 1997). Expérimentalement, les deux fragments sont capables d'induire de la fusion de liposomes et se retrouvent dans le domaine de $A\beta$ et de PrP impliqué dans la transconformation et la pathogénicité de ces deux protéines. Ces peptides obliques pourraient affecter directement la membrane cellulaire des neurones grâce à leur propriété fusogène et conduire à la mort cellulaire (Figure I.14.).

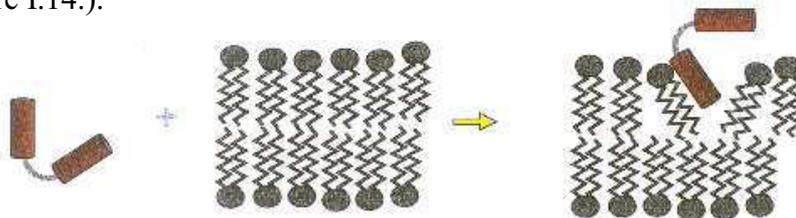


Figure I.14. : Interaction entre un peptide oblique (cylindre rouge) et la bicouche lipidique.

D'autre part, les peptides obliques pourraient aussi être impliqués dans le processus de transconformation de ces protéines. Deux hypothèses ont alors été émises (Figure I.15.). Le peptide oblique pourrait soit s'insérer à l'interface d'une protéine, c'est-à-dire entre le cœur hydrophobe d'une protéine et son enveloppe plus hydrophile, et déstabiliser sa conformation native, entraînant l'apparition de structures β . Dans la seconde hypothèse, un peptide oblique pourrait, suite à des modifications de son environnement, passer d'une conformation α (ou random-coil) à une conformation β . Cette transconformation entraînerait le changement de conformation de toute la protéine. Dans les deux cas de figure, le peptide oblique devrait se trouver dans le domaine de la protéine changeant de conformation.

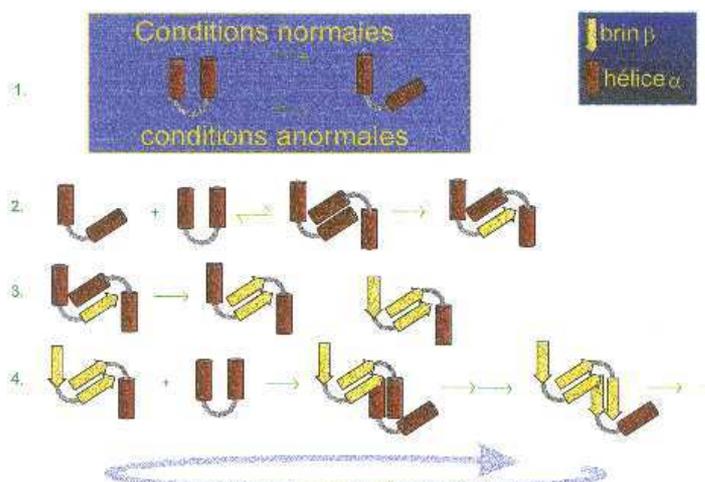


Figure I.15. : Schéma représentant la première des deux hypothèses émises au sujet des peptides obliques

II. But du travail

Malgré les nombreuses études réalisées sur le sujet, le phénomène de transconformation des protéines amyloïdogéniques reste peu clair. Cependant, une nouvelle perception de ce phénomène est apparue lorsqu'un motif structural particulier a été mis en évidence dans le domaine subissant une transition structurale de plusieurs protéines amyloïdogéniques. Il s'agit des peptides obliques. Ces peptides possèdent des propriétés déstabilisantes vis-à-vis d'interfaces hydrophobe/hydrophile. Ils ont pu être détectés dans la protéine PrP (fragment 118-135), le peptide β amyloïde (fragment 29-42) et les prions bactériens Ure2p (181-194) et Sup35p (256-269).

La présence de peptides obliques dans la protéine PrP et le peptide A β suggère que ceux-ci pourraient jouer un rôle dans la toxicité associée à ces protéines en affectant directement la membrane cellulaire des neurones grâce à leur propriété déstabilisatrice vis-à-vis des lipides. D'autre part, la découverte de ces structures chez plusieurs protéines amyloïdogéniques a conduit le groupe du Professeur Brasseur à proposer que les peptides obliques pourraient être impliqués dans le processus de transconformation de ces protéines. Deux hypothèses ont été émises. Le peptide oblique pourrait soit s'insérer à l'interface d'une protéine, c'est-à-dire entre le cœur hydrophobe d'une protéine et son enveloppe plus hydrophile, et déstabiliser sa conformation native entraînant la modification structurale de toute la protéine. Dans la seconde hypothèse, un peptide oblique pourrait, suite à des modifications de son environnement, passer d'une conformation α (ou random-coil) à une conformation β . Cette transition entraînerait le changement de conformation de toute la protéine. Dans les deux cas de figure, le peptide oblique devrait se trouver dans le domaine de la protéine changeant de conformation.

L'objet de ce travail est de mettre en évidence, par modélisation moléculaire, la présence de peptides obliques dans la séquence d'autres protéines amyloïdogéniques connues. Un de ces peptides sera synthétisé et testé quant à ses propriétés déstabilisatrices vis-à-vis de liposomes. Ce travail est une première approche dans la généralisation de la présence de fragments obliques dans des protéines subissant des changements structuraux $\alpha \rightarrow \beta$. La présence de peptides obliques dans ces protéines permettrait de supporter l'hypothèse selon laquelle ces derniers jouent un rôle dans le phénomène de transconformation des protéines amyloïdogéniques.

III. Matériel et méthodes

III.1 *Matériel*

III.1.1. Modélisation moléculaire

Les calculs de modélisation moléculaire ont été effectués sur un ordinateur biprocesseur Pentium II muni du système d'exploitation Windows NT. Les programmes suivants ont été utilisés : Zprot, SwingHCA (Hydrophobic Cluster Analysis) et ZTammo (Theoretical Analysis of Molecular Membrane Organization) développé au CBMN ; HyperChem 5.0 (Hypercube inc.) a été utilisé pour la construction et la minimisation des peptides, WinMGM (Windows Molecular Graphics Manipulation, Rahman M. *et al.*, 1994) pour la visualisation des peptides et des potentiels d'hydrophobicité moléculaire (MHP) et SigmaPlot 2000 (SPSS inc.) pour la manipulation des données.

Les séquences des protéines amyloïdogéniques sont issues de la banque de données SWISSPROT disponible sur internet: <http://srs.embl-heidelberg.de:8000/srs5bin/cgi-bin/wgetz>. Les prédictions de structure secondaire ont été réalisées à partir du site internet : http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_seccons.html.

III.1.2. Partie expérimentale

➤ Les solvants :

Le Trifluoroéthanol (TFE ; Sigma, St Louis, MO, USA)

Le Diméthylsulfoxyde (DMSO ; Sigma, St Louis, MO, USA)

L'Hexafluoropropanol (HFP ; Sigma, St Louis, MO, USA)

Chloroforme/méthanol (2/1 en volume/volume)

➤ Les marqueurs fluorescents :

L'octadecylrhodamine chloride B (R18 ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

L'acide 8-hydroxypyrrène-1,3,6-trisulfonique (HPTS ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

Le p-xylylènebis[pyridinium] bromide (DPX ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

➤ Les phospholipides :

Egg PhosphatidylCholine (PC ; Sigma, St Louis, MO, USA)

Egg PhosphatidylEthanolamine (PE ; Lipid Product, redhill, Surrey, UK)

Egg PhosphatidylInositol (PI ; Lipid Product, redhill, Surrey, UK)

Egg PhosphatidylSerine (PS ; Sigma, St Louis, MO, USA)

Sphingomyelin (SM ; Sigma, St Louis, MO, USA)

Cholesterol (CHOL ; Sigma, St Louis, MO, USA)

➤ Les tampons :

Tampon Tris pH 7,4 : Tris-HCl 10mM (Sigma, St Louis, MO, USA)

NaCl 150mM (Merck Eurolab, Leuven, Belgium)

EDTA 0,01% (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)

NaN₃ 1mM (Sigma, St Louis, MO, USA)

Tampon TBS pH 7,4 : Tris-HCl 10mM (Sigma, St Louis, MO, USA)

NaCl 150mM (Merck Eurolab, Leuven, Belgium)

Le peptide de l' α -synucléine (GGAVVTGVTAVA) a été synthétisé par V. Stroobant (Gludwig Institute, UCL, Belgique).

III.2. Méthodes

III.2.1. Approche de modélisation moléculaire

III.2.1.1. Analyse de la séquence

a) La méthode HCA (Hydrophobic Cluster Analysis)

Le graphique HCA représente, en deux dimensions, la séquence protéique en conformation hélice α (Gaboriaud C. *et al.*, 1987). Ces graphiques sont construits en enroulant la séquence protéique autour d'un cylindre (a) puis en coupant celui-ci parallèlement à son axe et en le déroulant dans un plan (b). Cette dernière opération sépare des acides aminés voisins, le graphique est donc dupliqué pour restaurer l'environnement de chaque acide aminé (c) (Figure III.1.).

Les acides aminés hydrophobes (M,I,L,V,F,Y,W), qui sont colorés et entourés, forment des amas (d) dont la taille, la forme et la composition peuvent être analysées. Ces amas peuvent être mis en relation avec des structures secondaires données : des amas verticaux correspondent le plus souvent à des brins β alors que des amas horizontaux correspondent plutôt à des hélices α . Les peptides obliques sont le plus souvent représentés par des amas de forme triangulaire (Figure III.2.).

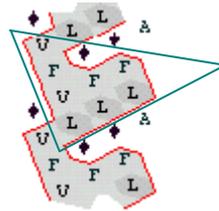


Figure III.2. : Profil HCA du peptide oblique du SIV (♦ : glycine)

b) La méthode de Jähnig

Cette méthode permet de détecter des hélices α ou des brins β potentiellement amphipathiques (Jähnig F., 1990), c'est-à-dire des structures dans lesquelles il existe une ségrégation entre le domaine hydrophobe d'un côté et le domaine hydrophile de l'autre. L'algorithme développé par Jähnig pour les hélices α calcule la moyenne pondérée de l'hydrophobicité $H\alpha$ (en Kcal/mol) des résidus contenus dans une fenêtre de 17 résidus et attribue cette valeur au résidu central de la fenêtre. Celle-ci est déplacée le long de la séquence de la protéine étudiée. La formule de cette moyenne pondérée est la suivante :

$$\langle H\alpha(i) \rangle = [h(i\pm 8) + h(i\pm 7) + \frac{1}{4}h(i\pm 5) + h(i\pm 4) + \frac{3}{4}h(i\pm 3) + \frac{1}{2}h(i\pm 1) + h(i)] / 10$$

Cette moyenne donne plus d'importance aux acides aminés proches en terme de structure secondaire qu'en terme de séquence. L'analyse des graphiques obtenus par la méthode de Jähnig permet de détecter des fragments de protéines présentant un caractère amphipathique. Une hélice α amphipathique prendra la forme d'une oscillation régulière et un peptide oblique, celle d'une oscillation ascendante ou descendante (Figure III.3.).

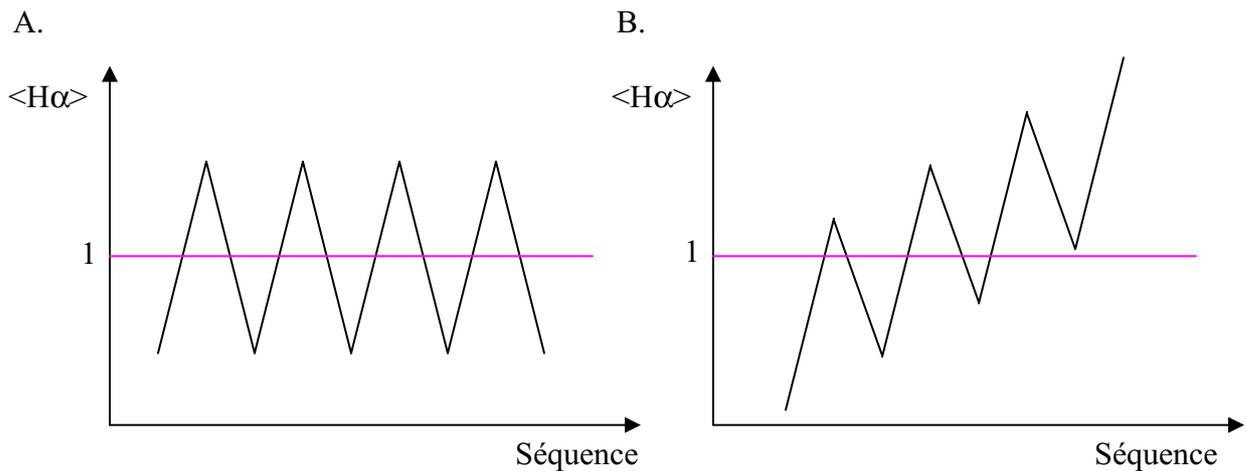


Figure III.3. : Graphiques $H\alpha$ de Jähnig sur lesquels figure une représentation schématique des oscillations correspondants à une hélice amphipathique (A) et à un peptide oblique (B).

c) Les prédictions de structures secondaires

Les peptides obliques possèdent un gradient d'hydrophobicité uniquement lorsqu'ils sont en conformation hélice α . Des méthodes de prédiction de structure secondaire devront donc être utilisées quand la structure 3D de la protéine ne sera pas connue. Les méthodes utilisées sont disponibles à partir du site internet NPS@ : http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_secons.html.

NPS@ (Network Protein Sequence Analysis) utilise les méthodes DPM (Deleage G. *et al.*, 1987), HNN (Guermeur Y., 1997), GOR IV (Garnier J. *et al.*, 1996), PHD (Rost B. *et al.*, 1994), Predator (Frishman D. *et al.*, 1996), SIMPA96 (Levin J.M. *et al.*, 1996), SOPM (Geourjon C. *et al.*, 1994) et réalise, en plus, une prédiction de structure secondaire consensus à partir des résultats fournis par ces méthodes.

d) Détermination de l'hydrophobicité moyenne $\langle H \rangle$

L'hydrophobicité moyenne se calcule en attribuant à chaque acide aminé de la séquence la valeur de son hydrophobicité selon l'échelle consensus d'Eisenberg (Table III.1.) puis en calculant la moyenne arithmétique de ces valeurs. L'hydrophobicité moyenne d'un peptide permet de déterminer s'il peut appartenir à la classe des peptides obliques car ceux-ci possèdent généralement une hydrophobicité moyenne comprise entre 0,2 et 0,9.

III.2.1.2. Construction et minimisation des peptides

La construction des structures 3D des peptides obliques potentiels en hélice α est indispensable pour analyser leurs propriétés d'hydrophobicité et leur comportement aux interfaces. Ces peptides sont construits en hélice α droite à l'aide du logiciel Hyperchem en attribuant aux angles φ et ψ les valeurs correspondant aux hélices α classiques. La structure obtenue est soumise à une minimisation d'énergie en utilisant la méthode du gradient conjugué Polak-Ribbiere (Polak E., 1971).

III.2.1.3. Calcul des potentiels d'hydrophobicité moléculaires

L'environnement hydrophatique d'une molécule peut être visualisé en 3D par le calcul des Potentiels d'Hydrophobicité Moléculaire (MHP) (Brasseur, 1991). La formule du MHP est la suivante:

$$\text{MHP}_M = \sum_{i=1}^N E_{\text{tri}} \exp(r_i - d_i)$$

E_{tri} = Energie de transfert de l'atome i

r_i = Rayon de l'atome i

d_i = Distance entre l'atome i et le point de l'espace considéré

Les énergies de transfert atomique sont calculées à partir des énergies de transfert moléculaires se trouvant dans la littérature (Tanford C., 1973) en supposant que l'énergie de transfert d'une molécule correspond à la somme des énergies de transfert des atomes qui la composent. La répartition de l'hydrophobicité d'une protéine va pouvoir être visualisée en dessinant la surface des isopotentiels hydrophobes et hydrophiles. La répartition asymétrique de l'hydrophobicité des peptides obliques pourra être visualisée par cette méthode.

III.2.1.4. Méthode IMPALA

La méthode IMPALA (Integral Membrane Protein And Lipid Association) permet d'étudier l'interaction entre une molécule (dans notre cas, un peptide) et une membrane modélisée (Ducarme P. *et al.*, 1998). Une minimisation par la méthode de Monte-Carlo va faire varier la position de la molécule au sein de la bicouche et fournir un profil énergétique de cette position en fonction de la pénétration du centre de masse du peptide dans la bicouche

et de l'angle formé entre un axe préalablement défini du peptide et la normale de la bicouche modélisée. La molécule peut subir une translation selon l'axe Z et une rotation selon les axes X et Y.

a) Représentation de la bicouche phospholipidique

La bicouche lipidique (Figure III.4.) est modélisée par une fonction mathématique continue $C(z)$ dont la formule est la suivante :

$$C_{(z)} = 1 - \left(\frac{1}{1 + e^{\alpha(z-z_0)}} \right)$$

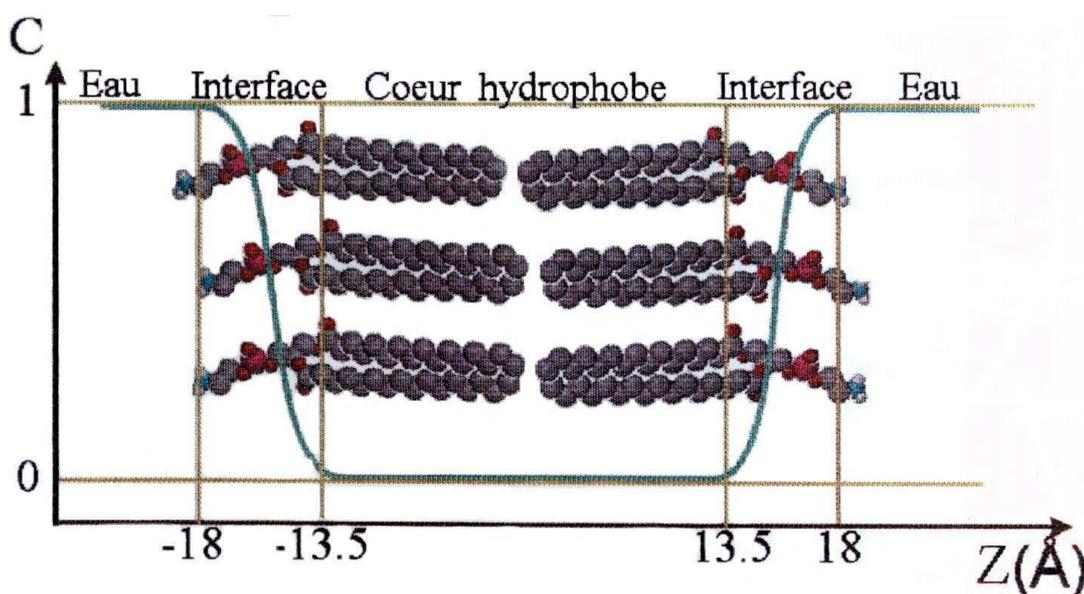


Figure III.4. : Schéma de la bicouche modélisée utilisée dans IMPALA. La fonction $C(z)$ est représentée en bleu, les traits jaunes horizontaux correspondent aux limites inférieure et supérieure de la fonction $C(z)$ et les traits jaunes verticaux, aux trois zones différenciées dans le modèle (c'est-à-dire l'eau, l'interface (où se situent les têtes polaires des phospholipides) et le cœur hydrophobe (correspondant aux chaînes acylées). Les molécules de phospholipides sont représentées à titre indicatif.

L'axe Z est perpendiculaire à la membrane et la fonction $C_{(z)}$ est constante dans le plan XY. α et Z_0 sont des paramètres fixés à des valeurs telles que $C_{(18\text{Å})} = 1$, $C_{(13,5\text{Å})} = 0$ et que dans les domaines allant de $-\infty$ à -18 Å , de $-13,5 \text{ Å}$ à $13,5 \text{ Å}$ et de 18 Å à $+\infty$ la fonction $C_{(z)}$ soit constante. Les domaines allant de -18 Å à $-13,5 \text{ Å}$ et de $13,5 \text{ Å}$ à 18 Å correspondent aux

têtes polaires des phospholipides. Dans ces deux domaines de 4,5 Å d'épaisseur, la fonction $C_{(z)}$ varie de façon continue (Figure III.4.).

Pour simuler l'interaction entre un peptide et la bicouche lipidique, deux contraintes ont été mises au point. Le premier terme simule l'effet hydrophobe qui pousse les domaines hydrophobes de la molécule à entrer dans la membrane : c'est la contrainte hydrophobe. Le deuxième terme est une mesure de la perturbation subie par les lipides lorsque le peptide pénètre dans la bicouche : c'est la contrainte de perturbation lipidique (Ducarme P. *et al.*, 1998). La somme de ces deux contraintes (E_{TOT}) est minimisée au cours de la simulation.

b) Contrainte hydrophobe

Pour simuler l'effet hydrophobe, on utilise la formule de la contrainte E_{int} :

$$E_{int} = - \sum_{i=1}^N S_{(i)} E_{tr(i)} C_{(z_i)}$$

$S_{(i)}$ = Surface accessible de l'atome i

$E_{tr(i)}$ = Energie de transfert par unité de surface de l'atome i

$C_{(z_i)}$ = Valeur de la fonction décrivant l'interface

Z_i = Coordonnée de l'atome i par rapport à l'axe Z

L'énergie E_{int} diminue lorsque les atomes hydrophobes accessibles au solvant pénètrent dans la membrane et inversement pour les atomes hydrophiles.

c) Contrainte de perturbation lipidique

La contrainte de perturbation lipidique provient du fait que les interactions entre lipides sont plus favorables que les interactions lipides/peptides. La formule de cette contrainte est :

$$E_{lip} = \alpha_{lip} \sum_{i=1}^N S_{(i)} (1 - C_{(z_i)})$$

α_{lip} est un facteur empirique positif

Cette contrainte force les atomes accessibles à minimiser leur surface de contact avec la membrane soit en s'accolant à d'autres atomes soit en sortant de la membrane.

III.2.2. Méthodes expérimentales

III.2.2.1 Préparation des liposomes

Les liposomes sont des structures de forme sphérique constituées de phospholipides formant une ou plusieurs bicouches phospholipidiques concentriques organisées autour d'un compartiment aqueux. Les liposomes utilisés possèdent différentes compositions :

- 1) 26,6% PC, 26,6% PE, 26,6% SM, 20,2% CHOL (w/w) (Liposomes non chargés)
- 2) 30% PC, 30% PE, 2,5% PI, 10% PS, 5% SM, 22,5% CHOL (w/w) (Liposomes chargés)

a) Les liposomes multilamellaires (MLV)

Pour réaliser des MLV, un film lipidique doit être formé. Les phospholipides, de composition voulue, sont dissous dans une solution de chloroforme /méthanol 2/1 (vol/vol). Le ballon est placé au rotavapor (rotavapor ; Van Der Heyden Büchi, Switzerland) pour le soumettre à une évaporation sous vide. Le film est ensuite disposé dans un dessiccateur pendant 24 heures. Pour former les liposomes multilamellaires, le film lipidique est réhydraté avec du tampon et est incubé une heure dans un bain-marie à 37°C avec agitation au vortex toutes les dix minutes.

b) Les liposomes unilamellaires de grande taille (LUV)

Les LUV sont préparés à partir des MLV. Ces derniers sont soumis à 5 cycles de congélation/décongélation. Ensuite, la solution subit 10 passages successifs dans un extrudeur (extruder Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada). Lors de ces passages, sous l'impulsion d'une pression d'azote de 20 bars, la solution doit traverser deux filtres de polycarbonates (Polycarbonates filters Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada) superposés, dont les pores présentent un diamètre de 100 nm.

c) Les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV)

Les SUV sont préparés à partir des MLV et présentent un diamètre inférieur à 100 nm. Les MLV sont soumis à 5 cycles de sonication de 2 minutes (puissance de 0,5 Watts) (High intensity Ultrasonic Processor, Sigma Chemical Co. St Louis, Missouri, USA). L'échantillon est refroidi dans un bain d'eau et de glace pour éviter que la température de l'échantillon ne s'élève lors de la sonication. Ensuite, une centrifugation de 10 minutes à 2000 g permet d'éliminer les fragments de titane provenant de la sonde (Biofuge Pico, Van Der Heyden, Heraeus, Allemagne).

III.2.2.2. Détermination de la concentration en phospholipides

Le dosage des phospholipides est effectué par la méthode de Bartlett (Bartlett G.R., 1959). Cette méthode comporte plusieurs étapes dont la première consiste à sécher l'échantillon. Ensuite, les phospholipides sont minéralisés à 200°C pendant 45 minutes par ajout d'acide perchlorique. Lors de cette étape, le phosphore organique est transformé en phosphate minéral. Ce dernier va pouvoir être dosé par ajout de molybdate d'ammonium, générant de l'acide phosphomolybdique, et de l'acide aminonaphtylsulfonique (AANS). La réaction de ces deux composés va générer un composé coloré dont l'absorbance est mesurée à 830 nm par spectrophotométrie (Spectrophotomètre lambda 40 UV/Vis Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). La concentration de l'échantillon est déterminée en comparant son absorbance à celle d'un échantillon témoin de phosphate étalon.

III.2.2.3. Mesures de fusion de phase lipidique

Pour mesurer le phénomène de fusion, un fluorophore lipophile, le chlorure d'octadécylrhodamine (R18), est utilisé. Ce marqueur est capable de s'insérer parmi les phospholipides et lorsqu'il se retrouve à une concentration suffisamment élevée dans les membranes, sa fluorescence est masquée. Donc, tout processus conduisant à une diminution de sa densité de surface va s'accompagner d'une augmentation de fluorescence.

Un mélange de liposomes marqués et non marqués est mis en présence du peptide. Si ce dernier est fusogène, la fluorescence augmente car la fusion des liposomes diminue la densité de surface du fluorophore (Figure III.5.).

25 μ l de peptide (concentration allant de 60 μ M à 1200 μ M) et 300 μ l de liposomes marqués (50 μ M) sont ajoutés à 1200 μ l de liposomes non-marqués de même concentration (le rapport liposomes marqués/non marqués (w/w) est de 1/4). Un échantillon contenant uniquement le peptide et les liposomes marqués est également mesuré. Cette mesure permet d'éliminer l'augmentation de fluorescence qui n'est pas associée au phénomène de fusion. La contribution du solvant dans lequel est dissous le peptide (HFP/TFE, TFE, DMSO) est également mesurée. Pour ce faire, le peptide est remplacé par le solvant considéré.

La fluorescence est mesurée par un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS-50B (Norwalk, CT, USA) et les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont respectivement de 560 nm et de 590 nm.

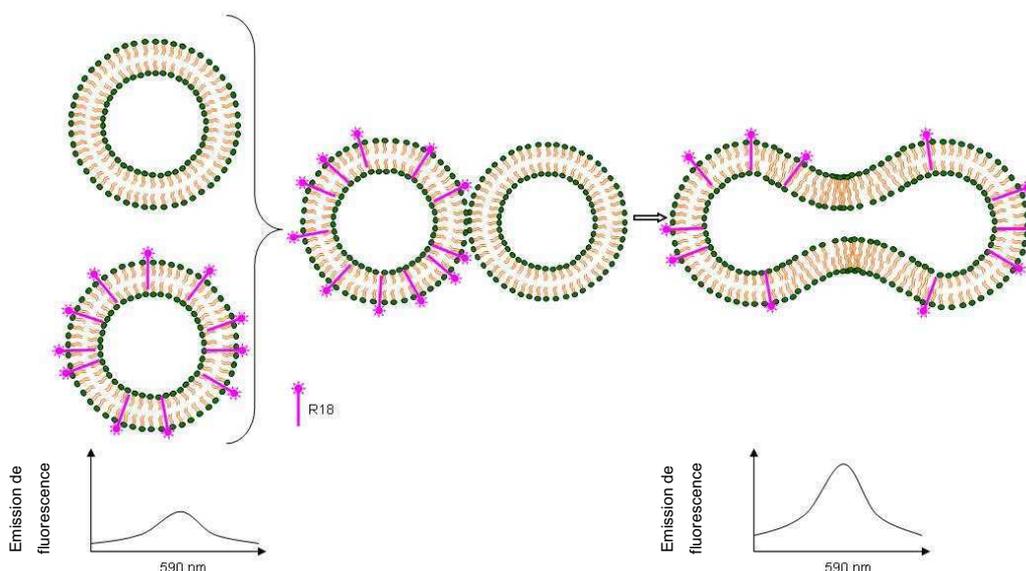


Figure III.5. : Schéma explicatif de la fusion de phase lipidique

III.2.2.4. Mesures de spectroscopie infra-rouge FTIR

La technique de spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier en Réflexion Totale Atténuée (ATR-FTIR) est utilisée pour déterminer la structure secondaire d'un peptide (ou d'une protéine) en solution ou en présence de phospholipides. Cette technique permet également de déterminer l'orientation relative d'un peptide (ou d'une protéine) par rapport à des phospholipides orientés sur un support solide (dans notre cas, une plaque de Germanium). Un rayonnement infrarouge est envoyé avec un angle d'incidence de 45° sur une plaque de germanium sur laquelle est étalé l'échantillon. Lors de chaque réflexion à la surface de la

plaque, une partie du rayonnement est absorbé par les molécules étalées. Le spectre infrarouge enregistré couvre un domaine de fréquences allant de 1800 à 900cm^{-1} . Ce domaine englobe les fréquences où le groupe amide primaire des protéines et le groupe ester des phospholipides absorbent.

a) Préparation de la plaque

Environ $50\mu\text{l}$ de l'échantillon à analyser, généralement à $600\mu\text{M}$, est étalé sur une plaque de germanium (Figure III.6.). Ensuite, le solvant est lentement évaporé sous flux d'azote puis l'échantillon est soumis à un échange hydrogène/deutérium par passage d'un flux d'azote saturé en D_2O durant trois heures à température ambiante.

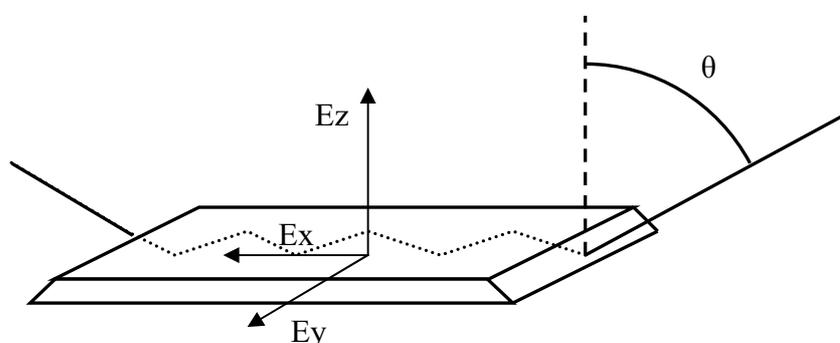


Figure III.6. : Schéma de la plaque de germanium traversée par un rayon infrarouge

b) Détermination de la structure secondaire du peptide

Le groupe amide primaire des protéines absorbe dans une région du spectre allant de 1610 à 1690cm^{-1} . Cette région du spectre est sensible à la structure secondaire adoptée par la protéine (Byler D.M. *et al.*, 1986). Elle est donc déconvoluée par transformée de Fourier pour augmenter la résolution au niveau de cette région et permettre la caractérisation de la protéine au point de vue de sa conformation (Cabiaux V. *et al.*, 1989).

Les différentes structures secondaires absorbent dans les régions suivantes (Goormaghtigh E. *et al.*, 1990) :

Feuillet β	1689 à 1682 et 1637,5 à 1627,5 cm^{-1}
Tournant β	1682 à 1662 cm^{-1}
Hélice α	1662 à 1645 cm^{-1}
Random-coil	1644,5 à 1637,5 cm^{-1}
Feuillet β basse fréquence	1627 à 1615 cm^{-1}

Pour obtenir le pourcentage de chacune de ces structures dans le peptide analysé, le rapport entre l'aire de chaque zone et l'aire caractéristique de l'amide primaire est calculé.

IV. Résultats

IV.1. Recherche de protéines amyloïdogéniques

La première étape de l'étude a consisté en la recherche des protéines capables de former des fibrilles amyloïdes. Bien que les deux plus connues soient le peptide β -amyloïde et la protéine PrP, il en existe beaucoup d'autres dont certaines sont citées dans l'introduction (Table I.1). Ces protéines ont été trouvées par l'intermédiaire d'une recherche bibliographique et d'une recherche dans la banque de donnée SWISSPROT.

Ces informations ont permis de construire le tableau ci-dessous (Table IV.1.).

Séquence	Peptide signal	Constituant des fibrilles		Code dans SWISSPROT
		Fragment	Mutant	
1-753	17 aa	672-711 672-713		P05067
1-231	22 aa		OK sans + de 10	P04156
1-140	non	65-95	OK sans A30P A53T	P37840
1-81	24 aa	1-30 et 61-81 (chaîne B et A)		P01317
1-153		Sans Hème (Apomyoglobine)	OK sans W7FW14F	P02144
1-847	19 aa	499-547 499-547 500-580 500-580	522 (FSM) 524 (FSM) E526V R554L	P02671
1-120	26 aa	11-120	L68Q	P01034
1-67	22 aa	12-48		P10997
1-199	28 aa	1-34		P01236
1-104	18 aa	1-76		P02735
1-266	non	244-277 244-277	+267-277 +266-277 Δ S266	Q9Y287

1-61	21 aa	24-61		P04002
1-724	non	1-79 (SH3)		P23727
1-67	non	1-22		P32081
Chaîne LEN de 114 aa				P01625
1-99	20 aa	58-99		P01884
1-3144	non	Polyglutamine		P42858
1-816	non	Polyglutamine		P54253
1-127	20 aa		OK sans + de 70	P02766
1-243	18 aa	1-94 1-83	OK sans plusieurs	P02647
1-757	non	hyperphosphorylée		P10636
1-128	25 aa	99-126		P01160
1-116	25 aa	60-91		P01258
1-755	27 aa	173-243 173-225	D187N, D187Y D187N, D187Y	P06396
1-364	23 aa	245-494 (Medin)		Q08431
1-130	18 aa		I56T, D67H, W64R	P00695
1-98	non			P14621
1-384	33 aa	228-282	plusieurs	P06654
1-354	non			P23202
1-685	non			P05453
1-692	19 aa			P02788

Table IV.1. : Table relative aux protéines amyloïdogéniques et à leurs caractéristiques. On y retrouve, dans l'ordre, le nom de la protéine amyloïdogénique, la ou les principales maladies causées, le nombre de résidus, la taille du peptide signal s'il est présent, deux colonnes indiquant si le constituant des fibrilles correspond à un fragment de la protéine et si la formation des fibrilles est associée à une mutation, puis les codes correspondant à ces

protéines dans la banque SWISSPROT. Les acides aminés sont représentés par leur code une lettre (Voir annexe 1). FSM signifie “frame shift mutation”, c’est-à-dire que la lecture des nucléotides est décalée et fournit un nouveau jeu d’acides aminés. (+) correspond à une addition et Δ à une délétion d’acides aminés.

Ce tableau permet de constater que la transconformation subie par les protéines amyloïdogéniques n’entraîne pas systématiquement une pathogénicité. Par exemple, pour les prions bactériens, la fibrillation a lieu *in vivo* et n’induit pas la mort cellulaire.

Toutes ces protéines n’ont pas été étudiées au cours de ce travail, notamment car plusieurs d’entre elles ont déjà fait l’objet d’une étude de modélisation moléculaire portant sur la recherche de peptides obliques. Il s’agit du peptide β amyloïde (Pillot T. *et al.*, 1996), de la protéine PrP (Pillot *et al.*, 1997) et des prions bactériens Sup35p et Ure2p (Nickmans A., 1999). Pour les quatre dernières protéines de la liste, les informations récoltées n’étaient pas suffisantes. De cet ensemble de 35 protéines, 27 seront donc analysées.

IV.2. Recherche de peptides obliques

IV.2.1. Stratégie de recherche

La recherche de peptides obliques au sein d’un grand nombre de protéines nécessite une méthodologie adéquate.

Dans une première approche, seules les protéines subissant une transconformation de type hélice α (ou random-coil) \Leftrightarrow conformation β seront considérées. Cette limitation est à mettre en relation avec les hypothèses émises quant au rôle potentiel d’un peptide oblique dans la transconformation. Comme décrit dans l’introduction, un peptide oblique pourrait intervenir dans les processus de transconformation soit par sa labilité structurelle propre, soit par sa capacité à déstabiliser l’interface cœur hydrophobe/surface hydrophile d’une protéine. Dans les deux cas, sa conformation passe d’une structure hélicoïdale vers une conformation β et se trouve dans le domaine de conversion structurelle.

Ensuite, une deuxième sélection va avoir lieu sur base des amas hydrophobes détectés par la méthode HCA. Si une protéine ne possède pas d’amas pouvant correspondre à un peptide oblique, elle sera éliminée.

Après cette étape, la méthodologie rejoint celle décrite dans la littérature (Brasseur R., 2000). Les méthodes de Jähnig et HCA sont utilisées simultanément pour mettre en évidence des régions de la protéine pouvant contenir un peptide oblique. Puis, l'hydrophobicité moyenne de différents peptides est calculée. Les peptides possédant une hydrophobicité moyenne supérieure à 0,2 seront sélectionnés.

Ces peptides seront alors construits et minimisés dans Hyperchem. Finalement, la méthode IMPALA permet de déterminer si les peptides sélectionnés se comportent effectivement comme des peptides obliques. Le calcul des MHP est utilisé pour visualiser leur gradient d'hydrophobicité.

IV.2.2. Sélection sur base des données bibliographiques

Sur base des données fournies par la littérature, plusieurs protéines vont être éliminées à priori si leurs propriétés intrinsèques ne sont pas compatibles avec la présence de peptides obliques. Puisque les peptides obliques ne sont actifs que sous forme hélicoïdale, le premier critère utilisé est l'absence d'hélice α . Parmi les 27 protéines, trois protéines sont concernées. Il s'agit des chaînes légères et lourdes d'immunoglobuline et de la β 2-microglobuline.

Certaines fibrilles amyloïdes sont formées par de longues chaînes de polyglutamine. Cette séquence n'est pas compatible avec l'apparition d'un gradient d'hydrophobicité en conformation hélicoïdale car la glutamine possède une hydrophobicité trop faible (selon l'échelle consensus d'Eisenberg). Il n'existe donc pas de peptides obliques dans ces chaînes. L'huntingtine et l'ataxine 1 sont donc éliminées.

Le dernier critère concerne la protéine Tau. Celle-ci est éliminée car elle ne forme des fibrilles que lorsqu'elle est hyperphosphorylée. Sa propension à s'agréger provient donc de l'ajout d'un groupement chimique et non d'une propriété intrinsèque de l'un de ses domaines. Il reste à ce stade 21 protéines à analyser.

IV.2.3. Sélection sur base des graphiques HCA

La méthode HCA est une méthode qui se base sur la représentation en deux dimensions de la séquence protéique dans une conformation hélicoïdale (Gaboriaud C. *et al.*, 1987). Cette représentation permet de visualiser des amas hydrophobes de couleur grise dont la forme peut être mise en relation avec des structures secondaires données. Des amas hydrophobes de

Protéine	Localisation des zones intéressantes
α -synucléine	Résidus 47-56 : zone 1 Résidus 66-78 : zone 2 Résidus 84-95 : zone 3
Insuline	Résidus 11-20 de la chaîne B : zone 1
Myoglobine	Résidus 9-22 : zone 1 Résidus 28-37 : zone 2 Résidus 65-76 : zone 3 Résidus 99-107 : zone 4
Fibrinogène α (FSM 522)	Résidus 510-527 : zone 1
Cystatine C	Résidus 23-32 : zone 1 Résidus 56-66 : zone 2
Prolactine	Résidus 15-25 : zone 1 Résidus 22-34 : zone 2
Transthyretine	Résidus 11-20 : zone 1 Résidus 24-33 : zone 2 Résidus 105-114 : zone 3
Apolipoprotéine AI	Résidus 11-22 : zone 1
Phosphatidylinositol 3 kinase	Résidus 35-45 : zone 1 Résidus 69-78 : zone 2
Gelsoline	Résidus 189-200 : zone 1
Fish antifreeze protein	Résidus 24-61 : zone 1

Table IV.2.: Localisation des zones potentiellement intéressantes dans la recherche des peptides obliques obtenues par la méthode HCA

IV.2.4. Méthode de Jähnig

La méthode de Jähnig est utilisée pour détecter les peptides obliques au sein d'une séquence protéique. Cette méthode attribue à chaque acide aminé une hydrophobicité moyenne tenant compte des résidus proches en terme de structure secondaire. La présence d'une oscillation croissante ou décroissante de l'hydrophobicité moyenne est une indication de la présence potentielle d'un peptide oblique.

Vu le nombre de protéines étudiées, seul un graphique présentant une oscillation ascendante pouvant correspondre à un peptide oblique sera donné comme exemple (Figure IV.3.). Les résultats obtenus suite à l'étude des graphiques de Jähnig seront présentés dans le tableau IV.3.

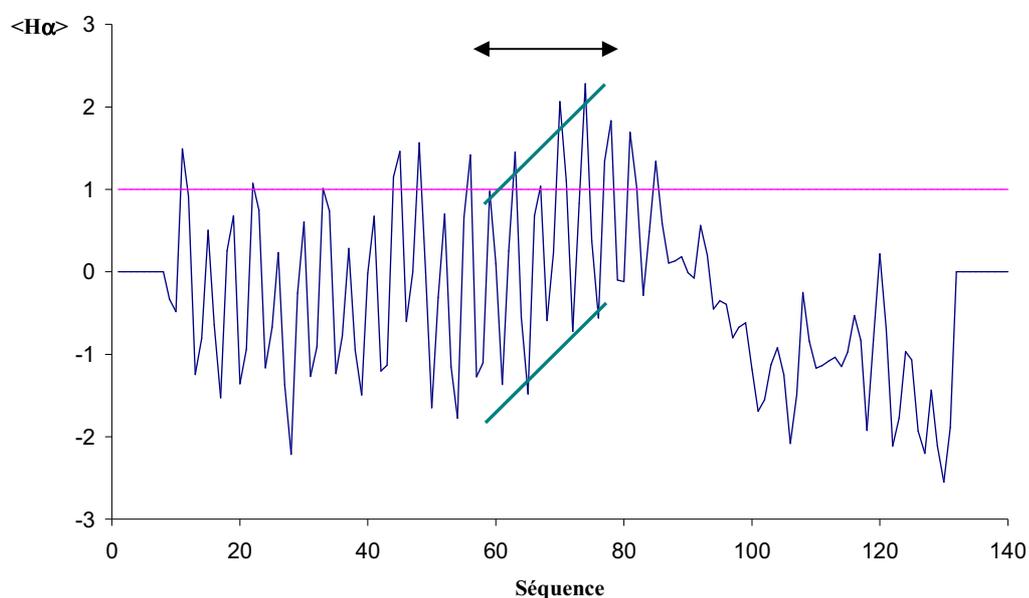


Figure IV.3. : Profil de Jähnig obtenu pour l'α-synucléine. La double flèche délimite l'oscillation ascendante.

Protéine	Localisation des zones intéressantes
α-synucléine	Résidus 60-80 : zone A
Insuline	Résidus 1-11 de la chaîne A : zone A Résidus 11-22 de la chaîne B : zone B
Myoglobine	Résidus 25-38 : zone A Résidus 68-82 : zone B Résidus 101-107 : zone C Résidus 107-121 : zone D
Fibrinogène α (FSM 522)	Résidus 510-521 : zone A Résidus 518-531 : zone B
Cystatine C	Résidus 47-56 : zone A Résidus 56-74 : zone B Résidus 90-105 : zone c
Prolactine	Aucune zone intéressante

Transthyretine	Résidus 25-42 : zone A
Apolipoprotéine AI	Résidus 33-46 : zone A
Phosphatidylinositol 3 kinase	Résidus 30-51 : zone A
Gelsoline	Résidus 183-199 : zone A
Fish antifreeze protein	Aucune zone intéressante

Table IV.3. : Localisation des zones potentiellement intéressantes dans la recherche des peptides obliques obtenues par la méthode de Jähnig.

La méthode de Jähnig et la méthode HCA ont permis de mettre en évidence différentes zones de la séquence des protéines amyloïdogéniques potentiellement obliques. Les résultats de ces deux méthodes vont maintenant être mis en commun pour identifier plus précisément les zones intéressantes.

IV.2.5. Structure secondaire et prédiction de structure secondaire

Les peptides obliques ne possèdent leurs propriétés déstabilisantes que lorsqu'ils se trouvent sous la forme d'une hélice α . Dans cette partie du travail, nous allons déterminer si les zones sélectionnées par les méthodes HCA et de Jähnig se trouvent en conformation hélice α dans les protéines amyloïdogéniques. Si la structure tridimensionnelle a déjà été résolue, cette information est connue. Sinon, des méthodes de prédiction de structure secondaire seront utilisées. Pour chaque zone pouvant correspondre à un peptide oblique potentiel, c'est-à-dire les zones délimitées par la méthode de Jähnig et la méthode HCA, la conformation sera indiquée dans le tableau ci-dessous (Table IV.4.).

Protéine	Zones HCA	Zones Jähnig	Séquence	Conformation
α -synucléine	zone 1 zone 2 zone 3	zone A	66-78	α , β et random-coil (P)
Insuline	zone 1	zone A zone B	11-20	α (9-19) (S)
Myoglobine	zone 1 zone 2	zone A	28-37	α (21-35) (S)

	zone 3 zone 4	zone B zone C zone D	68-76 101-107	α (59-76) (S) α (102-118) (S)
Fibrinogène α (FSM 522)	zone 1	zone A zone B	510-521 518-527	Random-coil et α (P) α (P)
Cystatine C	zone 1 zone 2	zone A zone B zone C	56-69	β (60-69) (S)
Prolactine	zone 1 zone 2	Aucune zones intéressantes		
Transthyretine	zone 1 zone 2 zone 3	zone A	25-33	β (29-35) (S)
Apolipoprotéine AI	zone 1	zone A		
Phosphatidylinositol 3 kinase	zone 1 zone 2	zone A	35-45	α (37-39) (S)
Gelsoline	zone 1	zone A	189-199	β (187-193) (S) β (196-201) (S)
Fish antifreeze protein	zone 1	Aucune zones intéressantes		

Table IV.4. : Localisation des zones susceptibles de contenir un peptide oblique. Ces zones possèdent des caractéristiques intéressantes au point de vue de la méthode HCA et de la méthode de Jähnig dans la recherche des peptides obliques. P signifie que la conformation a été prédite, tandis que S signifie que la conformation est connue expérimentalement.

Plusieurs protéines ne possèdent pas de zones communes pour les méthodes HCA et de Jähnig. Celles-ci sont donc éliminées. De plus, sur base de la conformation adoptée par les fragments définis par ces deux méthodes, plusieurs protéines ont également été éliminées. Il s'agit de la cystatine C, de la transthyretine et de la gelsoline. Il reste donc cinq protéines présentant des zones pouvant potentiellement contenir un peptide oblique.

IV.2.6. Calcul de la moyenne d'hydrophobicité

Le calcul de l'hydrophobicité moyenne d'un peptide permet de déterminer s'il peut appartenir à la classe des peptides obliques. Ceux-ci possèdent généralement une hydrophobicité moyenne comprise entre 0,2 et 0,9 leur permettant de s'insérer dans les bicouches membranaires. Le calcul de l'hydrophobicité moyenne a été réalisé à partir de l'échelle d'hydrophobicité consensus d'Eisenberg. Pour chaque zone intéressante déterminée au chapitre IV.2.6., l'hydrophobicité moyenne de peptides de longueurs différentes centrés sur ces zones a été calculée et figure dans la table ci-dessous (Table IV.5.).

Protéine	zone	Nombre d'acides aminés	Séquence	Hydrophobicité moyenne
α-synucléine	2A	11	68-78	0,65
		12	67-78	0,63
		13	66-78	0,67
		14	65-78	0,57
		16	63-78	0,56
Insuline	1B	11	8-18	0,50
		11	9-19	0,49
		12	8-19	0,49
		12	9-20	0,49
		13	8-20	0,49
Myoglobine	2A	11	28-38	0,12
		12	28-39	0,11
		13	28-40	0,19
	3B	12	65-76	0,70
		13	64-76	0,61
		14	63-76	0,46

	4C	13	99-111	0,39
		13	102-114	0,32
		14	102-115	0,37
		15	101-115	0,42
		16	101-116	0,34
		17	99-115	0,46
Fibrinogène α	1A	11	510-520	0,51
		12	510-521	0,57
		13	510-522	0,57
	1B	11	517-527	0,36
		12	516-527	0,34
		12	517-528	0,37
Phosphatidylinositol 3 kinase	1A	11	37-47	0,31
		12	37-48	0,34
		13	37-49	0,19
		14	37-50	0,19
		14	35-48	0,30

Table IV.5. : Hydrophobicité moyenne de peptides de longueurs différentes centrés sur chaque zone intéressante déterminée au chapitre IV.2.6.

Les peptides définis pour la zone 2A de la Myoglobine présentent une hydrophobicité moyenne inférieure à 0,2. Cette zone est donc éliminée. Deux peptides de la phosphatidylinositol-3-kinase sont également éliminés.

IV.2.7. Construction et minimisation des peptides

La construction d'une structure tridimensionnelle des peptides obliques potentiels est indispensable pour analyser leurs propriétés d'hydrophobicité et leur comportement à l'interface hydrophobe/hydrophile. Les peptides potentiellement obliques sont construits en hélice α droite à l'aide du logiciel Hyperchem en attribuant aux angles φ et ψ les valeurs correspondant aux hélices α classiques. La molécule subit alors une minimisation d'énergie par rotation de tous ses angles de torsion. Cette minimisation est réalisée en utilisant la méthode du gradient conjugué de Polak -Ribbiere (Polak E., 1971).

IV.2.8. Méthode Impala

La méthode IMPALA permet d'étudier l'interaction entre un peptide et une membrane modélisée. Une minimisation par la méthode de Monte-Carlo va faire varier la position de la molécule au sein de la bicouche et fournir un profil énergétique en fonction de cette position.

La méthode IMPALA va caractériser un peptide selon l'évolution de son angle d'insertion par rapport à la bicouche et de la pénétration du centre de masse du peptide dans la bicouche. Les peptides testés seront considérés comme obliques si leur angle d'insertion est compris entre 30 et 60° dans leur position la plus stable et si leur centre de masse pénètre suffisamment dans la bicouche de façon à interagir avec le cœur hydrophobe de celle-ci. L'interface entre les têtes polaires des lipides et le cœur hydrophobe de la bicouche se situant à 13,5 Å, le centre de masse de ces peptides dans leur position la plus stable doit avoisiner cette valeur.

Seuls les peptides définis au paragraphe IV.2.6. dont l'hydrophobicité moyenne est supérieure à 0,2 seront testés (Table IV.6.).

Protéine	Zone	Séquence	Angle (°)	Pénétration (Å)
α -synucléine	2A	68-78	33 ; 78	-10,5 ; -15,5
		67-78	31	-10,25
		66-78	30	-9,25
		65-78	33 ; 75 ; 86 ; 136	-8,75 ; -14,5 ; -16,25
		63-78	32 ; 81 ; 137	-8,25 ; -15
Insuline	1B	8-18	120 ; 134	-13,25 ; -12,25
		9-19	43 ; 63 ; 117 ; 137	-12,75 ; -11,5 ; 11,5 ; 12,75
		8-19	119 ; 134	-13 ; -11,75
		9-20	26 ; 117 ; 136	-15,75 ; -12,5 ; -11,25 ; -9,5
		8-20	119 ; 134	-12,75 ; -11,5
Myoglobine	3B	65-76	48 ; 132	-11,5 ; 11,5
		64-76	130	-9,5 ; 11
		63-76	66 ; 137	-13 ; -10,25

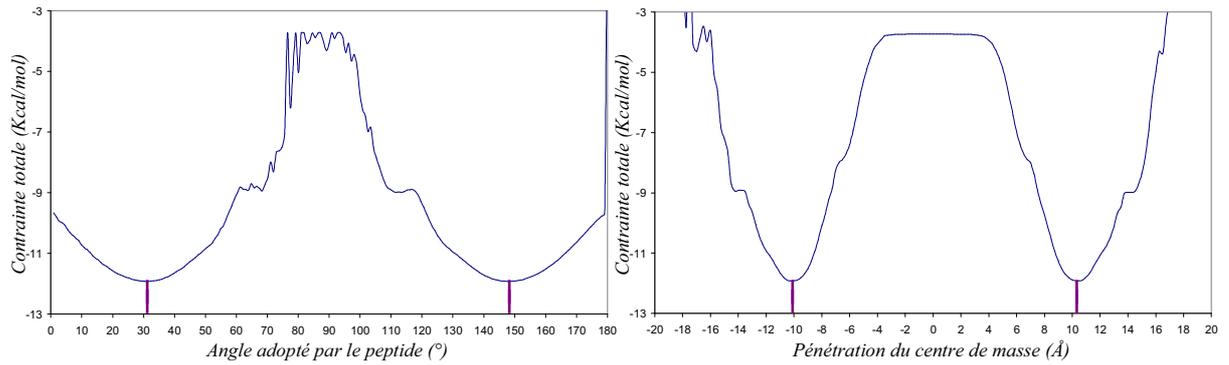
	4C	99-111	59	-12,75
		102-114	59	-14,25 ; -17
		<i>102-115</i>	53 ; 83 ; 96 ; 126	-16 ; -11,25 ; 11,25 ; 16
		101-115	119	11,75 ; 14,75
		101-116	59	-12 ; -15
		99-115	59	-14 ; -10,75
Fibrinogène α (FSM 522)	1A	510-520	28 ; 68	-14,25 ; -11,5
		510-521	68	-14,25 ; -10,75
		510-522	52 ; 69	-14,5 ; -11
	1B	517-527	35	-9,75 ; 8,75
		<i>516-527</i>	34 ; 145	-15 ; -9,25 ; 9,25 ; 15
		517-528	41	-10
Phosphatidyl -inositol-3- kinase	1A	37-47	23	-14,75
		37-48	26	-15
		35-48	26 ; 62	-14 ; -16,75

Table IV.6. : Valeurs des angles par rapport à la perpendiculaire de la membrane et des pénétrations correspondant aux minimums énergétiques figurant sur les profils fournis par la méthode IMPALA pour chaque peptide testé. Les valeurs en gras correspondent au minimum global de chaque profil. Les séquences en italique gras correspondent aux peptides obliques mis en évidence.

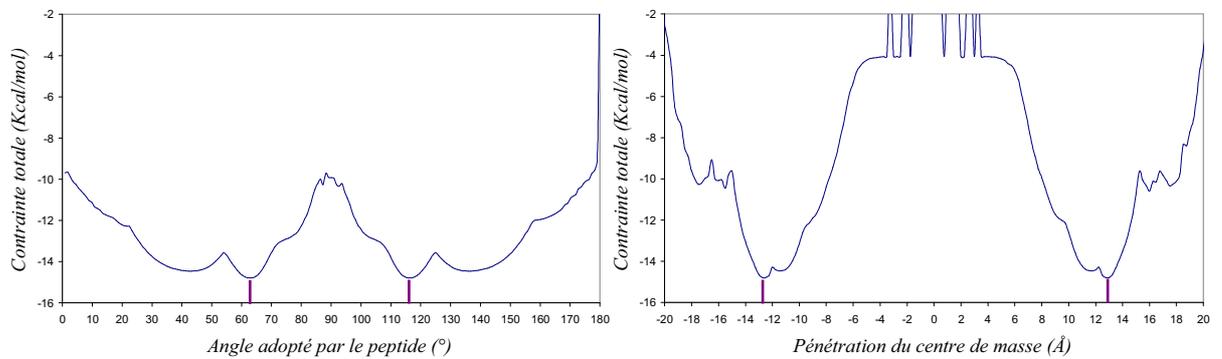
La méthode IMPALA a permis de mettre en évidence plusieurs peptides obliques répartis sur quatre protéines. Un peptide oblique optimum d'un point de vue angle et insertion est choisi par protéine. Il s'agit des fragments qui correspondent à la séquence 67-78 de l'α-synucléine, 9-19 de l'insuline, 65-76 et 102-115 de la myoglobine et 516-527 du fibrinogène α (522 FSM). Aucun peptide oblique n'a pu être mis en évidence pour la phosphatidylinositol-3-kinase et la zone 1A du fibrinogène (FSM 522).

Les graphiques obtenus par la méthode IMPALA pour les peptides obliques "optimum" mis en évidence (séquence en italique gras) figurent ci-dessous (Figure IV.4.).

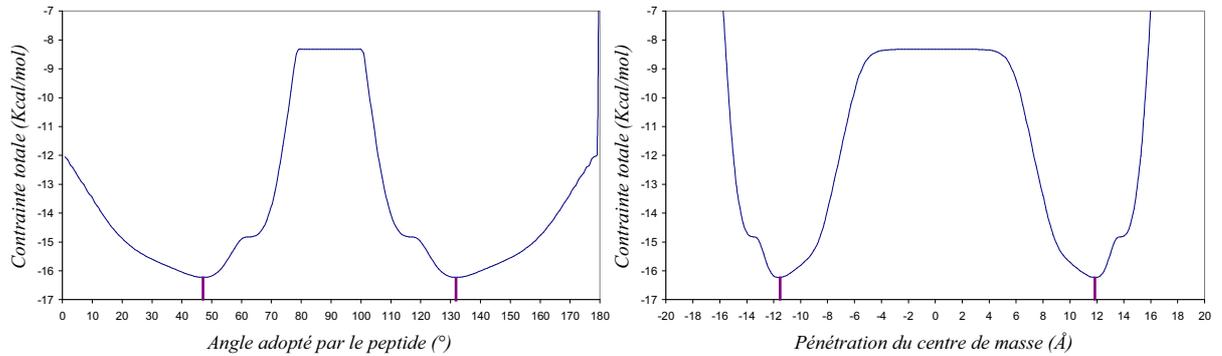
A. Peptide 67-78 de l' α -synucléine



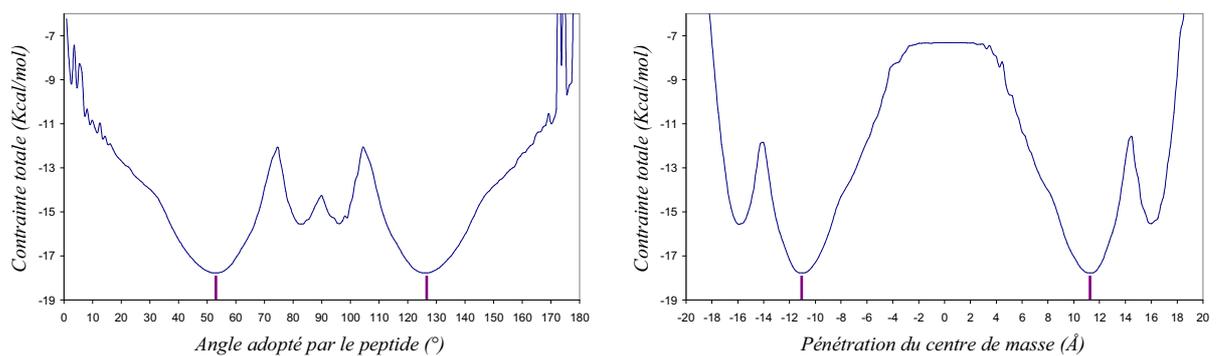
B. Peptide 9-19 de l'insuline



C. Peptide 65-76 de la myoglobine



D. Peptide 102-115 de la myoglobine



E. Peptide 516-527 du fibrinogène α (FSM en 522)

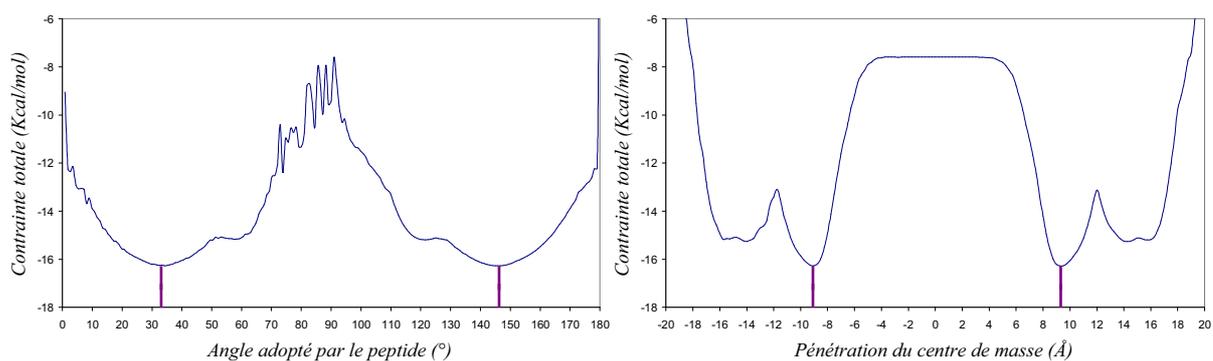


Figure IV.4. : Graphiques de la contrainte totale (en Kcal/mol) en fonction de la pénétration du centre de masse (à droite, en Å) et de l'angle adopté par le peptide (à gauche, en °). Il s'agit de l'angle entre l'axe du peptide et la normale à la bicouche. Les minimums énergétiques globaux sont signalés par une marque mauve. Ces graphiques correspondent aux peptides obliques de l' α -synucléine (A), de l'insuline(B), de la myoglobine (C et D) et du fibrinogène α (FSM 522) (E).

IV.2.9. Présentation des peptides obliques des protéines amyloïdogéniques

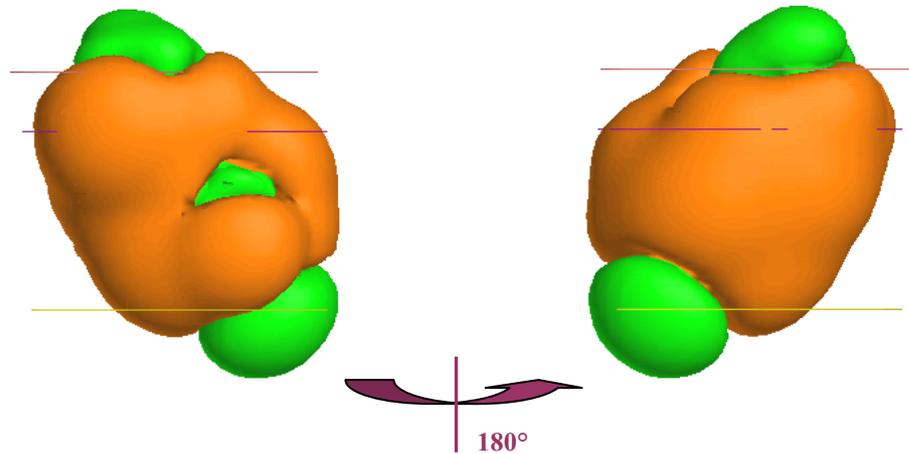
Parmi les 27 protéines amyloïdogéniques, quatre se sont avérées posséder un peptide oblique, ou deux dans le cas de la myoglobine. Pour avoir une vue d'ensemble, le tableau IV.7. reprend leurs principales caractéristiques.

Protéine	Séquence du peptide oblique dans la protéine	Nombre d'acides aminés	Hydrophobicité moyenne	Angle d'insertion optimum (°)	Pénétration du centre de masse optimum (Å)
α -synucléine	67-78	12	0,63	31	-10,25
Insuline	9-19	11	0,49	63	-12,75
Myoglobine	65-76	12	0,7	48	-11,5
	102-115	14	0,37	53	-11,25
Fibrinogène α (FSM 522)	516-527	12	0,34	34	-9,25

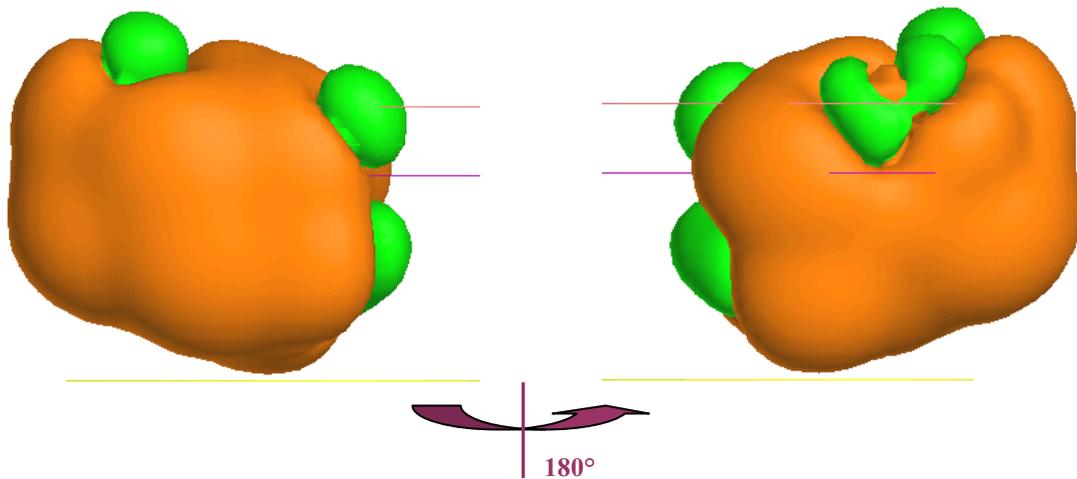
Table IV.7. : Caractéristiques principales des peptides obliques des protéines amyloïdogéniques

La répartition asymétrique de l'hydrophobicité des peptides obliques est visualisée par le calcul de la surface des isopotentiels hydrophobes et hydrophiles (MHP) de ces peptides dans la membrane modélisée (Figure IV.5.).

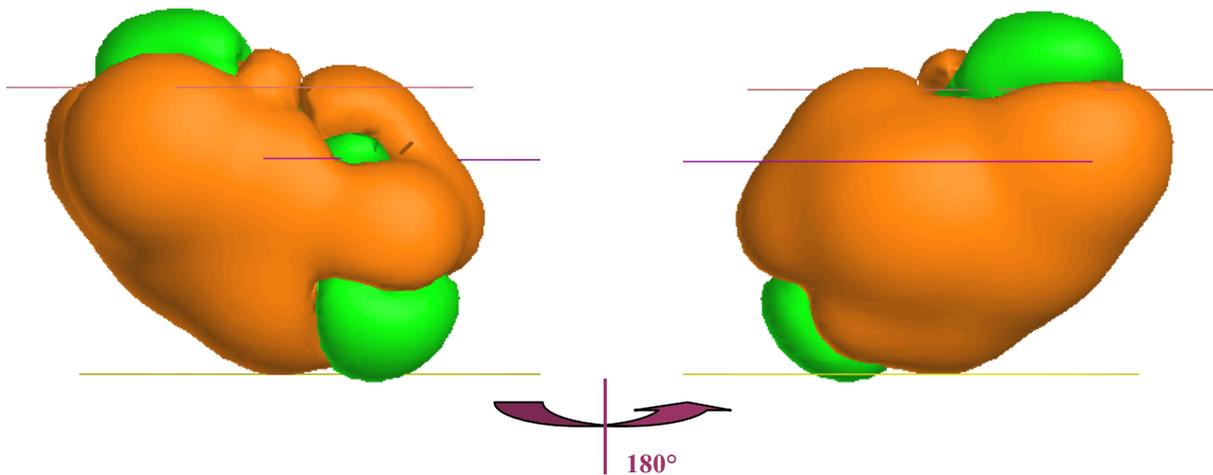
A. Peptide 67-78 de l' α -synucléine



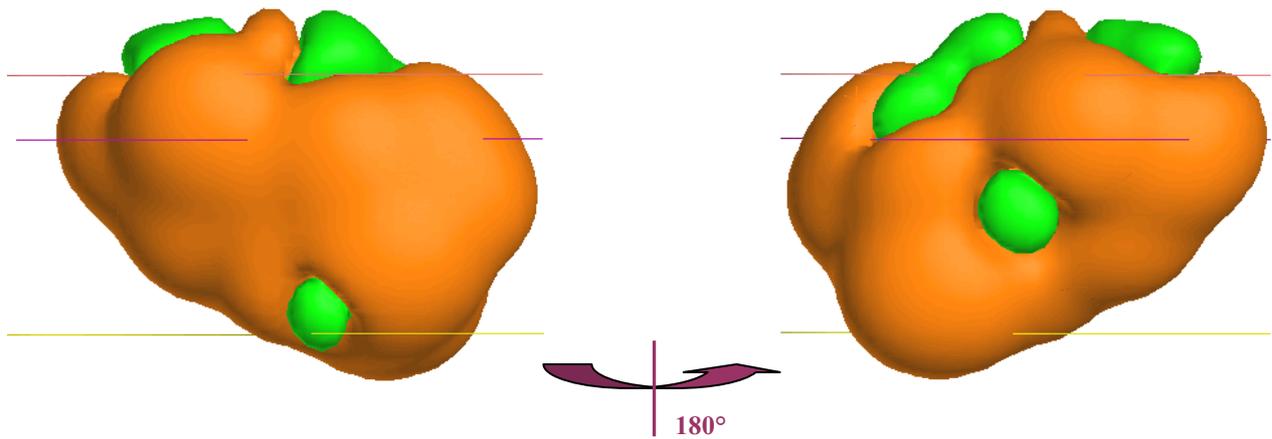
B. Peptide 9-19 de l'insuline



C. Peptide 65-76 de la myoglobine



D. Peptide 102-115 de la myoglobine



E. Peptide 516-527 du fibrinogène α (FSM 522)

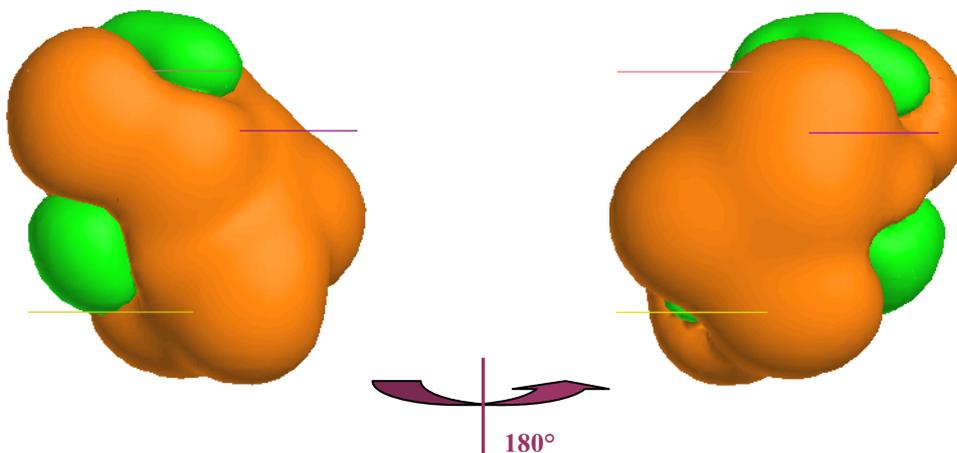


Figure IV.5. : Représentation des peptides obliques détectés par l'intermédiaire de la surface des isopotentiels hydrophobes et hydrophiles (MHP) de ces peptides dans la membrane modélisée (orange = enveloppe hydrophobe, verte = enveloppe hydrophile). Leur insertion dans la membrane est également visualisée grâce à trois lignes représentant la surface de la bicouche ($Z = 18 \text{ \AA}$, ligne rose), la transition têtes polaires/chaînes acylées ($Z = 13,5 \text{ \AA}$, ligne mauve) et le centre de la bicouche ($Z = 0 \text{ \AA}$, ligne jaune). Ces graphiques correspondent aux peptides obliques de l' α -synucléine (A), de l'insuline(B), de la myoglobine (C et D) et du fibrinogène α (FSM 522) (E).

Ces différentes figures (IV.A., B., C., D. et E.) permettent de constater que les peptides obliques détectés présentent effectivement une orientation oblique par rapport à la bicouche modélisée, qu'ils pénètrent suffisamment dans celle-ci pour la déstabiliser et que leur potentiel d'hydrophobicité moléculaire est asymétrique.

Le peptide oblique potentiel de l' α -synucléine fait partie d'une protéine impliquée dans une maladie neurodégénérative, la maladie de Parkinson, tout comme les peptides obliques détectés dans les protéines responsables de la maladie d'Alzheimer ou les maladies à prions. Il nous a paru judicieux d'étudier expérimentalement ce peptide en premier lieu. L'objectif de ces études était de mettre en évidence les propriétés déstabilisatrices de ce peptide. Des expériences de fusion de liposomes ont été réalisées car elles constituent actuellement le seul test qui permet de caractériser expérimentalement les peptides obliques.

IV.3. Approche expérimentale

Les méthodes de modélisation moléculaire ont permis de mettre en évidence plusieurs peptides obliques parmi les protéines amyloïdogéniques. Un de ceux-ci, le peptide oblique de l' α -synucléine, a été synthétisé afin d'établir ses propriétés déstabilisatrices et donc son appartenance à la classe des peptides obliques. A cette fin, des essais de fusion de liposomes et de spectroscopie infrarouge ont été réalisés. Le peptide synthétisé est désigné par le code Synu/RB69.

IV.3.1. Mesures de fusion de phase lipidique

La fusion de phase lipidique permet de mettre en évidence l'activité fusogène des peptides obliques. Pour les mesures de fusion, des liposomes non marqués sont ajoutés à des liposomes marqués au R18 et mis en présence d'un peptide potentiellement fusogène. S'il y a fusion, la densité de surface du fluorophore diminue et on assiste à une augmentation de fluorescence.

Les mesures de fusion ont été réalisées sous différentes conditions expérimentales. Ces mesures ont été réalisées à pH 7,4 avec des liposomes unilamellaires de petite taille (SUV) et de grande taille (LUV), composés de lipides chargés négativement (PC, PE, PI, PS, SM, CHOL) ou globalement neutres (PC, PE, SM, CHOL). De plus, le peptide oblique de l' α -synucléine a été dissous dans divers solvants (TFE, HFP/TFE et DMSO) et a été testé à différents rapports molaires peptide/lipide R allant de 0,02 à 0,8.

Pour chaque type de liposome, trois graphiques sont présentés. Le potentiel fusogène de l' α -synucléine a été comparé à celui du peptide oblique du SIV. Ce peptide a été largement décrit et caractérisé dans la littérature (Martin I. *et al.*, 1991 ; Martin I. *et al.*, 1994 ; Horth M. *et al.*, 1991) et sert de contrôle positif dans nos expériences. Ils correspondent au peptide oblique de l' α -synucléine dilué dans les différents solvants. Sur chacun des graphiques, la fluorescence mesurée pour le solvant et les différents rapports R peptide/lipide est présentée.

IV.3.1.1. LUV

a) Lipides neutres

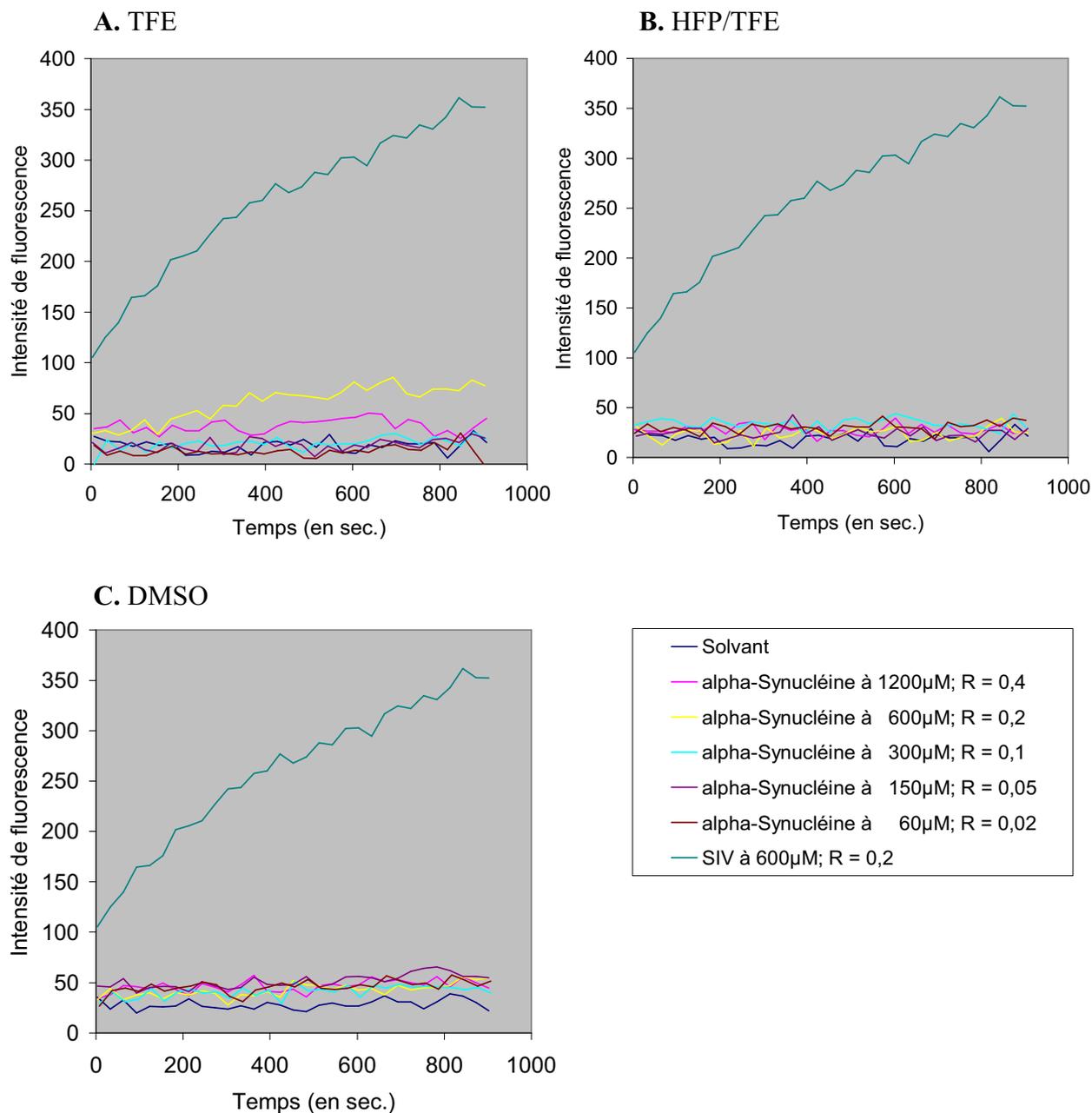


Figure IV.6. : Mesures de fusion de liposomes réalisées à pH 7,4 avec le peptide de l'α-synucléine dissous dans du TFE (A), de l'HFP/TFE (B) et du DMSO (C). Le SIV sert de contrôle positif et figure en vert.

La figure IV.6. montre que le peptide oblique de l'α-synucléine n'induit pas de fusion significative quel que soit le solvant dans lequel il est dissous et le rapport peptide/lipide testé.

b) Liposomes chargés négativement

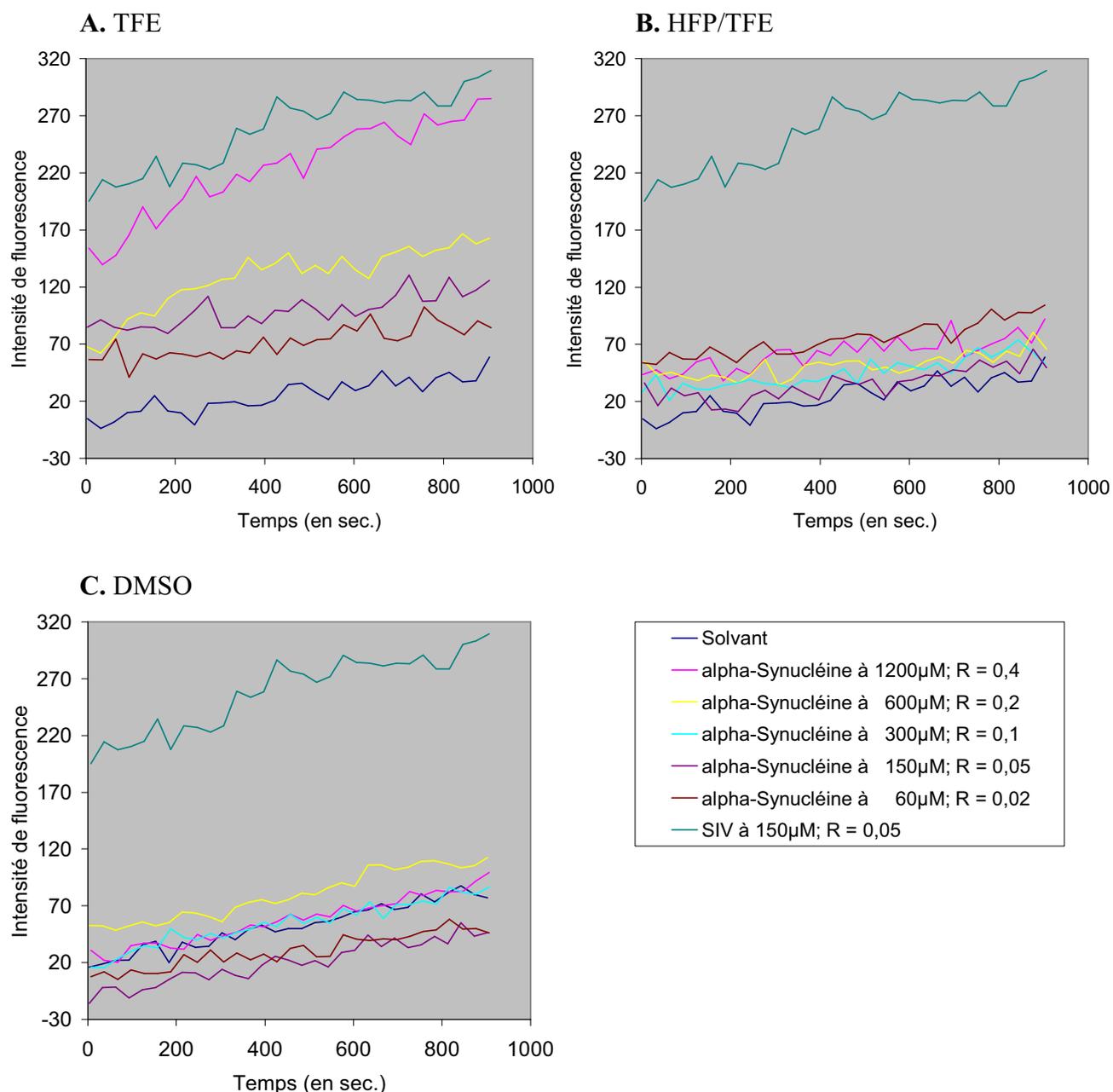


Figure IV.7. : Mesures de fusion de liposomes réalisées à pH 7,4 avec le peptide de l'α-synucléine dissous dans du TFE (A), de l'HFP/TFE (B) et du DMSO (C). Le SIV sert de contrôle positif et figure en vert.

La figure IV.7. montre que le peptide oblique de l'α-synucléine, lorsqu'il est dissous dans du TFE et se trouve à un rapport R de 0,2 et 0,4 induit une fusion significative. Au rapport le plus élevé, le taux de fusion est similaire à celui induit par le SIV à un rapport molaire peptide/lipide de 0,05. De plus, la fusion est dose-dépendante.

IV.3.1.2. SUV

a) Lipides neutres

Le peptide mis en présence de lipides globalement neutres n'induit pas de fusion significative dans le cas de vésicules de grande taille (Figure IV.6.). Les mêmes résultats sont obtenus pour les SUV et ne sont donc pas montrés.

b) Liposomes chargés

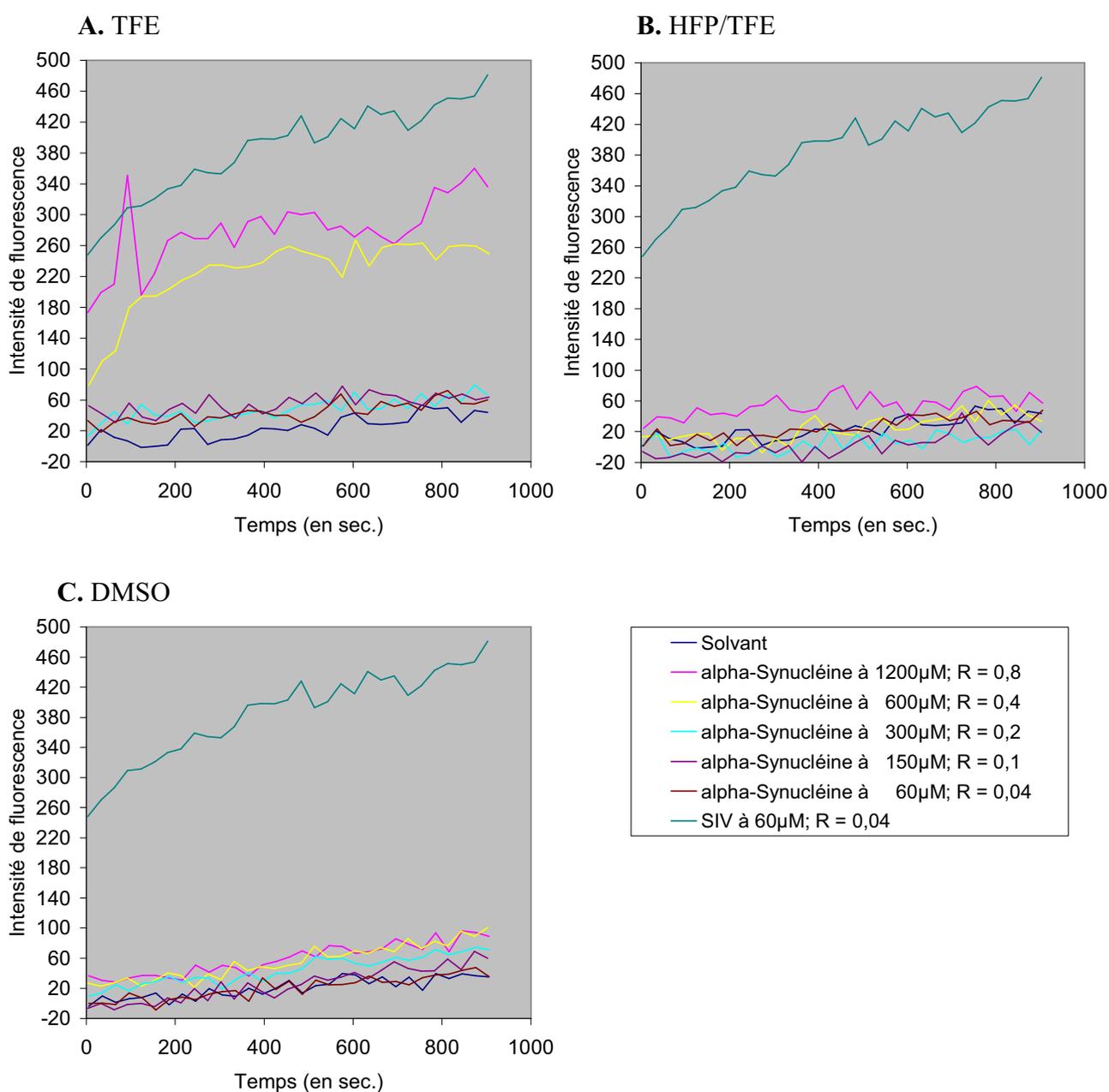


Figure IV.8. : Mesures de fusion de liposomes réalisées à pH 7,4 avec le peptide de l' α -synucléine dissous dans du TFE (A), de l'HFP/TFE (B) et du DMSO (C). Le SIV sert de contrôle positif et figure en vert.

Comme dans le cas des LUV chargés, le peptide de l' α -synucléine induit de la fusion significative à partir d'un R supérieur ou égal à 0,4 (Figure IV.), lorsqu'il est dissous dans du TFE. Dans le cas des SUV, la fusion au rapport R = 0,8 est légèrement inférieure à celle obtenue pour le SIV.

IV.3.4. Détermination de la structure secondaire du peptide

La technique de spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier en Réflexion Totale Atténuée (ATR-FTIR) est utilisée pour déterminer la structure secondaire d'un peptide en solution. La région du spectre où le groupe amide primaire des protéines absorbe (1610 à 1690 cm^{-1}) est sensible à la structure secondaire adoptée par les peptides. Cette région du spectre est donc déconvoluée par transformée de Fourier pour en augmenter la résolution. Cette méthode permet de déterminer le pourcentage de peptide en conformation α , β , turn ou random-coil.

Le peptide oblique de l' α -synucléine, préalablement dissous dans un solvant, est étalé sur une plaque de germanium. Les résultats de l'analyse FTIR se trouvent dans la table IV.8.

Solvant employé	Total β	Total α	Random-coil	Turn
TFE	37	25	12	26
HFP/TFE	50	21	10	19

Table IV.8. : Pourcentage ($\pm 5\%$) de peptide 67-78, dissous dans du TFE ou de l'HFP/TFE, en conformation α , β , random-coil ou turn

Ces résultats montrent que le peptide 67-78 de l' α -synucléine adopte principalement une conformation en brin β en solution, comme dans le cas d'autres peptides obliques tels que A β (29-42 ou PrP (118-135)).

V. Discussion

Les protéines amyloïdogéniques constituent une famille de protéines dont l'étude est essentielle dans la compréhension des phénomènes de transconformation. Ces protéines ont cette caractéristique commune de subir une modification de leur conformation native conduisant à la formation de fibrilles structurées essentiellement en conformation β . Cependant, ces protéines sont difficiles à étudier, de par leur faible solubilité et leur agrégation rapide. Récemment, des peptides obliques ont été détectés dans des protéines de ce type. Il s'agit de la protéine PrP, du peptide β amyloïde et des prions bactériens Ure2p et Sup35p. L'équipe du Professeur Brousse a ainsi émis l'hypothèse selon laquelle les peptides obliques pourraient être impliqués dans les processus de transconformation des protéines amyloïdogéniques.

Les peptides obliques sont de courts fragments protéiques (11 à 18 résidus) possédant un gradient d'hydrophobicité lorsqu'ils sont hélicoïdaux. Cette propriété leur fait adopter une orientation oblique lorsqu'ils interagissent avec une interface hydrophile/hydrophobe. Des peptides obliques ont été trouvés dans plusieurs types de protéines et sont généralement associés à une interaction avec la bicouche phospholipidique. C'est le cas, par exemple, des peptides obliques présents dans les protéines de fusion virales. Cependant, les peptides obliques pourraient également être impliqués dans les processus de transconformation. Deux hypothèses ont été émises à ce sujet. Le peptide oblique pourrait s'insérer à l'interface cœur hydrophobe/enveloppe hydrophile d'une protéine et déstabiliser sa conformation native. Dans la seconde hypothèse, un peptide oblique pourrait, suite à des modifications de son environnement, passer d'une conformation α (ou random-coil) à une conformation β de par sa labilité structurelle propre. Cette transconformation entraînerait le changement de conformation de toute la protéine.

Le but de ce travail était de mettre en évidence, par des méthodes de modélisation moléculaire, des peptides obliques dans d'autres protéines amyloïdogéniques. A cette fin, une méthodologie particulière a été mise en place pour étudier la séquence d'un grand nombre de protéines. Cinq peptides obliques ont pu être détectés dans quatre protéines amyloïdogéniques.

Un des peptides obliques mis en évidence provient de la séquence de l' α -synucléine, impliquée dans la maladie de Parkinson. Celui-ci correspond à la séquence 67-78 et possède toutes les propriétés des peptides obliques : taille de douze résidus, hydrophobicité moyenne de 0,63 et angle de pénétration dans la bicouche de 31°. La figure IV.5.A. montre que celui-ci est très hydrophobe (les surfaces hydrophiles inférieures et supérieures correspondent aux extrémités C et N terminales) comme d'autres peptides obliques tels que le peptide oblique du virus SIV (Horth M. *et al.*, 1991) ou celui de la protéine A β (Pillot T. *et al.*, 1996) et s'insère obliquement par rapport au plan de la bicouche.

Les prédictions ont ensuite été confirmées par approche expérimentale de fusion lipidique. Celle-ci consiste à mettre en présence le peptide et un mélange de liposomes marqués au R18 et non marqués. L'augmentation de fluorescence du R18 indique que le peptide 67-78 de l' α -synucléine dissous dans du TFE induit la fusion de liposomes (LUV ou SUV) chargés négativement et ce à un rapport peptide/lipide (P/L) supérieur ou égal à 0,4. Ces résultats sont en accord avec ceux de Davidson *et al.* qui rapportent que l' α -synucléine se lie préférentiellement à de petites vésicules formées d'une monocouche contenant des phospholipides acides (Davidson WS. *et al.*, 1998). Ce peptide est toutefois moins fusogène que le peptide oblique du SIV puisque pour une fusion similaire (Figure IV.7.A.), le peptide du SIV se trouve à un rapport P/L de 0,05. Cette différence a déjà été observée pour d'autres peptides obliques (Ebola (Adam B., 2002), Apo C-III (Lins *et al.*, 2002) et pourrait résulter de l'hydrophobicité moyenne moindre du peptide de l' α -synucléine (0,6 comparé à 0,9) et donc d'une affinité pour les lipides moins marquée. D'autre part, cela pourrait provenir de la tendance du peptide de l' α -synucléine à s'agréger (cf. ci-dessous).

Des mesures infrarouges ont également été réalisées pour déterminer la structure secondaire adoptée par le peptide en solution. Celles-ci montrent que le peptide de l' α -synucléine se replie préférentiellement en brin β lorsqu'il est en solution. Ce comportement a déjà été observé pour d'autres peptides obliques, tel que le SIV (Martin I. *et al.*, 1991) ou le peptide A β (Pillot T. *et al.*, 1996). La conformation adoptée par le peptide dans les lipides n'a pas encore été étudiée. Cependant, Davidson W.S. *et al.* ont montré que l' α -synucléine adopte une conformation en hélice α lorsqu'elle interagit avec les phospholipides de la membrane (Davidson W.S. *et al.*, 1998). Cette mesure pourrait donc s'avérer intéressante.

L' α -synucléine est une petite protéine cytosolique appartenant à la famille des synucléines. Celle-ci regroupe la β -synucléine, la γ -synucléine et le synoretine. Contrairement à ces dernières, l' α -synucléine est amyloïdogénique et est associée à la maladie de Parkinson.

La découverte de ce peptide dans la séquence de l' α -synucléine présente une corrélation avec des données de la littérature. Tout d'abord, El-Agnaf O.M.A. *et al.* ont établi que les résidus 61-78 présentaient une similarité de séquence avec des régions cruciales pour l'agrégation et la toxicité d'autres protéines amyloïdogéniques telles que la protéine prion, le peptide β amyloïde et l'IPP (Islet Amyloïde Polypeptide) (El-Agnaf O.M.A. *et al.*, 1998). Il s'avère que ces régions correspondent, pour la protéine prion et le peptide β amyloïde, aux peptides obliques déjà découverts.

Très récemment, la même équipe rapporte que le domaine 68-78 est le plus petit fragment possédant les propriétés d'agrégation et de toxicité (El-Agnaf O.M.A. *et al.*, 2002). De plus, Giasson BI. *et al.* ont montré qu'un motif de douze acides aminés (71-82) du domaine hydrophobe de l' α -synucléine serait nécessaire et suffisant pour sa fibrillation. En effet, la β -synucléine, qui est très homologue à l' α -synucléine, ne possède pas ce motif et ne forme pas de fibrilles. L'introduction d'un résidu chargé dans ce motif diminue le taux de polymérisation et une délétion empêche la formation de polymères. Ce polypeptide peut polymériser seul et accentue la fibrillation de l' α -synucléine (Giasson BI. *et al.*, 2001). Enfin, Lee H.J. *et al.* ont également montré que, sous sa forme hélicoïdale, l' α -synucléine a une propension plus grande à s'agréger que la forme cytosolique non structurée (Lee H.J. *et al.*, 2002). Toutes ces informations contribuent à montrer l'importance de cette région de l' α -synucléine dans le phénomène de transconformation. Etant donné la présence d'un peptide oblique dans le domaine transconformationnel de l' α -synucléine, cela renforce l'idée que les peptides obliques pourraient être impliqués dans le processus de transconformation.

Un peptide oblique a également été trouvé dans la séquence de l'insuline porcine. Il s'agit du peptide 9-19 de cette protéine. Les figures IV.4.B. et IV.5.B. montrent que celui-ci s'insère obliquement dans la bicouche. Ce peptide fait 11 résidus de long et possède une hydrophobicité moyenne de 0,49.

L'insuline est une hormone, synthétisée dans les cellules β du pancréas, dont la fonction est de diminuer la concentration en glucose du sang. Les monomères d'insuline adoptent essentiellement une conformation en hélice α et contiennent 51 acides aminés répartis en

deux chaînes (la chaîne A de 21 résidus et la chaîne B de 30 résidus) liées ensemble par deux ponts disulfures. Un troisième pont disulfure établit une liaison entre deux résidus de la chaîne A. Le peptide 9-19 correspond à l'hélice de la chaîne B (résidus 9-19) et est entouré par les deux cystéines (résidus 7 et 19) formant les ponts disulfures.

Des dépôts amyloïdes contenant des molécules d'insuline intactes, incluant les ponts disulfures, ont été rencontrés chez un patient souffrant d'un diabète insulino-dépendant qui subissait un traitement d'injection d'insuline porcine (Dische F.E. *et al.*, 1988). L'insuline peut également former des fibrilles amyloïdes *in vitro*. Dans ce cas, le processus d'agrégation est plus rapide à hautes températures (60-70°C), à bas pH (1,5-2,0) et à de relativement hautes concentrations (mM) (Brange J. *et al.*, 1997). Le domaine transconformationnel n'est pas connu avec précision.

La myoglobine posséderait, quant à elle, deux peptides obliques. Ceux-ci occupent les séquences 65-76 et 102-115. Le peptide 65-76 (12 résidus) possède une hydrophobicité moyenne de 0,7 et s'insère dans les membranes avec un angle de 48°. Le peptide 102-115 (14 résidus) possède une hydrophobicité moyenne de 0,37 et s'insère dans les membranes avec un angle de 53°. Ces deux peptides correspondent à deux hélices α de la myoglobine. Il s'agit des hélices 59-76 et 102-118.

La myoglobine est une protéine de transport de l'oxygène dont la structure tridimensionnelle est constituée d'hélices α . L'apo-myoglobine, qui correspond à la myoglobine dépourvue de son noyau hème, peut former des fibrilles amyloïdes soit lorsqu'elle porte les mutations W7F W14F, soit dans des conditions déstabilisantes *in vitro* (pH 9 et 65°C). La transconformation de cette protéine n'est associée à aucune maladie. Le domaine subissant la transconformation n'est pas connu à ce jour.

Le dernier peptide oblique mis en évidence fait partie de la séquence 499-547 du fibrinogène α ayant subi une "frame shift mutation" à partir de l'acide aminé 522. La transconformation de ce fragment protéique est la cause de l'amyloïdose rénale héréditaire. Le peptide oblique correspond à la séquence 516-527 de cette protéine, possède une hydrophobicité moyenne de 0,34 et s'insère dans les membranes avec un angle de 34°. Normalement, le fibrinogène agit comme un cofacteur dans l'agrégation des plaquettes.

Quatre mutations sont responsables de l'apparition de l'amyloïdose rénale héréditaire. Une de ces mutations fait apparaître un peptide oblique. Ce dernier pourrait jouer un rôle dans la transconformation du fibrinogène α .

En conclusion, cinq peptides obliques, appartenant à quatre protéines différentes, ont pu être mis en évidence parmi l'ensemble de 27 protéines amyloïdogéniques étudiées et un de ceux-ci a été testé expérimentalement. Au cours de ce travail, nous avons établi dans des essais préliminaires que le peptide 67-78 de l' α -synucléine présentait des propriétés déstabilisatrices vis-à-vis de membranes liposomiales. Ce travail porte donc à huit le nombre de protéines amyloïdogéniques contenant un peptide oblique, ce qui représente environ 1/4 à 1/3 des protéines de ce type. Les résultats de notre étude confortent donc l'hypothèse selon laquelle les peptides obliques joueraient un rôle dans le processus de transconformation.

VI. Perspectives

Les résultats de cette étude confortent l'hypothèse selon laquelle les peptides obliques pourraient avoir un rôle dans les processus de transconformation. Pour étayer celle-ci, plusieurs voies pourraient être suivies.

D'une part, l'étude des protéines amyloïdogéniques possédant un peptide oblique pourrait être approfondie. En ce qui concerne le peptide oblique de l' α -synucléine, des expériences de perméabilité de liposomes et de fusion de phase aqueuse pourraient être menées pour établir de manière univoque la fusion des phases lipidiques observée au cours de cette étude. L'étude de la conformation et de l'angle adopté par le peptide en présence de lipides par spectroscopie infrarouge pourrait également être réalisée. Les propriétés déstabilisatrices des quatre autres peptides obliques détectés au cours de cette étude devraient également être établies expérimentalement.

D'autre part, l'étude pourrait être élargie à d'autres protéines amyloïdogéniques non encore étudiées ou à d'autres protéines subissant des phénomènes de transconformation. En effet, de nouvelles protéines transconformationnelles sont décrites régulièrement dans la littérature.

Une des hypothèses émises quant à l'implication des peptides obliques dans la transconformation est qu'ils puissent agir sur une interface protéique et modifier la conformation de cette protéine. Nous pourrions tenter de mettre au point une nouvelle technique expérimentale qui permettrait de mettre en évidence une telle activité des peptides obliques. Une protéine telle la sérum albumine bovine (SAB) pourrait être utilisée. Afin de mesurer le potentiel déstabilisateur du peptide oblique, des molécules fluorescentes telles que l'ANS (anilino-naphtalène sulfonate) ou le FITC (fluoroisothiocyanate) pourraient être introduites dans la SAB. L'ANS est un marqueur fluorescent non covalent qui se lie aux poches hydrophobes d'une protéine et dont la fluorescence dépend de l'hydrophobicité de l'environnement. Une modification de fluorescence de l'ANS en présence du peptide oblique indiquera un effet déstabilisateur sur l'interface de la SAB. Le FITC se lie de façon covalente à des fonctions amine (lysines). Son intensité de fluorescence dépend également de l'environnement. Dès lors, l'ANS devrait indiquer des modifications du cœur de la protéine et le FITC, de sa surface.

A plus long terme, ce travail pourrait avoir des retombées pharmacologiques, puisque les fragments obliques pourraient être la cible de molécules « stabilisatrices » qui diminueraient voire empêcheraient la transconformation. Il a notamment été montré que le peptide oblique A β peut être stabilisé par interaction directe avec un domaine amphipathique de l'apolipoprotéine E (apo E) (Lins et al, 1999 ; Pillot et al, 1999).

VII. Bibliographie

1. Adam B. (2002). Study of the fusion peptide of the Ebola virus. Mémoire de fin d'étude réalisé à la *Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux*. 76 p.
2. Alper T., Cramp W.A., Haig D.A., Clarke M.C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid ? *Nature* 214, 764-766.
3. Anfinsen C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230.
4. Bartlett G.R. (1959). Phosphorus Assay in Column Chromatography. *J. Biol. Chem.* 234, 466-468.
5. Blake C., Serpell L. (1996). Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous β -sheet helix. *Structure* 4, 989-998.
6. Bradshaw J.P., Darkes M.J., Harroun T.A., Katsaras J., Epand R.M. (2000). Oblique membrane insertion of viral fusion peptide probed by neutron diffraction. *Biochemistry* 39, 6581-6585.
7. Brasseur R., Lorge P., Goormaghtigh E., Ruyschaert J.M., Espion D., Burny A. (1988). The mode of insertion of the paramyxovirus F1 N-terminus into lipid matrix, an initial step in host cell / virus fusion. *Virus Genes* 1, 325-332.
8. Brasseur R., Vandenbranden M., Coret B., Burny A., Ruyschaert J.M. (1990). Orientation into the lipid bilayer of an asymmetric amphipathic helical peptide located at the N-terminus of viral fusion proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1092, 267-273.
9. Brasseur R. (1991). Differentiation of lipid-associating helices by use of three-dimensional molecular hydrophobicity potential calculations. *J. Biol. Chem.* 266, 16120-16127.
10. Brasseur R., Pillot T., Lins L., Vandekerckhove J., Rosseneu M. (1997). Peptides in membranes: tipping the balance of membrane stability. *Trends Biochem. Sc.* 22, 167-171.
11. Brasseur R. (2000). Tilted peptides : a motif for membrane destabilization (Hypothesis). *Mol. Membr. Biol.* 17, 31-40.
12. Bussell R., Eliezer D. (2001). Residual structure and dynamics in Parkinson's disease-associated mutants of alpha-synuclein. *J.Biol.Chem.* 276, 45996-46003.
13. Byler D.M., Susi H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* 25, 469-487.
14. Cabiaux V., Goormaghtigh E., Wattiez R., Falmagne P., Ruyschaert J.M. (1989). Secondary structure changes of diphtheria toxin interacting with asolectin liposomes: an infrared spectroscopy study. *Biochimie* 71, 153-158.

15. Chandra S., Chen X., Rizo J., Jahn R., Sudhof T.C. (2003). A broken alpha -helix in folded alpha -synuclein. *J.Biol.Chem.* 278, 15313-15318.
16. Clippingdale A.B., Wade J.D., Barrow C.J. (2001). The Amyloid- β Peptide and its Role in Alzheimer's Disease. *Journal of Peptide Science* 7, 227-249.
17. Cohen A.S., Calkins E. (1959). Electron microscopic observation on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* 183,1202-1203.
18. Cohen B.I., Presnell S.R., Cohen F.E. (1993). Origins of structural diversity within sequentially identical hexapeptides. *Protein Sci.* 2, 2134-2145.
19. Coles M., Bicknell W., Watson A.A., Fairlie D.P., Craik D.J. (1998). Solution structure of amyloid β -peptide (1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is? *Biochem.* 37, 11064-11077.
20. Colon W., Kelly J.W. (1991). Transthyretin acid induced denaturation is required for amyloid fibril formation. In Kelly J.W., Baldwin T.O. (eds). *Applications of Enzyme Biotechnology*. New York Plenum, p.99-108.
21. Coulthart M.B., Cashman N.R. (2001). Variant Creutzfeldt-Jakob disease : a summary of current scientific knowledge in relation to public health. *CMAJ* 165, 51-58.
22. Crescenzi O., Tomaselli S., Guerrini R., Salvadori S., D'Ursi A.M., Temussi P.A., Picone D. (2002). Solution structure of the Alzheimer amyloid β -peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain. *Eur. J. Biochem.* 269, 5642-5648.
23. Davidson W.S., Jonas A., Clayton D.F., George J.M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J.Biol.Chem.* 273, 9443-9449.
24. Deleage G., Roux B. (1987). An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng.* 1, 289-294.
25. Divry P., Florin M. (1927). Sur les propriétés optiques de l'amyloïde, *C. R. Soc. Biol.* 97, 1808-1810.
26. Dobson C.M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *TIBS* 24, 329-332.
27. Ducarme P., Rahman M., Brasseur R. (1998). Impala : a simple restraint field to simulate the biological membrane in molecular structure studies. *Proteins* 30, 357-371.
28. Eisenberg D., Weiss R., Terwilliger T. (1982). The helical hydrophobic moment : a measure of the amphiphilicity of the α -helix. *Nature* 299, 371-374.
29. El-Agnaf O.M.A., Bodles A., Guthrie D.J.S., Harriott P., Irvine G.B. (1998). The N-terminal region of non-A β component of Alzheimer's Disease amyloid is responsible for its tendency to assume β -sheet and aggregate to form fibrils. *Eur. J. Biochem.* 258, 157-163.

30. El-Agnaf O.M.A., Irvine G.B. (2002). Aggregation and neurotoxicity of α -synuclein and related peptides. *Biochemical Society Transactions* 30, 559-565.
31. Fändrich M., Fletcher M.A., Dobson C.M. (2001). Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* 410, 165-166.
32. Festy F., Lins L., Péranzi G., Octave J.N., Brasseur R., Thomas A. (2001). Is aggregation of β -amyloid peptides a mis-functioning of a current interaction process ? *Biochimica et Biophysica Acta* 1546, 356-364.
33. Frishman D., Argos P. (1996). Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng.* 9, 133-142.
34. Gaboriaud C., Bissery V., Benehtrit T., Momon J.P. (1987). Hydrophobic cluster analysis an efficient new way to compare and analyse amino acid sequence. *FEBS* 224, 149-155.
35. Gajdusek D.C., Gibbs C.J., Alpers M. (1966). Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209, 794-796.
36. Garnier J., Gibrat J.F., Robson B. (1996). GOR secondary structure prediction method version IV. *Methods in Enzymology* 266, 540-553.
37. Gasparini L., Netzer W.J., Greengard P., Xu H. (2002). Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends in Pharmacological Sciences* 23, 288-293.
38. Geourjon C., Deleage G. (1994). SOPM : a self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng.* 7, 157-164.
39. Giasson B.I., Murray I.V., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha- synuclein is essential for filament assembly. *J.Biol.Chem.* 276, 2380-2386.
40. Glenner G.G., Harbaugh J., Ohms J.I., Harada M., Cuatrecasas P. (1970). An amyloid protein: the amino-terminal variable fragment of an immunoglobulin light chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1287-1289.
41. Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruyschaert J.M. (1990). Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflexion Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films. *Eur. J. Biochem. / FEBS* 193, 409-420.
42. Grateau. G. (2000). Physiopathologie des amyloses. *Rev. Rhum.* 67, 189-196.
43. Guerneur Y. (1997). Combinaison de classifieurs statistiques, application à la prédiction de structure secondaire des protéines. PhD Thesis.
44. Harper J.D., Lansbury P.T. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie : Mechanistic Truths and Physiological Consequences of the Time-Dependent Solubility of Amyloid Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 385-407.

45. Harrison P.M., Bamorough P., Daggett V., Prusiner S.B., Cohen F.E. (1997). The prion folding problem. *Current Opinion in Structural Biology*. 7, 53-59.
46. Horth M., Lambrecht B., Khim M.C.L., Bex F., Thiriart C., Ruyschaert J.M., Burny A., Brasseur R. (1991). Theoretical and functional analysis of the SIV fusion peptide. *EMBO J*. 10, 2747-2755.
47. Huang Z., Prusiner S.B., Cohen F.E. (1995). Scrapie prions : a three-dimensional model of an infectious fragment. *Folding & Design* 1, 13-19.
48. Hughes S.R., Goyal S., Sun J.E., Gonzalez-DeWhitt P., Fortes M., Riedel N.G., Sahasrabudhe S.R. (1996). Two-hybrid system as a model to study the interaction of beta-amyloid peptide monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2065-2070.
49. Jähnig F. (1990). Structure predictions of membrane proteins are not that bad. *Trends Biochem. Sc.* 15, 93-95.
50. Jarrett J.T., Berger E.P., Lansbury P.T. (1993). The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.* 695, 144-148.
51. Jaskólski M. (2001). 3D domain swapping, protein oligomerization, and amyloid formation. *Acta Biochim.Pol.* 48, 807-827.
52. Jenkins J., Pickersgill R. (2001). The architecture of parallel beta-helices and related folds. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 77, 111-175.
53. Kabsch W., Sander C. (1984). On the use of sequence homologies to predict protein structure: identical pentapeptides can have completely different conformations. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1075-1078.
54. Kawahara M., Kuroda Y. (2000). Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's β -amyloid protein : Channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Research Bulletin* 53, 389-397.
55. Kelly J.W. (1996). Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Current Opinion in Structural Biology*. 6, 11-17.
56. Kelly J.W. (1998). The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Current Opinion in Structural Biology* 8, 101-106.
57. Lansbury P.T.J., Costa J.M., Griffiths E.J., Simon E.J., Auger M., Halverson K.J., Kocisko D.A., Hensch Z.S., Ashburn T.T., Spencer R.G. (1995). Structural model for the beta-amyloid fibril based on interstrand alignment of an antiparallel-sheet comprising a C-terminal peptide. *Nat. Struct. Biol.* 2, 990-998.
58. Lee H.J., Choi C., Lee S.J. (2002). Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J.Biol.Chem.* 277, 671-678.

59. Levin J.M., Robson B., Garnier J. (1996). An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity. *FEBS Lett.* 205, 303-308.
60. Lins L., Flore C., Chapelle L., Talmud P.J., Thomas A., Brasseur R. (2002). Lipid-interacting properties of the N-terminal domain of human apolipoprotein C-III, *Protein Eng.* 15, 513-520.
61. Mager P.P., Penke B., Walter R., Harkany T., Härtig W. (2002). Pathological Peptide Folding in Alzheimer's Disease and Other Conformational Disorders. *Current Medicinal Chemistry* 9, 1763-1780.
62. Martin I., Defrise-Quertain F., Mandieau V., Nielsen N.M., Saermark T., Burny A., Brasseur R., Ruyschaert J.M., Vandenbranden M. (1991). Fusogenic activity of SIV (simian immunodeficiency virus) peptides located in the GP32 NH2 terminal domain, *Biochem. Biophys. Res. Co.* 175, 872-879.
63. Martin I., Dubois M.C., Defrise-Quertain F., Saermark T., Burny A., Brasseur R., Ruyschaert J.M. (1994). Correlation between fusogenicity of synthetic modified peptides corresponding to the NH2-terminal extremity of simian immunodeficiency virus gp32 and their mode of insertion into the lipid bilayer: an infrared spectroscopy study. *J. Vir.* 68, 1139-1148.
64. Masters C.L. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and down syndrome. *PNAS* 82, 4245-4249.
65. McLean P.J., Kawamata H., Ribich S., Hyman B.T. (2000). Membrane association and protein conformation of alpha-synuclein in intact neurons. Effect of Parkinson's disease-linked mutations. *J.Biol.Chem.* 275, 8812-8816.
66. Nguyen J., Baldwin M.A., Cohen F.E., Prusiner S.B. (1995). Prion protein peptides induce α -helix to β -sheet conformational transitions. *Biochemistry* 34, 4186-4192.
67. Nickmans A. (1999). Etude structurale de la famille des protéines prion. Travail de fin d'étude réalisé à la *Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux* 78p.
68. Peelman F., Goethals M., Vanloo B., Talussot C., Brasseur R., Vandekerckhove J., Rosseneu M. (1997). Structural and functional properties of the 154-171 wild-type and variant peptides of human lecithin-cholesterol acyltransferase. *Eur. J. Biochem.* 249, 708-715.
69. Pérez-Méndez O., Vanloo B., Decout A., Goethals M., Peelman F., Vandekerckhove J., Brasseur R., Rosseneu M. (1998). Contribution of the hydrophobicity gradient of an amphipathic peptide to its mode of association with lipids. *Eur. J. Biochem.* 256, 570-579.
70. Perutz M.F., Finch J.T., Berriman J., Lesk A. (2002). Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *PNAS* 99, 5591-5595.

71. Petkova A.T., Ishii Y., Balbach J.J., Antzutkin O.N., Leapman R.D., Delaglio F., Tycko R. (2002). A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *PNAS* 99, 16742-16747.
72. Peuvot J., Schanck A., Lins L., Brasseur R. (1999). Are the fusion processes involved in birth, life and death of the cell depending on tilted insertion of peptides into membranes ? *J. Theor. Biol.* 198, 173-181.
73. Pillot T., Goethals M., Vanloo B., Talussot C., Brasseur R., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Lins L. (1996). Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* 271, 28757-28765.
74. Pillot T., Lins L., Goethals M., Vanloo B., Baert J., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Brasseur R. (1997). The 118-135 peptide of the human prion protein forms amyloid fibrils and induces liposome fusion. *J. Mol. Biol.* 274, 381-393.
75. Polak E. (1971). Computational methods in Optimization (New York: Academic Press), § 2.3.
76. Prusiner S.B. (1994). Inherited prion diseases. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4611-4614.
77. Prusiner S.B. (1996). Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. *TIBS.* 21, 482-487.
78. Prusiner S.B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 13363-13383.
79. Rahman M., Brasseur R. (1994). WinMGM : a fast CPK molecular graphicsprogram for analyzing molecular structure. *J. Mol. Graphics* 12, 212-218.
80. Rahman M., Lins L, Thomas-Soumarmon A., Brasseur R. (1997). Are amphipatic asymmetric peptides ubiquitous structures for membrane destabilisation. *J. Mol. Model.* 3, 203-215. *E*
81. Riek R., Hornemann S., Wider G., Billeter M., Glockshuber R, Wuthrich K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* 382, 180-182.
82. Rost B., Sander C. (1994). Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* 232, 584-599.
83. Schanck A., Brasseur R., Peuvot J. (1998). Destabilization of a model membrane by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779-815.
84. Selkoe D.J. (1997). Alzheimer's Disease : Genotypes, Phenotype, and Treatments. *Science* 275, 630-631.
85. Shirahama T., Cohen A.S. (1967). High resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *J. Cell. Biol.* 33, 679-708.
86. Sipe J.D., Cohen A.S. (2000). Review : History of the Amyloid Fibril. *Journal of structural Biology* 130, 88-98.

87. Sisodia S.S., Price D.L. (1995). Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *FASEB* 9,366-370.
88. Talmud P., Lins L., Brasseur R. (1996). Prediction of signal peptide functional properties : a study of the orientation and angle insertion of yeast invertase mutants and human apolipoprotein B signal peptide variants. *Protein Eng.* 9, 317-321. *D*
89. Tanford C. (1973). The hydrophobic effect : formation of micelles and biological membranes. *New York : Wiley.*
90. Telling G.C., Scott M., Mastrianni J., Gabizon R., Torchia M., Cohen F.E., DeArmond S.J., Prusiner S.B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimaeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79-90.
91. Turnbull S., Tabner B.J., El-Agnaf O.M.A., Moore S., Davies Y., Allsop D. (2001). *Free Radicals Biol. Med.* 30, 1163-1170.
92. Uéda K., Fukushima H., Masliah E., Xia Y., Iwai A., Yoshimoto M., Otero D.A., Kondo J., Ihara Y., Saitoh T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11282-11286.
93. Vonèche V., Portetelle D., Kettman R., Willems L., Limbach K., Paoletti E., Ruyschaert J.M., Burny A., Brasseur R. (1992). Fusogenic segment of bovine leucemia virus and simian immunodeficiency virus are interchangeable and mediate fusion by means of oblique insertion in the lipid bilayer of their target cells. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3810-3814. *A*
94. Wetzel. R. (2002). Ideas of order for amyloid fibril structure. *Structure* 10, 1031-1036.
95. Wille H., Michelitsch M.D., Guénebaut V., Supattapone S., Serban A., Cohen F.E., Agard D.A., Prusiner S.B. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3563-3568.
96. Zahn R., Liu A., Lührs T., Riek R., Von Schroetter C., López García F., Billeter M., Calzolari L., Wider G., Wüthrich K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 145-150.
97. Zerovnik E. (2002). Amyloid-fibril formation. Proposed mechanisms and relevance to conformational disease. *Eur.J.Biochem.* 269, 3362-3371.

VIII. Annexes

Acides aminés	Code trois lettres	Code une lettre
Glycine	GLY	G
Alanine	ALA	A
Valine	VAL	V
Phénylalanine	PHE	F
Proline	PRO	P
Méthionine	MET	M
Isoleucine	ILE	I
Leucine	LEU	L
Aspartate	ASP	D
Glutamate	GLU	E
Lysine	LYS	K
Arginine	ARG	R
Sérine	SER	S
Thréonine	THR	T
Tyrosine	TYR	Y
Histidine	HIS	H
Cystéine	CYS	C
Asparagine	ASN	N
Glutamine	GLN	Q
Tryptophane	TRP	W

Annexe 1 : Correspondance entre les acides aminés et leur code trois lettres et une lettre

Hydrophobic Cluster Analysis

human $\alpha 1$ antitrypsin

1D 227...GNATA **IFFL**PDEGK**LQHL**ENE**L**THD **IITK****FL**ENEDRR...263
 ...◆NA□A**IFFL**★DE◆K**LQHL**ENE**L**□HD**II**□K**FL**ENEDRR...
 ...00000**1111**00000**1001**000**10001**000**11001**1000000...

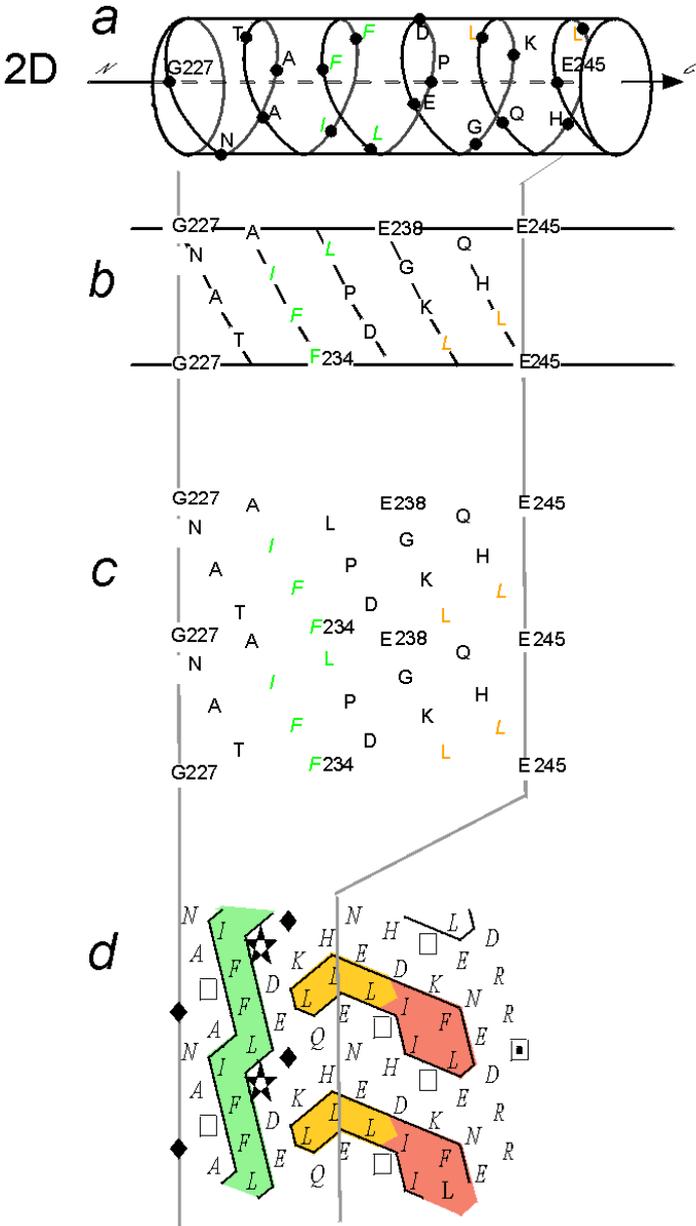


Figure III.1. : Schéma explicatif de la méthode HCA. Dans cette représentation, la proline est représentée par une étoile, la glycine par un losange, la thréonine par un carré et la sérine par un carré pointé. Les zones entourées et colorées correspondent aux amas hydrophobes.

La figure III.1. est disponible à partir du site internet :

http://www.lmcp.jussieu.fr/~callebau/hca_method.html

acides aminés	hydrophobicité
cystéine	0,29
sérine	-0,18
thréonine	-0,05
proline	0,12
alanine	0,62
glycine	0,48
asparagine	-0,78
aspartate	-0,90
glutamate	-0,74
glutamine	-0,85
histidine	-0,40
arginine	-2,50
lysine	-1,50
méthionine	0,64
isoleucine	1,40
leucine	1,10
valine	1,10
phénylalanine	1,20
tyrosine	0,26
tryptophane	0,81

Table III.1. : Echelle d'hydrophobicité consensus d'Eisenberg (Eisenberg D. *et al.*, 1982)

Protéine	Maladies
Le précurseur du peptide β-amyloid	Maladie d'Alzheimer
La protéine Prion	Kuru Maladie de Creutzfeldt-Jakob Maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker Insomnie fatale familiale Scarpie Encéphalopathie spongiforme bovine
L'α-synucléine	Maladie de Parkinson Variante à corps de Lewy de la maladie d'Alzheimer Démence avec corps de Lewy Maladie d'Hallervorden-Spatz
L'insuline (porcine)¹	Amyloïdose localisée due à des injections
La myoglobine	Aucune maladie associée
La chaîne α du fibrinogen A	Amyloïdose rénale héréditaire
La cystatine C	Hémorragie cérébrale de type islandais
L'islet amyloid polypeptide	Diabète de type II
La prolactine	Fibrilles amyloïdes dans les glandes pituitary
Le serum amyloid A	Amyloïdose secondaire systémique
L'integral membrane protein 2B	Démence héréditaire danoise Démence héréditaire britannique

La fish antifreeze protein¹	Aucune maladie associée
La phosphatidyl inositol 3 kinase¹	Aucune maladie associée
La bacterial cold shock protein¹	Aucune maladie associée
Les chaînes légères d'immunoglobuline	Amyloïdose systémique primaire
Les chaînes lourdes d'immunoglobuline	?
La β-2-microglobuline	Amyloïdose liée à l'hémodialyse Associée à l'insuffisance rénale chronique terminale
L'huntingtine	Maladie d'Huntington
L'ataxie 1	Ataxie spinocerebellar (SCA) de type 1
La transthyretine	Familial amyloid polyneuropathy I Amyloïdose systémique sénile
L'apolipoprotéine A-I	Familial amyloid polyneuropathy III Amyloïdose systémique non-neuropathique
La protéine tau	Maladie d'Alzheimer Maladie de Pick Démence frontotemporale
L'atrial natriuretic factor	Amylose auriculaire isolée
La Calcitonine	Cancer médullaire de la thyroïde
La gelsoline	Amyloïdose héréditaire systémique finlandaise
La lactadherine	Dépôts amyloïdes dans le média aortique
Le lysozyme	Amyloïdose héréditaire systémique non-neuropathique
La muscle acylphosphatase	Aucune maladie associée
L'IgG-binding protein G¹	Aucune maladie associée
La protéine Ure2¹	Aucune maladie associée
La protéine Sup35¹	Aucune maladie associée
La lactoferrine	Amyloïdose cornéenne
La kératoépithéline	
Le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)	
La lung surfactant protein C	

1: protéine non humaines