

Communauté française de Belgique

FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES
AGRONOMIQUES DE GEMBLoux

Etude expérimentale du peptide oblique de l' α -synucléine

Année académique 2003-2004

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 diplôme
d'études approfondies en sciences
agronomiques et ingénierie biologique**

© 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

L'étude des protéines amyloïdogéniques représente un intérêt fondamental car ces protéines subissent une transconformation et une agrégation qui sont étroitement liées à l'apparition de maladies incurables telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou de Creutzfeldt-Jakob. De plus, ces phénomènes ne sont pas encore complètement expliqués tant au niveau énergétique que structurel. Ces protéines, dans leur conformation amyloïdogénique, ont tendance à s'agréger rapidement en solution pour former des fibrilles insolubles et résistantes à la protéolyse.

Récemment, des peptides obliques ont été mis en évidence dans deux protéines amyloïdogéniques responsables de maladies neurodégénératives. Il s'agit du peptide β amyloïde, qui cause la maladie d'Alzheimer, et de la protéine PrP, agent de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Les peptides obliques sont de courts fragments protéiques de 11 à 18 acides aminés qui sont capables de s'insérer obliquement dans les membranes biologiques et de les déstabiliser. En conformation hélicoïdale, les peptides obliques possèdent un gradient d'hydrophobicité le long de leur axe, ce qui permet d'expliquer leur insertion oblique.

Par la suite, des peptides obliques ont été recherchés parmi d'autres protéines amyloïdogéniques. Sur un ensemble de 27 protéines amyloïdogéniques, cinq peptides obliques appartenant à quatre protéines différentes ont pu être mis en évidence par modélisation moléculaire. Les peptides obliques pourraient être impliqués dans l'effet neurotoxique de ces protéines. En affectant directement la membrane cellulaire des neurones grâce à leur propriété déstabilisatrice, ils conduiraient à la mort cellulaire. D'autre part, les peptides obliques pourraient aussi être impliqués dans le processus de transconformation des ces protéines.

Le but de ce travail est de caractériser expérimentalement le peptide oblique détecté par modélisation moléculaire au sein de la séquence de l' α -synucléine, protéine impliquée dans la maladie de Parkinson. Celui-ci sera testé expérimentalement quant à ses capacités fusogènes vis-à-vis des liposomes et sa conformation sera étudiée par spectroscopie infrarouge. Les résultats montrent que le peptide de l' α -synucléine induit la fusion de phase lipidique et la perméabilisation de liposomes, ce qui indique son caractère déstabilisateur.

Abstract

The study of amyloidogenic proteins is of great interest in biochemistry because these proteins undergo a conformational change and an aggregation, that are largely implicated in several incurable diseases including Alzheimer's, Parkinson's or Creutzfeldt-Jakob's disease. In addition, these phenomena are not completely understood, either structurally or energetically. These proteins, in their amyloidogenic conformation, aggregate rapidly in solution and form fibrils that are insoluble and resistant to proteolysis.

Recently, tilted peptides were detected in two of the amyloidogenic proteins involved in neurodegenerative diseases; the amyloid β peptide responsible for Alzheimer's disease, and the PrP protein that causes Creutzfeldt-Jakob's disease. Tilted peptides are short protein fragments (11 to 18 residues) that adopt a tilted orientation when inserted into biological membranes, which they are able to destabilise. When helical, tilted peptides present an asymmetric hydrophobicity gradient responsible for their oblique insertion.

Tilted peptides have also been detected in some other amyloidogenic proteins. In a set of 27 amyloidogenic proteins, five tilted peptides from four different proteins have been shown up by molecular modelling. Tilted peptides could be responsible for the neurotoxic effect of these proteins. Thanks to their fusogenic properties, they could interact directly with the membrane leading to cell death. Tilted peptides could also be involved in the tranconformational process of these proteins.

The aim of this study was to characterise experimentally the tilted peptide detected by molecular modelling in the α -synuclein sequence, responsible for Parkinson's disease. This peptide is tested experimentally to highlight its lipid destabilising properties. Its conformation is studied by IR spectroscopy. The fusogenic assays point to its destabilizing properties.

Table des matières :

I. Introduction.....	1
I.1. Les protéines amyloïdogéniques et les fibrilles amyloïdes.....	1
I.1.1. Les fibrilles amyloïdes.....	2
I.1.2. Problématiques de l'étude des protéines amyloïdogéniques.....	4
I.1.3. Description structurale des fibrilles.....	5
I.1.4. La cinétique de formation des fibrilles.....	7
I.1.5. Le phénomène de transconformation.....	10
I.2. L'α-synucléine.....	11
I.2.1. Pathogénicité associée à l'α-synucléine.....	11
I.2.2. Structure de l'α-synucléine.....	12
I.2.3. Cinétique de formation des fibrilles.....	13
I.2.4. Mise en évidence d'un peptide amyloïdogénique.....	14
I.3. Les peptides obliques.....	16
I.3.1. Propriétés des peptides obliques.....	16
I.3.2. Importance biologique des peptides obliques.....	18
I.3.3. Les peptides obliques et les protéines amyloïdogéniques.....	19
II. But du travail.....	21
III. Matériel et méthodes.....	22
III.1. Matériel.....	22
III.2. Méthodes.....	23
III.2.1. Préparation des liposomes.....	23
a) Les liposomes multilamellaires (MLV).....	23
b) Les liposomes unilamellaires de grande taille (LUV).....	24
c) Les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV).....	24
III.2.2. Détermination de la concentration en phospholipides.....	24
III.2.3. Mesures de fusion de phase lipidique.....	25

III.2.4.	Mesures de perméabilité lipidique.....	26
III.2.5.	Mesures de spectroscopie infra-rouge FTIR.....	27
	a) Préparation de la plaque.....	27
	b) Détermination de la structure secondaire du peptide.....	28
IV.	Résultats.....	29
IV.1.	Mesures de fusion de phase lipidique.....	29
IV.1.1.	RB69.....	30
IV.1.1.1.	LUV non chargés.....	30
IV.1.1.2.	LUV chargés.....	31
IV.1.1.3.	SUV chargés.....	32
IV.1.1.4.	SUV non chargés.....	33
IV.1.1.5.	Récapitulatif.....	33
IV.1.2.	RB83.....	34
IV.1.2.1.	LUV chargés.....	34
IV.1.2.2.	LUV non chargés.....	35
IV.1.2.3.	SUV chargés.....	36
IV.1.2.4.	SUV non chargés.....	37
IV.1.2.5.	Récapitulatif.....	38
IV.1.3.	SM1466-1a.....	39
IV.2.	Mesures de perméabilité.....	40
IV.2.1.	RB69.....	41
IV.2.2.	RB83.....	42
IV.3.	Mesures infrarouge.....	43
V.	Discussion et conclusion	44
VI.	Perspectives.....	47
VII.	Bibliographie.....	48

Introduction

I. Introduction

I.1. Les protéines amyloïdogéniques et les fibrilles amyloïdes

Les protéines caractérisées par l'adjectif "amyloïdogénique" correspondent aux protéines capables, dans des conditions appropriées, de former des structures protéiques particulières appelées fibrilles amyloïdes. Les propriétés de ces dernières seront développées ci-dessous. Le nombre de protéines amyloïdogéniques connues ne cesse de s'accroître. La fibrillation de ces protéines implique un phénomène de transconformation, qui consiste généralement en une augmentation de leur contenu en structure β . La présence de fibrilles était initialement associée à une pathogénicité. En effet, les fibrilles forment des agrégats sous forme de plaques amyloïdes extracellulaires, d'enchevêtrements neuro-fibrillaires ou autres inclusions intracytoplasmiques ou intranucléaires impliqués dans des maladies telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou de Creutzfeldt-Jakob. Aujourd'hui, un certain nombre de protéines sont dites amyloïdogéniques car leur fibrillation a pu être observée *in vitro* ou parce qu'elles forment des fibrilles *in vivo* qui assument une fonction biologique.

Le terme 'amyloïde' fut associé à ces fibrilles en 1854 lorsque Rudolph Virchow découvrit que les dépôts formés par celles-ci présentaient une réaction positive à la coloration à l'iode. Il en conclut que ces dépôts étaient formés de cellulose et leur associa le terme "amyloïde". Cependant, Friedreich et Kekule démontrèrent en 1859 que les dépôts amyloïdes étaient principalement formés de protéines (Sipe J.D. *et al.*, 2000). Il fallut ensuite attendre 1970 pour que Glenner G.G. et ses collègues identifient une protéine constitutive de dépôts amyloïdes. Il s'agissait de chaînes légères d'immunoglobuline (Glenner G.G. *et al.*, 1970). Les protéines qui forment les dépôts amyloïdes correspondent à des protéines naturellement produites par l'organisme et assumant un rôle physiologique. Actuellement, une quarantaine de protéines amyloïdogéniques sont connues et étudiées dans la littérature (Tableau I.1.).

Protéine	Maladies
Le précurseur du peptide β -amyloïde	Maladie d'Alzheimer
La protéine PrP	Kuru
	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
	Maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
	Insomnie fatale familiale
	Scrapie
	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)	Amyloïdose localisée due à des injections
La myoglobine	
La chaîne α du fibrinogène 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 protein	
La phosphatidyl inositol 3 kinase	
La bacterial cold shock protein	
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'ataxine 1	Ataxie spinocerebellar (SCA) de type 1
La transthyretine	Polyneuropathie amyloïde familiale de type I Amyloïdose systémique sénile
L'apolipoprotéine A-I	Polyneuropathie amyloïde familiale de type 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	
L'IgG-binding protein G	
La protéine Ure2	
La protéine Sup35	
La lactoferrine	Amyloïdose cornéenne

Tableau I.1. : Protéines associées à des dépôts amyloïdes (Crowet J.M., 2003)

I.1.1. Les fibrilles amyloïdes

Les dépôts amyloïdes possèdent plusieurs propriétés qui permettent de les caractériser. En 1927, Divry et Florkin ont pu montrer que, sous une lumière polarisée, les dépôts amyloïdes colorés au rouge Congo possèdent une biréfringence vert pomme caractéristique (Divry P. *et al.*, 1927). Une autre coloration est fréquemment utilisée pour la caractérisation

des fibrilles amyloïdes. Il s'agit de l'augmentation de fluorescence observée lorsque la Thioflavin T se lie aux fibrilles. En ce qui concerne la taille des fibrilles, Cohen et ses collègues ont pu montrer, par microscopie électronique en 1959, 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). Les études de microscopie de force atomique ont ensuite permis de distinguer plusieurs espèces fibrillaires : les protofilaments, qui s'enroulent les uns autour des autres pour former des protofibrilles ; ces dernières s'enroulent les unes autour des autres pour former des fibrilles (Figure I.2.) (Khurana R. *et al.*, 2003).

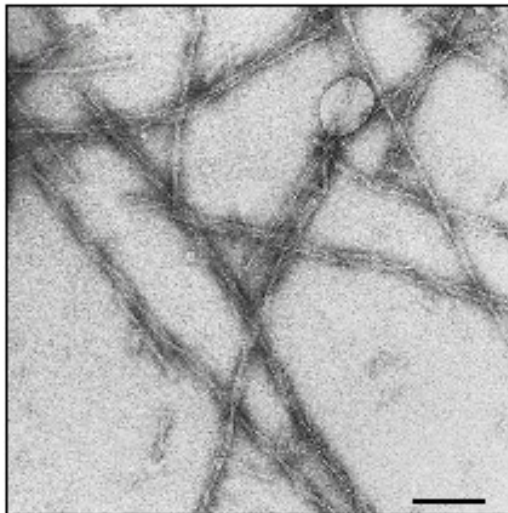


Figure I.1. : Fibrilles vues par microscopie électronique (Dobson C.M., 1999)

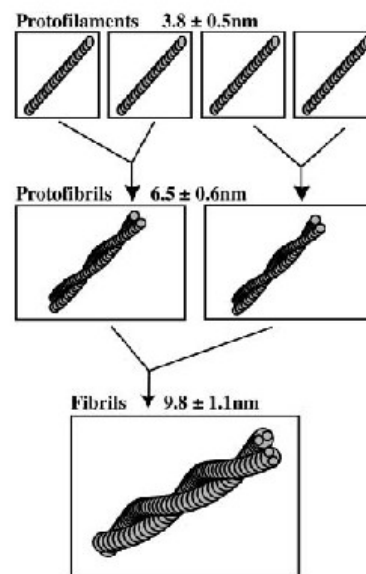


Figure I.2. : Schéma montrant l'organisation générale des fibrilles (Khurana R. *et al.*, 2003)

En plus des protéines qui composent les fibrilles des dépôts amyloïdes *in vivo*, d'autres composants peuvent être trouvés. Il s'agit entre autres de la protéine amyloïde P du sérum (SAP), de l'héparane sulfate protéoglycane et de l'apolipoprotéine E. Toutefois, ces derniers ne sont pas indispensables à la formation des fibrilles car celles-ci peuvent se former *in vitro* en leur absence. De plus, les fibrilles, qu'elles soient formées *in vivo* ou *in vitro*, sont considérées comme identiques car elles possèdent des propriétés similaires (Sipe J.D. *et al.*, 2000).

I.1.2. Problématiques de l'étude des protéines amyloïdogéniques

L'étude des protéines amyloïdogéniques représente un intérêt fondamental à différents points de vue. Tout d'abord, ces protéines subissent une transconformation et une agrégation qui sont étroitement liées à l'apparition de maladies incurables telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou de Creutzfeldt-Jakob. Ensuite, ces phénomènes ne sont pas encore complètement expliqués tant au niveau énergétique que structurel (Žerovnik E., 2002). Ces protéines, dans leur conformation amyloïdogénique, 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 (Fändrich M. *et al.*, 2001). Ceux-ci suggèrent également qu'au cours de l'évolution, les séquences ou les acides aminés qui favorisent le processus de fibrillation ont été évités (Dobson C.M., 1999).

Paradoxalement, la formation de fibrilles amyloïdes pourrait être une voie biologique sélectionnée par l'évolution pour générer des structures quaternaires ayant une fonction biologique (Kelly J.W. and Blach W.E., 2003). Plusieurs articles récents permettent d'étayer cette thèse, il s'agit entre autre de l'article de Berson J.F. *et al.* qui porte sur la fibrillation de la glycoprotéine Pmel17 dans les mélanosomes (Berson J.F. *et al.*, 2003) et de l'article de Chapman M.R. *et al.* qui porte sur la formation de fibres extracellulaires, appelées Curlis, par *E. coli* et *Salmonella* (Chapman M.R. *et al.*, 2002). Les Curlis sont impliqués dans la colonisation de surface inerte par ces organismes. Le mélanosome, quant à lui, est une

sous-unité cellulaire des mélanocytes dans laquelle est synthétisée et stockée la mélanine, qui est responsable de la pigmentation de la peau. Suite au clivage de Pmel17 par une protéase, le fragment généré va former des fibrilles dont le rôle est de séquestrer et de concentrer la mélanine dans le mélanosome.

Une autre problématique associée à l'étude de ces protéines porte sur l'identification de la ou des espèces amyloïdogéniques qui sont toxiques. Initialement, les dépôts amyloïdes étaient considérés comme l'agent responsable des pathogénicités observées. Cependant, plusieurs études récentes ont montré que les oligomères, qui précèdent la formation des fibrilles, sont neurotoxiques (Thirumalai D. *et al.*, 2003). Il est également intéressant de constater que les oligomères se formant lors des étapes précoces de l'agrégation de la phosphatidylinositol-3-kinase, qui n'est associée à aucune pathogénicité, peuvent être cytotoxiques (Bucciantini M. *et al.*, 2002). Dans le cas de A β , plusieurs études suggèrent que la neurotoxicité serait due à une interaction directe entre ce peptide et la membrane (Decout A. *et al.*, 1998). La mort neuronale serait due à la formation de pores dans la membrane (Kawahara M. *et al.*, 2000).

I.1.3. Description structurale des fibrilles

La structure des fibrilles amyloïdes n'est actuellement pas connue avec précision. Cependant, plusieurs modèles ont pu être proposés sur base de données expérimentales. Le modèle le plus répandu est le modèle des feuillets β organisés en hélice qui est présenté à la figure I.3. Celui-ci a été construit par Blake C. *et al.* à partir de l'étude par diffraction aux rayons X de fibrilles formées par un mutant de la transthyretine. Leurs résultats montraient que les fibrilles amyloïdes avaient une structure ordonnée, dans laquelle les chaînes polypeptidiques adoptent une conformation β perpendiculaire à l'axe d'élongation de la fibrille, avec les ponts hydrogènes interchaînes orientés presque parallèlement à l'axe d'élongation de la fibrille. Chaque brin forment un angle de 15° par rapport à ces voisins. Cette structure est aussi appelée "cross β " (Figure I.3.) (Blake C. *et al.*, 1996 ; Jaskólski M., 2001).

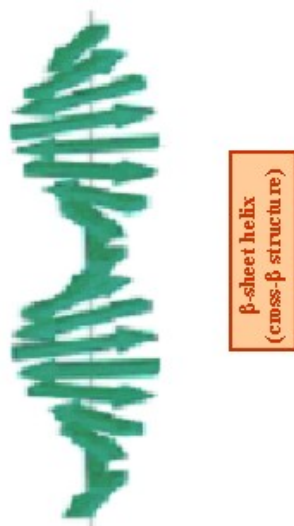
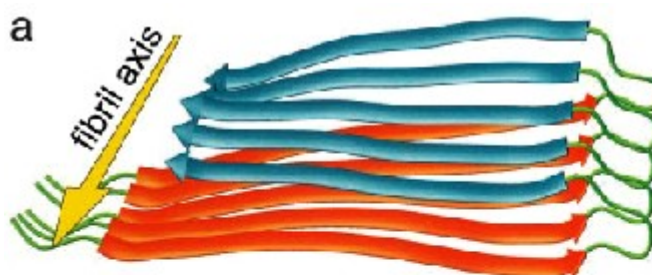


Figure I.3. : Représentation schématique d'une protofibrille par le modèle "cross β " (Jaskólski M., 2001)

En dehors de la structure générale des fibrilles obtenue par RX, peu de choses sont connues sur l'organisation de celles-ci. Par exemple, Selon Jaskólski, les brins β formeraient des feuillets β antiparallèles (Jaskólski M., 2001). Cependant, selon Jenkins, la diffraction aux rayons X ne peut déterminer si les brins β sont parallèles, antiparallèles ou les deux (Jenkins J. *et al.*, 2001). Toutefois, en ce qui concerne la conformation du peptide A β dans les fibrilles amyloïdes, les modèles moléculaires récents reposent sur une structure en feuillet β parallèle. Le modèle proposé par Petkova A.T. *et al.* en 2002 est présenté à la figure I.4. 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 protofilament, formerait les fibrilles en juxtaposant les faces hydrophobes de deux protofilaments (Petkova A.T. *et al.*, 2002).

Figure I.4. : Représentation schématique d'une protofibrille formée par le peptide A β . L'axe est indiqué par une flèche jaune, et les feuillets parallèles en rouge (résidus 12-24) et en bleu (résidus 30-40) (Petkova A.T. *et al.*, 2002).



Perutz M.F. *et al.* font part d'une autre organisation des protofilaments dans laquelle les brins β s'organiseraient de façon cylindrique pour former une hélice β (voir figure I.5.) (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.5. : 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.1.4. La cinétique de formation des fibrilles

La figure I.6. reprend les évènements potentiels se produisant au sein même de la protéine. Un dépliement local de la structure native (N) de la protéine, un repliement de la structure non repliée (U) ou la dissociation d'une protéine multimérique conduiraient à exposer des surfaces de la protéine susceptibles de s'autoassocier (1 à 4). Ensuite, il y aurait association de protéines dans cet état intermédiaire (I) (5), puis une réorganisation de la structure conduisant à une augmentation du contenu en structure β (6). Finalement, il y aurait formation de la structure "cross β " et polymérisation en fibrilles (7) (Johansson J., 2003).

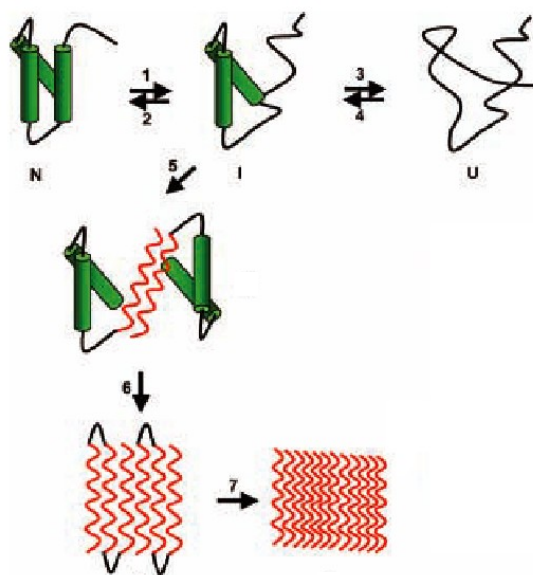


Figure I.6. : Représentation schématique de la fibrillogénèse (Johansson J., 2003)

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). Dans tous les cas, que les protéines soient naturellement structurées ou non, la fibrillogénèse requiert qu'un intermédiaire partiellement structuré soit formé pour être initiée (Rochet J.C. and Lansbury P.T., 2000). Il a été suggéré que cet intermédiaire soit partiellement hélicoïdal. Une étude détaillée de la fibrillation du peptide A β a montré que la formation des fibrilles devait inclure une population transitoire de structure en hélice α (Thirumalai D. *et al.*, 2003).

Différents facteurs déclenchant la fibrillation 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 transthyrétine, une diminution du pH déstabilise les tétramères et produit un monomère qui est l'intermédiaire amyloïdogénique (Kelly J.W., 1996). 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.

La formation des fibrilles dépend de la concentration en protéines aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* et les études cinétiques suggèrent un mécanisme de nucléation conduisant à la formation des fibrilles (Figure I.7.) (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 appelés protofilaments (Harper J.D. *et al.*, 1997). Ce protofilament est la structure la plus simple formée de monomères en feuillet β et insoluble.

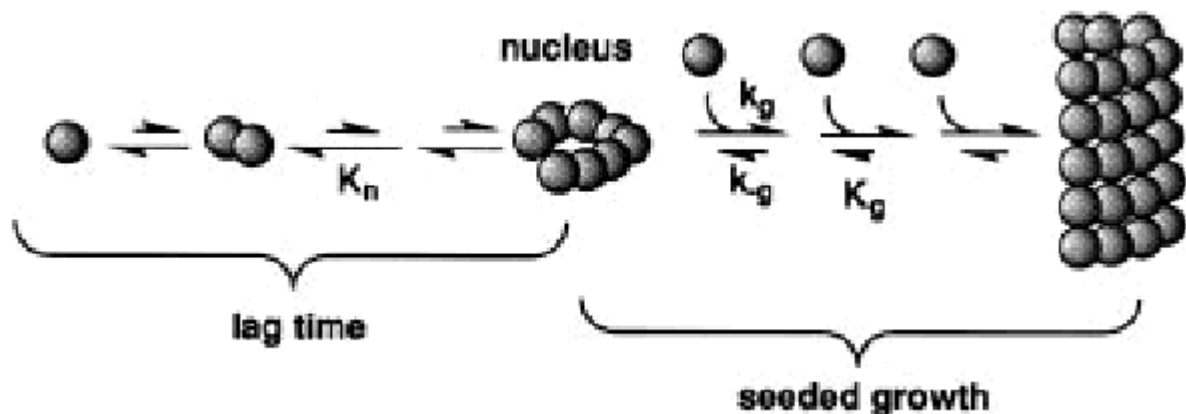


Figure I.7. : Schéma du mécanisme de nucléation-polymérisation. Pendant la phase de latence, une série d'associations protéine-protéine avec une constante d'équilibre défavorable (K_n) conduit à la formation d'un noyau. Ensuite, la phase de croissance se déroule. Dans celle-ci, l'association est favorisée (K_d) et conduit à la formation des fibrilles (Harper J.D. *et al.*, 1997).

Les études cinétiques de la fibrillogénèse menée par Ionescu-Zanetti C. *et al.*, et réalisée en utilisant l'AFM pour identifier les espèces impliquées dans le processus de fibrillation, ont permis de proposer le modèle HAM (Hierarchical Assembly Model). Celui-ci propose que les protofilaments formés par le mécanisme de nucléation-polymérisation interagissent avec d'autres pour former des protofibrilles formées de deux ou trois protofilaments enroulés les uns autour des autres. Deux protofibrilles s'enroulent alors pour former la fibrille mature. Les interactions hydrophobes et électrostatiques seraient principalement responsables de ces associations (Ionescu-Zanetti C. *et al.*, 1999 ; Khurana R. *et al.*, 2003).

I.1.5. 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 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.

L'étude de Kallberg Y. *et al.* montre que plusieurs protéines amyloïdogéniques présentent des hélices α dans des régions qui sont théoriquement prédites en brins β . Cela permet de prédire des régions potentiellement impliquées dans la fibrillation (Kallberg Y. *et al.*, 2001). Cette étude, avec celle de Dima R.I. and Thirumalai D., permet d'avancer l'hypothèse selon laquelle la présence d'éléments de structure secondaire (SSEs) présentant une incompatibilité avec la structure prédite pourrait signaler une fibrillation potentielle de cette protéine (Dima R.I. and Thirumalai D., 2002). Dans les protéines naturellement en feuillet β , l'agrégation est limitée par la présence de résidus chargés, qui provoquent une répulsion électrostatique entre brins β , et une minimisation de la présence des groupements capables de former de liaisons hydrogènes en surface (Thirumalai D. *et al.*, 2003). Au cours de l'évolution, les protéines ont donc été modifiées pour aboutir à une structure tridimensionnelle efficace mais également pour limiter le processus d'agrégation.

I.2. L'α-synucléine

L'α-synucléine est une petite protéine de 140 acides aminés de long, peu structurée en solution et dont la fonction n'est pas encore connue avec précision. Elle pourrait être impliquée dans la régulation du relargage de neurotransmetteurs et/ou contribuer à la plasticité synaptique. L'α-synucléine fait partie d'une famille de protéines qui comprend également la β- et la γ-synucléine. L'α-synucléine est principalement exprimée dans les neurones du système nerveux central et est concentrée dans le cytosol et les terminus nerveux présynaptiques des neurones. Une fraction de cette protéine est associée aux membranes des vésicules synaptiques (Uversky V.N. *et al.*, 2001).

I.2.1. Pathogénicité associée à l'α-synucléine

La présence de dépôts d'α-synucléine, sous sa forme agrégée, dans le cytoplasme de cellules neuronales ou gliales, est la caractéristique commune de plusieurs maladies neurodégénératives, dont la plus connue est la maladie de Parkinson. Cette dernière est la maladie neurodégénérative la plus courante après la maladie d'Alzheimer. Elle se caractérise au point de vue cellulaire par la perte de neurones dopaminergiques de la matière grise du cerveau, et la présence d'inclusions intraneurales appelées corps de Lewy et neurites de Lewy (Uversky V.N. *et al.*, 2001). Ces inclusions correspondent aux formes agrégées de l'α-synucléine. Du point de vue comportemental, cette maladie, qui n'est pas mortelle, se caractérise par un trouble progressif du mouvement qui peut entraîner des tremblements. Les autres maladies associées à l'α-synucléine sont la variante à corps de Lewy de la maladie d'Alzheimer, la maladie de Hallervorden-Spaatz, la "multiple system atrophy" et la démence avec corps de Lewy (Giasson B.I. *et al.*, 2001). Un fragment de 35 résidus de l'α-synucléine se retrouve également dans les plaques amyloïdes de la maladie d'Alzheimer, associé au peptide Aβ. Ce fragment correspond aux acides aminés 61 à 95 de l'α-synucléine et est appelé, dans ce contexte, NAC pour "Non Amyloid Component" (Ueda K. *et al.*, 1993).

Il existe deux mutations dans le gène de l'α-synucléine qui sont associées à des formes précoces et héréditaires de la maladie de Parkinson. C'est la présence de ces mutations qui a permis d'établir un lien entre l'α-synucléine et la maladie de Parkinson. Ces deux mutations correspondent à la substitution d'une alanine par une proline en position 30 (A30P) et d'une alanine par une thréonine en position 53 (A53T). Les molécules d'α-synucléine qui portent

ces mutations ont tendance à s'agréger plus rapidement que l' α -synucléine WT (Uversky V.N. *et al.*, 2001).

Il est probable que la perte de fonction biologique qui se produit suite à l'agrégation de l' α -synucléine ne soit pas responsable de la dégénérescence observée (Rajagopalan S. *et al.*, 2001). Il a été montré *in vitro* que les oligomères d' α -synucléine ont une plus grande affinité avec les liposomes que les monomères ou les fibrilles d' α -synucléine, et que sous cette forme cette protéine est capable de perméabiliser les liposomes (Lee H.J. *et al.*, 2002). Une autre voie pour la neurotoxicité pourrait être la libération de radicaux hydroxyyles par l' α -synucléine et le NAC lorsqu'ils sont incubés avec du Fer(II). Ce processus pourrait induire des dommages oxydatifs menant à la mort cellulaire observée dans la maladie de Parkinson. La β - et la γ -synucléine ne sont pas capables de libérer ces radicaux (Turnbull S. *et al.*, 2001).

I.2.2. Structure de l' α -synucléine

La séquence en acides aminés de l' α -synucléine est caractérisée par sept répétitions imparfaites de onze résidus dans le domaine N-terminal, et une région C-terminale comportant de nombreux de résidus acides (Figure I.8.) (Uversky V.N. *et al.*, 2001). Les séquences répétées de l' α -synucléine sont prédites en hélice α et peuvent s'associer à des vésicules lipidiques. Il a été montré qu'elles se lient préférentiellement à de petites vésicules unilamellaires comportant des phospholipides acides. La liaison semble être stabilisée par des interactions ioniques entre l' α -synucléine chargée positivement et les phospholipides chargés négativement (Davidson W.S. *et al.*, 1998). Les sept répétitions imparfaites des résidus KTKEGV se trouvant dans le domaine N-terminal de l' α -synucléine se retrouvent couramment dans le domaine des apolipoprotéines liant les lipides (Rajagopalan S. *et al.*, 2001).

L' α -synucléine est peu structurée lorsqu'elle se trouve en solution. Cependant, lorsqu'elle se trouve en présence de membranes et qu'elle se lie aux phospholipides, son contenu en hélice α augmente. Selon Davidson W.S. *et al.*, celui-ci passe de 3% à environ 80%. Les 98 résidus se trouvant du côté N-terminal adoptent une structure en hélice α alors que les 42 résidus se trouvant du côté C-terminal restent en configuration random-coil. (Davidson W.S. *et al.*, 1998)

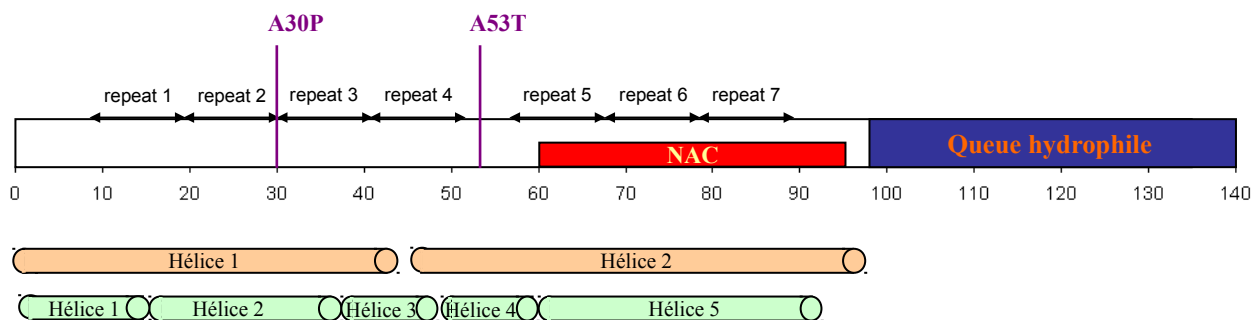


Figure I.8. : Représentation schématique des informations structurales sur l'α-synucléine

Les prédictions de structure réalisées par Davidson W.S. *et al.* à partir de la séquence de l'α-synucléine permettent d'identifier cinq hélices α amphipathiques potentielles (Figure I.8., cylindres oranges) (Davidson W.S. *et al.*, 1998). Cependant, Chandra S. *et al.* montrent, sur base de résultats expérimentaux, que la région N-terminale de l'α-synucléine est composée de deux hélices α, l'hélice 1-43 et l'hélice 46-98 (Figure I.8., cylindres verts). Ces hélices se formeraient seulement à l'interface protéine/liposome (Chandra S. *et al.*, 2003).

I.2.3. Cinétique de formation des fibrilles

Au point de vue cinétique, il a été montré que l'α-synucléine purifiée forme des fibrilles par un mécanisme de nucléation-polymérisation (Wood S.J. *et al.*, 1999) et que le processus de formation de fibrilles impliquerait un intermédiaire hélicoïdal. En effet, selon Lee H.J. *et al.*, l'α-synucléine liée aux membranes a une tendance plus importante à former des agrégats que l'α-synucléine cytosolique. Or, dans cet environnement, cette protéine adopte une structure hélicoïdale. De plus, ils suggèrent que les agrégats formés à la membrane agissent comme des noyaux qui accélèrent l'agrégation de l'α-synucléine cytosolique (Lee H.J. *et al.*, 2002).

Les effets des mutations de l'α-synucléine sur sa structure et sur la cinétique de formation des fibrilles ont également été étudiés. La mutation A30P désorganiserait localement la structure hélicoïdale de l'α-synucléine mais limiterait également la conversion en β, en raison de l'effet de la proline. La mutation A53T, par contre, aurait peu d'effet sur la structure. Ces deux mutations augmenteraient la vitesse d'oligomérisation de l'α-synucléine. Tandis que la mutation A30P diminuerait la vitesse de formation de fibrilles, la mutation A53T l'augmenterait (Bussel R. *et al.*, 2001).

Ce comportement va à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle ce sont les fibrilles qui sont responsables de la neurotoxicité. En effet, les mutations de l' α -synucléine induisent une forme précoce de la maladie. Or, celles-ci ont des comportements différents quant à la vitesse de fibrillation mais augmentent toutes les deux le taux d'oligomérisation. Donc, l'agent toxique doit se trouver sous forme oligomérique et non sous forme de fibrilles. Les mutations altéreraient les taux de transitions entre différents intermédiaires du processus de fibrillation. De cette façon, elles pourraient favoriser un intermédiaire oligomérique toxique sans nécessairement accélérer la formation des fibrilles (Bussel R. *et al.*, 2001).

I.2.4. Mise en évidence d'un peptide amyloïdogénique

Au sein de la famille des synucléines, l' α -synucléine possède des propriétés particulières qui pourraient expliquer pourquoi elle est capable de fibriller, alors que les autres n'en sont pas capables. Tout d'abord, selon le modèle de Chandra S. *et al.* concernant l'hélicité, l' α -synucléine possède une seconde hélice plus longue que celle de la β -synucléine. Ensuite, elle possède un domaine hydrophobe plus important que celui de la γ -synucléine (Chandra S. *et al.*, 2003). La différence entre l' α - et la β -synucléine provient de la délétion des résidus à 74-84 dans la séquence de la β -synucléine (George J.M., 2001). Sur base de cette différence, Giasson B.I. *et al.* avancent qu'un motif de douze acides aminés, correspondant aux résidus 71-82 du domaine hydrophobe de l' α -synucléine, est nécessaire et suffisant pour sa fibrillation. De plus, ils ajoutent que l'introduction d'un résidu chargé dans ce motif diminue le taux de polymérisation, qu'une délétion empêche la formation de polymères et enfin, que ce polypeptide peut polymériser seul et accentue la fibrillation de l' α -synucléine (Giasson B.I. *et al.*, 2001).

El-Agnaf *et al.* font part d'un autre peptide amyloïdogénique, le peptide 68-78. Celui-ci a été déterminé à partir d'une recherche systématique portant sur les propriétés d'agrégation et de toxicité de peptides de plus en plus petits issus du domaine NAC de l' α -synucléine. Ils désignent ce peptide comme étant le plus petit fragment possédant les propriétés d'agrégation et de toxicité. De plus, les résidus 61-82 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.9. (El-Agnaf O.M.A. *et al.*, 2002).

	110	130	130
PrP[A117V](106-130)	<u>K</u> T N M K H M A G A A <u>V</u> A <u>G</u> A V V <u>G</u> G L G G Y M L		
	1	10	20
NAC(1-22)	<u>E</u> Q Y T N Y G <u>G</u> A V V T <u>G</u> V T A V A Q K T V		
	20	30	40
Aβ(15-43)	<u>Q</u> <u>K</u> <u>L</u> V F F A E D Y G S N K <u>G</u> A I I <u>G</u> L M V G G V V I A T		
	10	20	30
IAPP(10-37)	<u>Q</u> R L A N F L V H S S N N F <u>G</u> A I L S S T N V G S N T Y		

Figure I.9. : Comparaison des séquences du NAC, du peptide Aβ, 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 (El-Agnaf O.M.A. *et al.*, 1998).

I.3. Les peptides obliques

Les peptides obliques sont de courts fragments protéiques de 11 à 18 acides aminés qui sont capables de s'insérer obliquement par rapport à une interface hydrophile/hydrophobe, telle une membrane biologique. Sous forme d'hélice α , les peptides obliques possèdent un gradient d'hydrophobicité le long de leur axe (Figure I.10.), ce qui permet d'expliquer leur insertion oblique (Brasseur R. *et al.*, 1990).

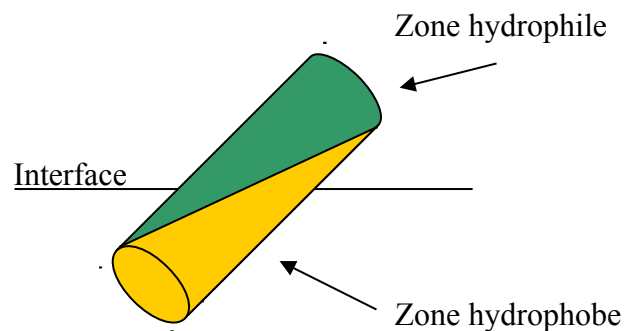


Figure I.10. : Représentation schématique d'un peptide oblique

Le premier peptide oblique fut mis en évidence par modélisation moléculaire en 1988 par l'équipe du professeur Brasseur. Ce peptide oblique correspond à la séquence 104-121 de la glycoprotéine d'enveloppe du virus NDV (Newcastle Disease Virus) (Brasseur R. *et al.*, 1988). Depuis, de nombreux peptides obliques ont été mis en évidence. En 2000, Bradshaw J.P. *et al.* ont pu déterminer l'orientation oblique du peptide de fusion du SIV (Simian Immunodeficiency Virus) dans une bicouche lipidique par diffraction de neutron (Bradshaw J.P. *et al.*, 2000). En 2001, Han X. *et al.* ont utilisé la RMN pour montrer que le domaine de fusion du virus influenza hemagglutinin adoptait une orientation oblique dans les conditions particulières qui entraîne le phénomène de fusion de ce virus (Han X. *et al.*, 2001).

I.3.1. Propriétés des peptides obliques

Les peptides obliques possèdent une distribution asymétrique des résidus hydrophiles et hydrophobes qui entraîne un gradient d'hydrophobicité le long de leur axe. En raison de ce gradient, l'angle d'insertion des peptides obliques dans les membranes se situe généralement entre 30° et 60° . Les peptides obliques se distinguent donc des hélices α transmembranaires (Figure I.11. a, c et d), qui s'orientent perpendiculairement à la bicouche, et des hélices α

amphipatiques (Figure I.11. b), qui s'orientent parallèlement à la bicouche (Figure I.11. e). Les peptides obliques possèdent généralement une hydrophobicité moyenne (calculée selon l'échelle d'hydrophobicité consensus d'Eisenberg (Eisenberg D. *et al.*, 1982)) comprise entre 0,2 et 0,9.

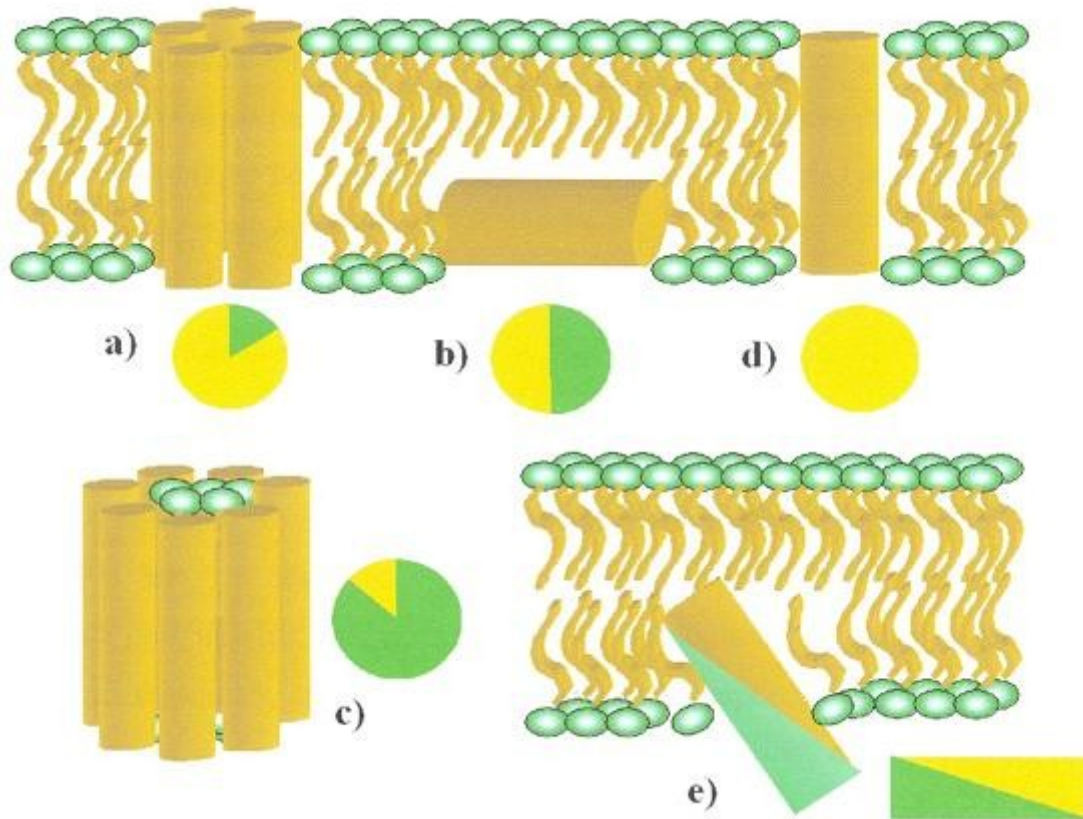


Figure I.11. : Orientation des hélices alpha dans les membranes. La couleur orange représente des zones hydrophobes et la couleur verte, des zones hydrophiles (Brasseur R., 1997).

De part leur insertion oblique, les peptides obliques sont capables de déstabiliser l'interface avec laquelle ils interagissent. D'autre part, le gradient d'hydrophobicité est crucial dans leur activité. Des études réalisées par mutagenèse dirigée ont montré que, si le gradient d'hydrophobicité est aboli, la capacité fusogène du peptide est perdue. Par contre, si ce gradient est restauré par d'autres mutations, le peptide retrouve sa capacité fusogène (Horth M. *et al.*, 1991 ; Vonèche V. *et al.*, 1992). L'activité déstabilisatrice des peptides obliques est maximale lorsque ceux-ci adoptent un angle compris entre 45° et 55° (Brasseur R., 2000).

Au point de vue de la conformation de ces peptides, des études réalisées en spectroscopie infrarouge et en dichroïsme circulaire suggèrent que les peptides obliques adoptent plutôt une conformation β ou random-coil 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

Des peptides obliques ont été mis en évidence dans différents types de protéines et semblent être impliqués dans divers processus biologiques. Des peptides obliques ont tout d'abord été trouvés dans des protéines de fusion virales, telles que les protéines de fusion du NDV, 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), du virus Ebola (Peuvot J., 1999), du virus Sendai (Brasseur R., 1991) et du virus de l'influenza. Dans ces protéines, les peptides obliques seraient impliqués dans les premières étapes de la fusion des membranes du virus et de la cellule hôte.

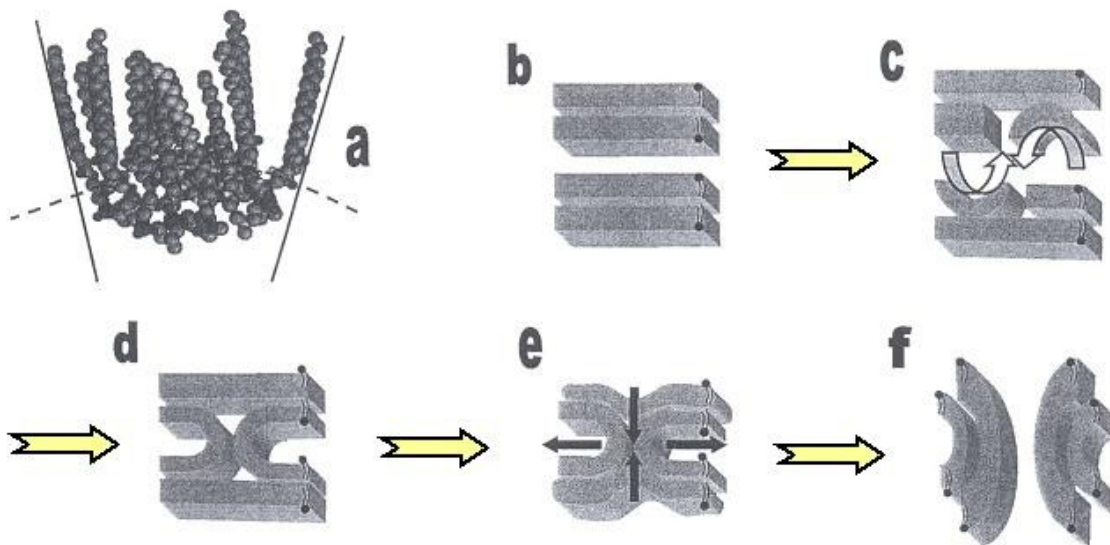


Figure I.12.: Représentation schématique de événements conduisant à la fusion de deux membranes par l'intermédiaire d'un peptide oblique (Brasseur R., 2000)

Lors de l'interaction avec la membrane de la cellule hôte, le peptide oblique s'insère obliquement dans les lipides. Cette insertion oblique perturbe le parallélisme des chaînes acylées des phospholipides et génère des structures de types micelle inverse (Figure I.12. a). Lorsque la membrane est courbée, un feuillet de chaque bicouche peut, par une rotation de 90° (Figure I.12. c), favoriser la formation d'une connexion semitoroïdale (Figure I.12. d).

Cette connection peut alors se propager radialement pour former l'intermédiaire d'hémifusion (Figure I.12. e). La tension sur cette bicouche conduit à sa rupture et à la formation du pore de fusion (Figure I.12. f) (Brasseur R., 2000).

Les peptides obliques pourraient intervenir dans d'autres processus biologiques. Ces peptides ont été trouvés dans la séquence signal de certaines protéines (Talmud P. *et al.*, 1996 ; Rahman M. *et al.*, 1997) et pourraient intervenir dans la sécrétion. Ils ont été remarqués dans des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides (Peelman F. *et al.*, 1997 ; Pérez-Méndez O. *et al.*, 1998 ; Lins L. *et al.*, 2001) et pourraient intervenir dans le transport de lipides ou la lipolyse. Ils ont également été trouvés dans des protéines neurotoxiques (voir ci-dessous) (Pillot T. *et al.*, 1996 ; Pillot T. *et al.*, 1997). Un peptide oblique pourrait même intervenir dans la fécondation (Schanck A. *et al.*, 1998). En effet, la fertiline possède un peptide oblique et est impliquée dans la fusion du spermatozoïde avec l'ovule.

I.3.3. Les peptides obliques et les protéines amyloïdogéniques

Des peptides obliques ont été mis en évidence dans deux protéines amyloïdogéniques responsables de maladies neurodégénératives très connues. Il s'agit du peptide β amyloïde, impliqué dans la maladie d'Alzheimer, et de la protéine PrP, qui cause la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Les peptides obliques de ces protéines correspondent au fragment C-terminal 29-42 (ou 29-40) du peptide A β (Pillot T. *et al.*, 1996) et au fragment 118-135 de la protéine PrP (Pillot T. *et al.*, 1997). Des peptides obliques ont ensuite été recherchés parmi les autres protéines amyloïdogéniques. Sur un ensemble de 27 protéines amyloïdogéniques étudiées, cinq peptides obliques appartenant à quatre protéines différentes ont pu être mis en évidence par modélisation moléculaire (Crowet J.M., 2003).

Les peptides obliques pourraient être impliqués dans l'effet neurotoxique de ces protéines. En affectant directement la membrane cellulaire des neurones grâce à leurs propriétés déstabilisatrices, ils conduiraient à la mort cellulaire (Figure I.13.). Expérimentalement, les peptides obliques de A β et de PrP sont capables d'induire de la fusion de liposomes. De plus, ceux-ci se retrouvent dans le domaine impliqué dans la transconformation et la pathogénicité de ces deux protéines.

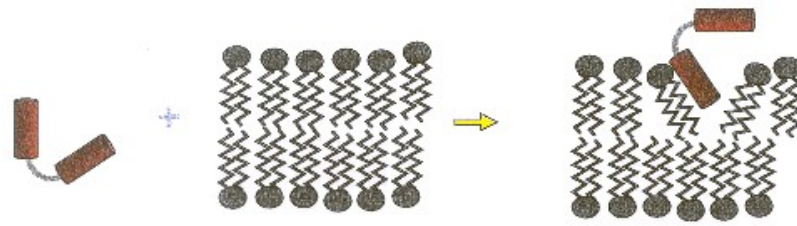


Figure I.13. : Interaction entre un peptide oblique (cylindre rouge) et la bicouche lipidique

D'autre part, les peptides obliques pourraient aussi être impliqués dans le processus de transconformation de ces protéines. Deux hypothèses ont été émises (Figure I.14.). Le peptide oblique pourrait 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.

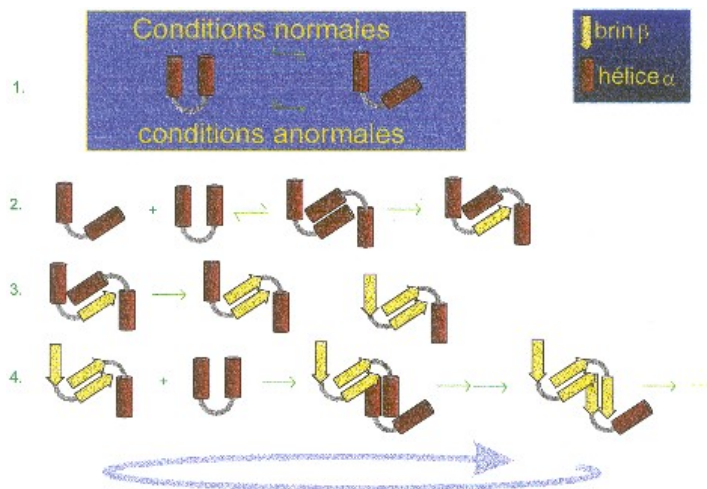


Figure I.14. : Schéma représentant la première des deux hypothèses émises au sujet des peptides obliques

But du travail

II. But du travail

Des peptides obliques ont pu être mis en évidence au sein de plusieurs protéines amyloïdogéniques. Cette présence suggère que ceux-ci pourraient jouer un rôle, d'une part, dans la toxicité associée à ces protéines et d'autre part, dans le processus de transconformation. Les peptides obliques pourraient intervenir dans la toxicité en interagissant directement avec la membrane cellulaire des neurones. Il a d'ailleurs été montré que les peptides obliques du peptide β amyloïde et de la protéine PrP possèdent des propriétés déstabilisatrices vis-à-vis des liposomes et, dans le cas de la protéine PrP, qu'elle possède un effet neurotoxique sur les neurones. Au point de vue du processus de transconformation, deux hypothèses ont été formulées. La première stipule que les peptides obliques pourraient s'insérer à l'interface hydrophile/hydrophobe d'une protéine, déstabilisant ainsi la conformation native de cette protéine et entraînant la modification structurelle de toute la protéine. Pour la seconde hypothèse, un peptide oblique pourrait passer d'une conformation hélicoïdale ou random-coil à une conformation β suite à des modifications de son environnement. Ce changement de conformation induirait la transconformation de toute la protéine.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une thèse de doctorat portant sur l'étude des peptides obliques se trouvant au sein de protéines amyloïdogéniques. Ces protéines sont tout d'abord analysées par modélisation moléculaire de façon à détecter des peptides obliques potentiels. Ceux-ci sont ensuite caractérisés par différentes méthodes expérimentales, comme réalisé pour les peptides obliques issus de PrP et A β .

Cinq peptides obliques ont été détectés dans un ensemble de 27 protéines. L'objectif de ce travail porte sur l'étude expérimentale des propriétés déstabilisatrices d'un de ces peptides, par des mesures de fluorescence, et de sa conformation, par spectroscopie infrarouge. Le peptide oblique étudié correspond au fragment 67-78 de l' α -synucléine. Cette protéine est impliquée dans la maladie de Parkinson et se retrouve dans les fibrilles amyloïdes formant les corps de Lewy. Ce peptide peut donc avoir soit un rôle dans la neurotoxicité observée, soit dans la transconformation de cette protéine.

Matériel et méthodes

III. Matériel et méthodes

III.1. Matériel

➤ 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-hydroxypyrene-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)

PhosphatidylInositol 4,5-diphosphate (PIP₂ ; Sigma, St Louis, MO, USA)

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)

Plusieurs lots du peptide oblique de l' α -synucléine (GGAVVTGVTAVA) ont été synthétisés, les lots RB69 et RB83 par V. Stroobant (Ludwig Institute, UCL, Belgique) et les SM1466-1a par la firme NeoSystem. Le lot SM1466-1a correspond au peptide oblique de l' α -synucléine auquel on a rajouté du côté N-terminal un PIP₂-Binding Peptide (YRTRLLHLKGKKHIRVH). Tous ces peptides sont protégés du côté N- et C-terminal.

III.2. Méthodes

III.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)
- 3) 30% PC, 30% PE, 2,5% PIP₂, 10% PS, 5% SM, 22,5% CHOL (w/w) (Liposomes PIP₂)

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 polycarbonate superposés (Polycarbonates filters Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada), 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. 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.2.3. 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 densité de surface du fluorophore diminue (Figure III.1.).

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. 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.

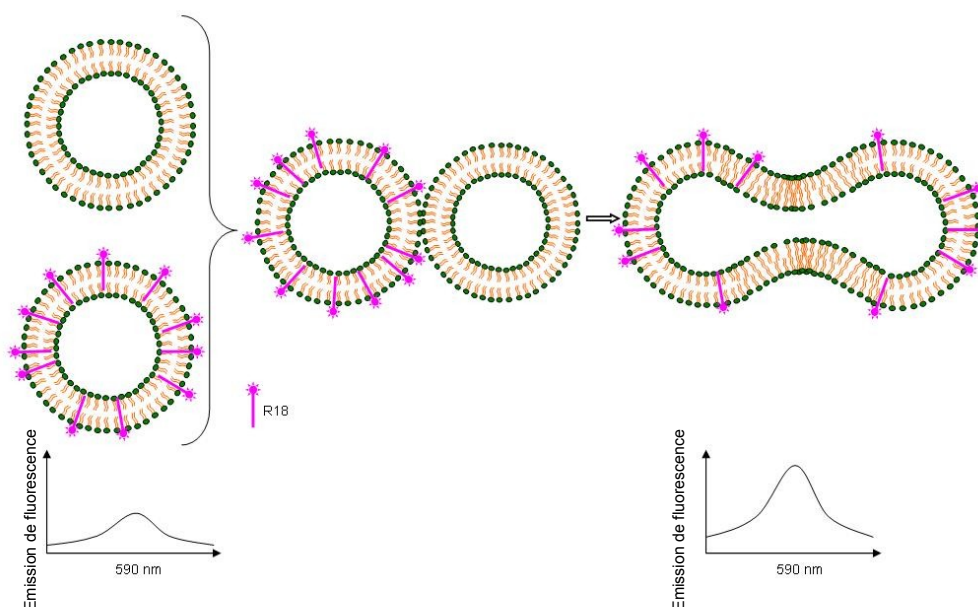


Figure III.1. : Schéma explicatif de la fusion de phase lipidique

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.

III.2.4. Mesures de perméabilité lipidique

La capacité d'un peptide à déstabiliser la membrane lipidique est mesurée par l'atténuation de la fluorescence de l'ANTS, ou de l'HPTS, par le DPX. Lorsque ces deux molécules sont suffisamment proches, il y a atténuation de la fluorescence de l'HPTS par le DPX par un phénomène de quenching (Ellens H. *et al.*, 1986). Lors du test de perméabilité lipidique, ces molécules sont encapsulées dans les mêmes liposomes pour masquer la fluorescence de l'HPTS. Si il y a perméabilisation de la membrane, une augmentation de l'intensité de fluorescence sera observée (Figure III.2.).

L'HPTS et le DPX sont encapsulés dans le compartiment aqueux des mêmes liposomes lors de la formation des LUV ou des SUV (voir III.2.1.), les films lipidiques étant réhydratés avec 1ml de tampon Tris-HCl pH 7,4, 1ml de solution d'HPTS 37,5mM (45mM en NaCl) et 1ml de solution de DPX 135mM (20mM en NaCl). Pour réaliser les mesures, 25µl d'échantillon sont ajoutés à 750µl de liposomes marqués. 25µl de tampon puis 25µl de Triton X-100 sont tout d'abord ajoutés et nous donnent respectivement le zéro et le 100%. Le Triton X-100 est un détergent qui perméabilise totalement les membranes. Ensuite, les peptides dissous à des concentration allant de 60µM à 1200µM et les solvants utilisés sont testés.

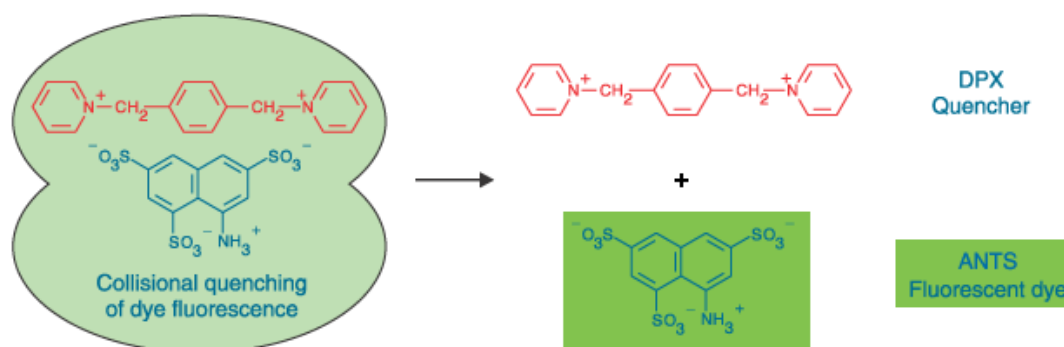


Figure III.2. : Schéma explicatif de la perméabilité lipidique

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 450 nm et de 512 nm. Les résultats se présentent sous la forme de pourcentage de sortie de l'HPTS. Ce dernier se calcul à partir de la formule :

$$\% = \frac{X_{(t)} - X_{(0)}}{X_{(100)} - X_{(0)}} \times 100$$

$X_{(0)}$ = fluorescence observée après l'ajout de 25 μ L de tampon

$X_{(100)}$ = fluorescence observée après l'ajout de 25 μ L de Triton X-100

$X_{(t)}$ = fluorescence observée après l'ajout de 25 μ L de l'échantillon à tester

III.2.5. 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 900 cm^{-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 μ l de l'échantillon à analyser est étalé sur une plaque de germanium (Figure III.3.). 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 D₂O durant trois heures à température ambiante.

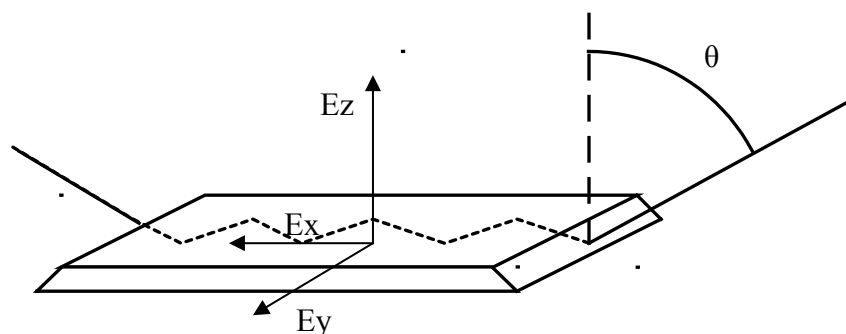


Figure III.3. : Schéma de la plaque de germanium traversée par un rayon infrarouge

b) Détermination de la structure secondaire du peptide

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

Résultats

IV. Résultats

Les résultats présentés ici portent sur l'étude expérimentale du peptide oblique de l' α -synucléine. Cette étude comprend des mesures de fusion de phase lipidique et de perméabilité, qui permettent de mettre en évidence les propriétés déstabilisatrices des peptides obliques, et des mesures en spectroscopie infrarouge, qui permettent d'étudier la conformation adoptée par le peptide. Lors de cette étude, trois lots de peptide ont été testés, les lots RB69 et RB83, qui correspondent au fragment potentiellement oblique de l' α -synucléine dont les extrémités N- et C-terminal sont protégées, et le lot SM1466-1a, qui correspond au peptide oblique de l' α -synucléine auquel on a rajouté du côté N-terminal un PIP₂-Binding Peptide. Cet ajout va permettre d'adresser le peptide à la membrane et de diminuer ainsi la concentration peptidique nécessaire à la fusion, comme montré pour le peptide A β (29-42) (Decout A. *et al.*, 1998).

IV.1. Mesures de fusion de phase lipidique

Pour tester les propriétés déstabilisatrices des peptides obliques, des liposomes non marqués sont mélangés à des liposomes marqués au R18 dans un rapport 4:1 (W/W), puis ce mélange est mis en présence du peptide potentiellement fusogène. Une augmentation de fluorescence indique que le peptide a induit de la fusion.

Différents types de liposomes sont utilisés lors ces expériences, à savoir des liposomes unilamellaires de petite taille (SUV) ou de grande taille (LUV), composés de lipides neutres et chargés négativement (PC, PE, PI ou PIP₂, PS, SM, CHOL) ou globalement neutres (PC, PE, SM, CHOL). De plus, ces liposomes sont préparés en utilisant une solution tampon à pH 7,4. Le peptide oblique de l' α -synucléine, quant à lui, 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.

Sur les graphiques présentés, les intensités de fluorescence correspondant au peptide oblique de l' α -synucléine dans différentes conditions expérimentales sont comparées à l'intensité induite par le peptide oblique du SIV. Ce peptide a été largement 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.

IV.1.1. RB69

IV.1.1.1. LUV non chargés

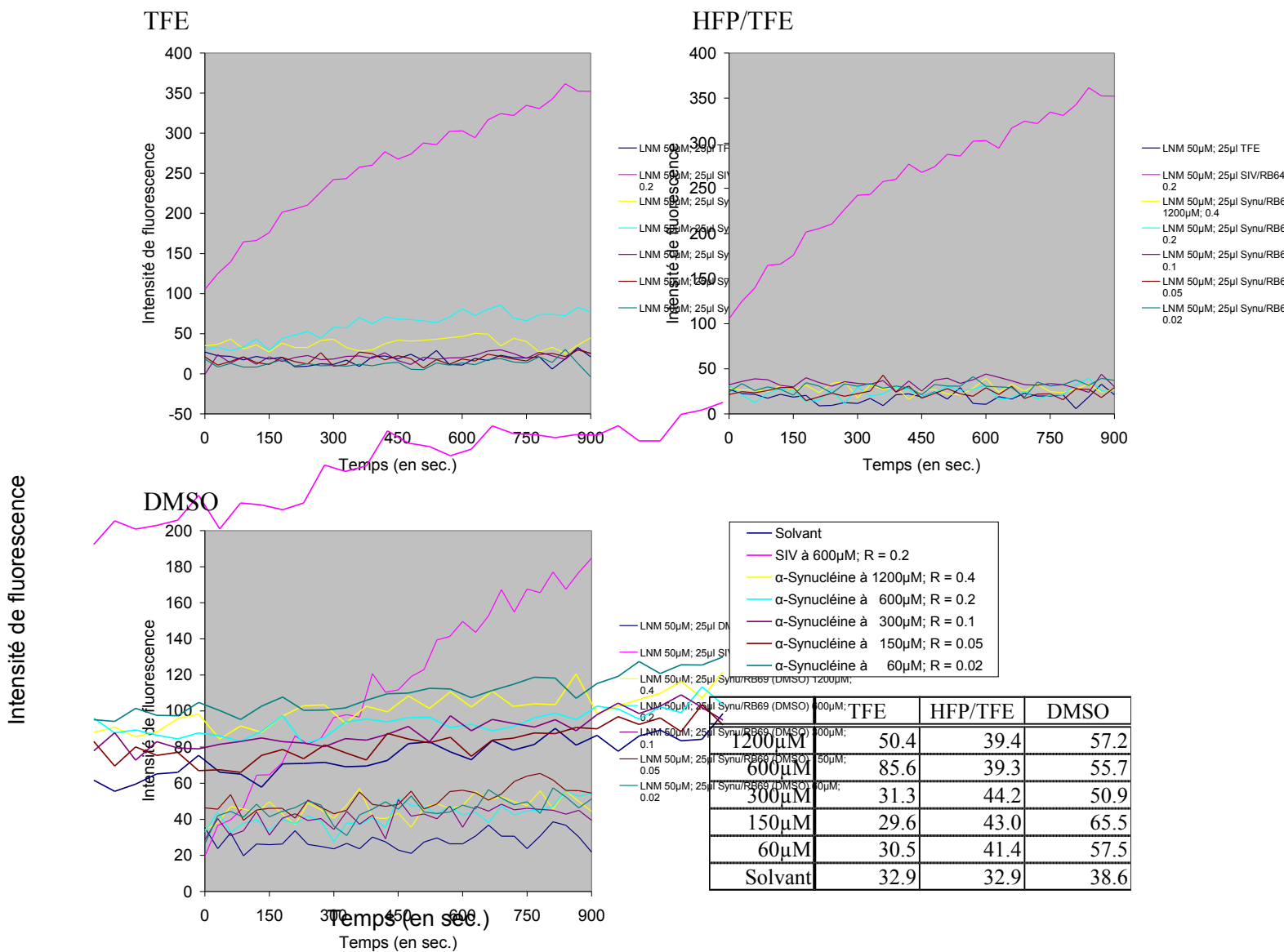


Figure IV.1. : Mesures de fusion de liposomes réalisées à pH 7,4 avec le peptide de l' α -synucléine dissous dans du TFE, de l'HFP/TFE et du DMSO. Le SIV sert de contrôle positif et figure en rose. Le tableau regroupe les valeurs d'intensité de fluorescence maximum de chaque courbe.

La figure IV.1. montre que le peptide oblique de l' α -synucléine n'induit pas la fusion des LUV non chargés, quel que soit le solvant dans lequel il est dissous et le rapport

peptide/lipide testé (Voir annexes 2 à 3). Les différences d'intensité de fluorescence observées entre ce peptide et le solvant ne sont jamais supérieures à 100 unités (arbitraires) de fluorescence (voir tableau).

IV.1.1.2. LUV chargés

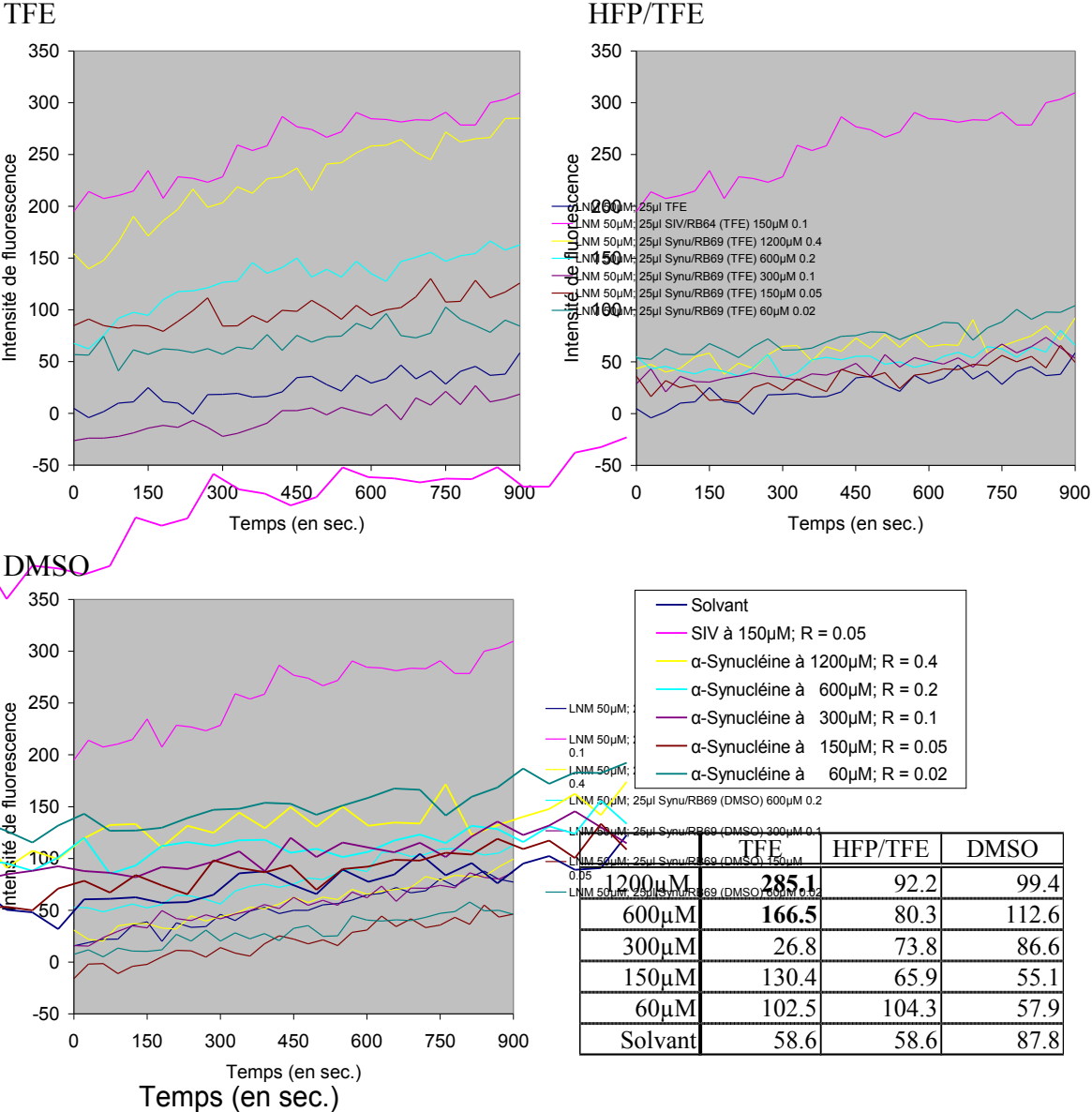


Figure IV.2. : Mesures de fusion de liposomes réalisées à pH 7,4 avec le peptide de l' α -synucléine dissous dans du TFE, de l'HFP/TFE et du DMSO. Le SIV sert de contrôle positif et figure en rose. Le tableau regroupe les valeurs d'intensité de fluorescence maximum de chaque courbe.

La figure IV.2. 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 la fusion des LUV chargés (voir valeurs en gras du tableau). La fusion est dose-dépendante (Voir annexes 1 à 2).

IV.1.1.3. SUV chargés

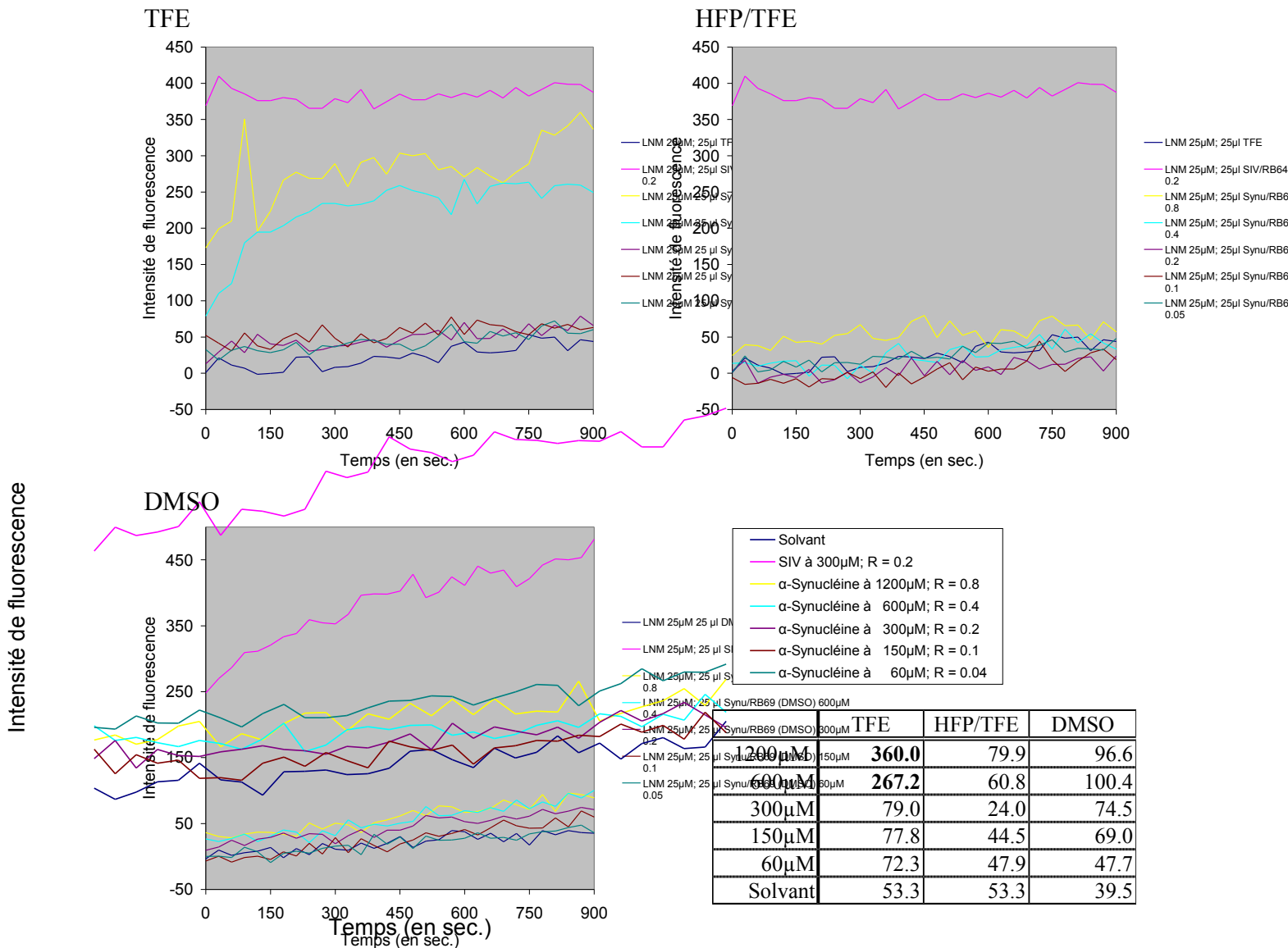


Figure IV.3. : Mesures de fusion de liposomes réalisées à pH 7,4 avec le peptide de l' α -synucléine dissous dans du TFE, de l'HFP/TFE et du DMSO. Le SIV sert de contrôle positif et figure en rose. Le tableau regroupe les valeurs d'intensité de fluorescence maximum de chaque courbe.

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.2. et figure IV.3. ; voir valeurs en gras du tableau), lorsqu'il est dissous dans du TFE (Voir annexes 3 à 4).

IV.1.1.4. SUV non chargés

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.1.). Les mêmes résultats sont obtenus pour les SUV et ne sont donc pas montrés (Voir annexes 4).

IV.1.1.5. Récapitulatif

Les graphiques présentés ci-dessus montrent que le phénomène de fusion de phase lipidique a pu être observé lorsque le peptide était dissous dans du TFE et mis en présence de liposomes (LUV ou SUV) chargés. Pour avoir une image plus générale des résultats obtenus avec ce lot de peptide, le tableau récapitulatif IV.1. est présenté ci-dessous. On considère arbitrairement qu'il y a fusion lorsque la différence des intensités de fluorescence induite par le peptide et le solvant est supérieur à 100.

A pH 7,4, le peptide de l' α -synucléine dissous dans le DMSO ou l'HFP/TFE n'induit pas de fusion significative. En présence de liposomes chargés et dissous dans le TFE, ce même peptide est fusogène.

LOT : RB69		LUV NC	LUV C	SUV NC	SUV C
pH 7,4	TFE	17,5 (0,4)	226,5 (0,4)	25,1 (0,4)	306,7 (0,8)
		3,2 (0,4)	117 (0,8)		
	HFP/TFE	6,5 (0,8)	33,6 (0,4)	24,1 (0,4)	26,6 (0,8)
		82,9 (0,8)	66,5 (0,8)		
	DMSO	11,6 (0,8)	11,6 (0,4)	0 (0,4)	57,1 (0,8)

Tableau IV.1. : Récapitulatif des mesures réalisées avec le peptide oblique de l' α -synucléine (lot RB69). Ces chiffres correspondent au maximum d'intensité de fluorescence induite par le peptide à 1200 μ M et dont la contribution du solvant a été soustraite. Ceux-ci sont accompagnés, entre parenthèse, du rapport peptide/lipide correspondant.

IV.1.2. RB83

Les mêmes expériences ont été répétées pour le lot RB83 du peptide de l' α -synucléine.

IV.1.2.1. LUV chargés

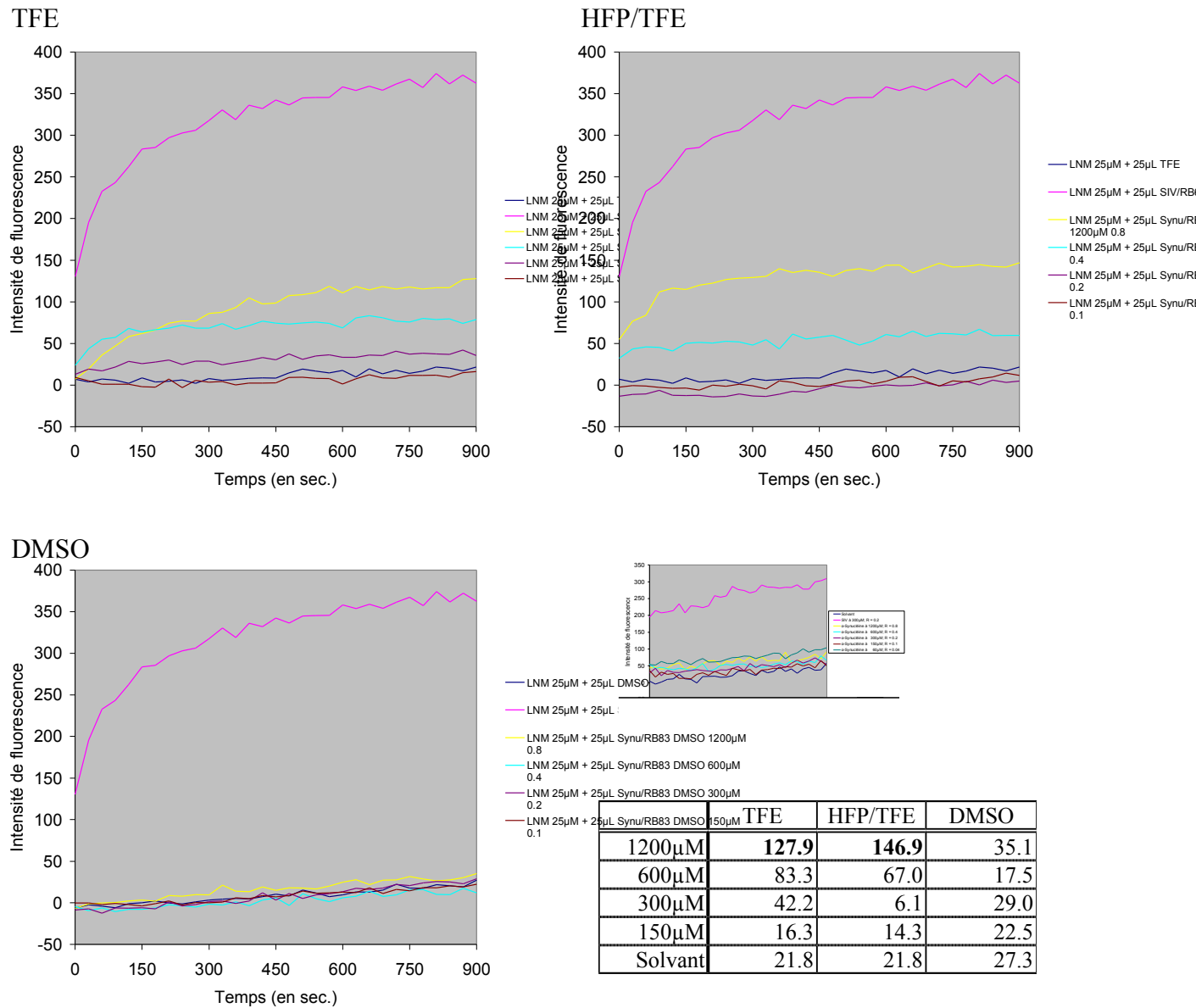


Figure IV.4. : Mesures de fusion de liposomes réalisées à pH 7,4 avec le peptide de l' α -synucléine dissous dans du TFE, de l'HFP/TFE et du DMSO. Le SIV sert de contrôle positif et figure en rose. Le tableau regroupe les valeurs d'intensité de fluorescence maximum de chaque courbe.

La figure IV.4. montre que le peptide oblique de l' α -synucléine, lorsqu'il est dissous dans du TFE ou de l'HFP/TFE et se trouve à un rapport R de 0,8, induit de la fusion de phase lipique (voir valeurs en gras du tableau, comme pour le lot RB69). La fusion est dose-dépendante (Voir annexes 5).

IV.1.2.2. LUV non chargés

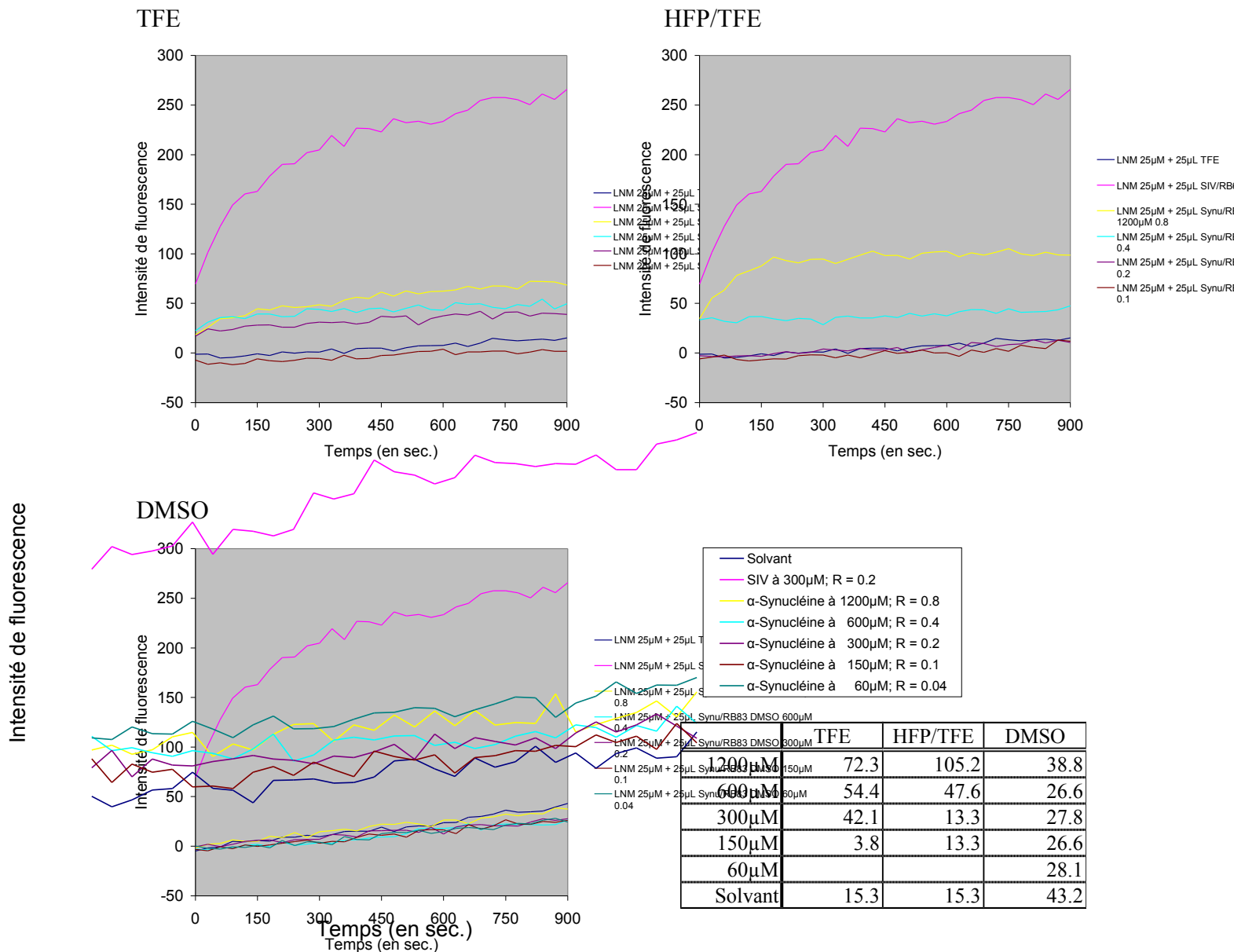
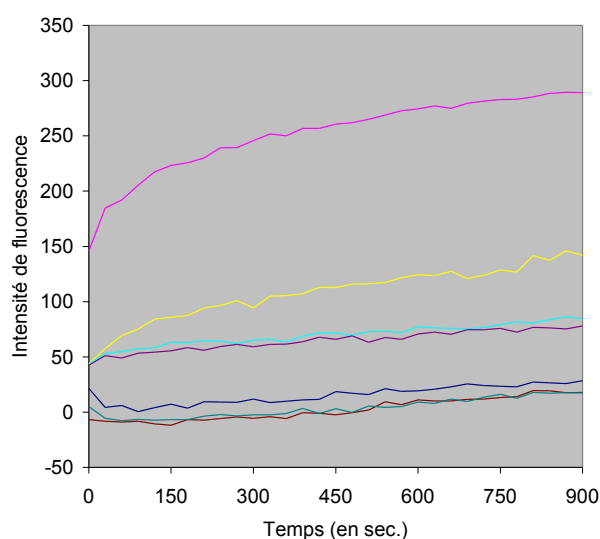


Figure IV.5. : Mesures de fusion de liposomes réalisées à pH 7,4 avec le peptide de l' α -synucléine dissous dans du TFE, de l'HFP/TFE et du DMSO. Le SIV sert de contrôle positif et figure en rose. Le tableau regroupe les valeurs d'intensité de fluorescence maximum de chaque courbe.

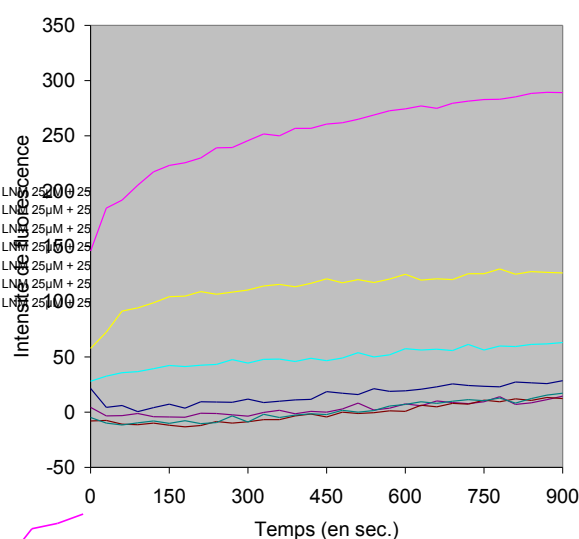
La figure IV.5. montre que le peptide oblique de l' α -synucléine, lorsqu'il mis en présence de LUV non chargés, n'induit pas de la fusion de phase lipidique (Voir annexes 5 à 6). Les différences d'intensité de fluorescence observées entre ce peptide et le solvant ne sont jamais supérieure à 100 unités de fluorescence (voir tableau).

IV.1.2.3. SUV chargés

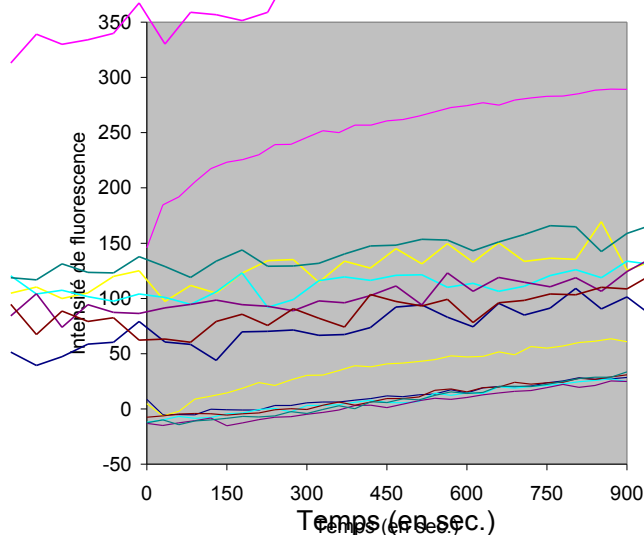
TFE



HFP/TFE



DMSO



- Solvant
- SIV à 150 μ M; R = 0.1
- α -Synucléine à 1200 μ M; R = 0.8
- α -Synucléine à 600 μ M; R = 0.4
- α -Synucléine à 300 μ M; R = 0.2
- α -Synucléine à 150 μ M; R = 0.1
- α -Synucléine à 60 μ M; R = 0.04

	TFE	HFP/TFE	DMSO
1200 μ M	146.1	129.6	63.4
600 μ M	86.2	63.1	27.1
300 μ M	78.0	14.5	25.4
150 μ M	19.6	13.1	30.8
60 μ M	17.8	17.1	33.5
Solvant	28.5	28.5	28.5

Figure IV.6. : Mesures de fusion de liposomes réalisées à pH 7,4 avec le peptide de l' α -synucléine dissous dans du TFE, de l'HFP/TFE et du DMSO. Le SIV sert de contrôle positif et figure en rose. Le tableau regroupe les valeurs d'intensité de fluorescence maximum de chaque courbe.

La figure IV.6. montre que le peptide oblique de l' α -synucléine, lorsqu'il est dissous dans du TFE ou de l'HFP/TFE et se trouve à un rapport R de 0,8, induit de la fusion de phase lipique (voir valeurs en gras du tableau). La fusion est dose-dépendante (Voir annexes 6).

IV.1.2.4. SUV non chargés

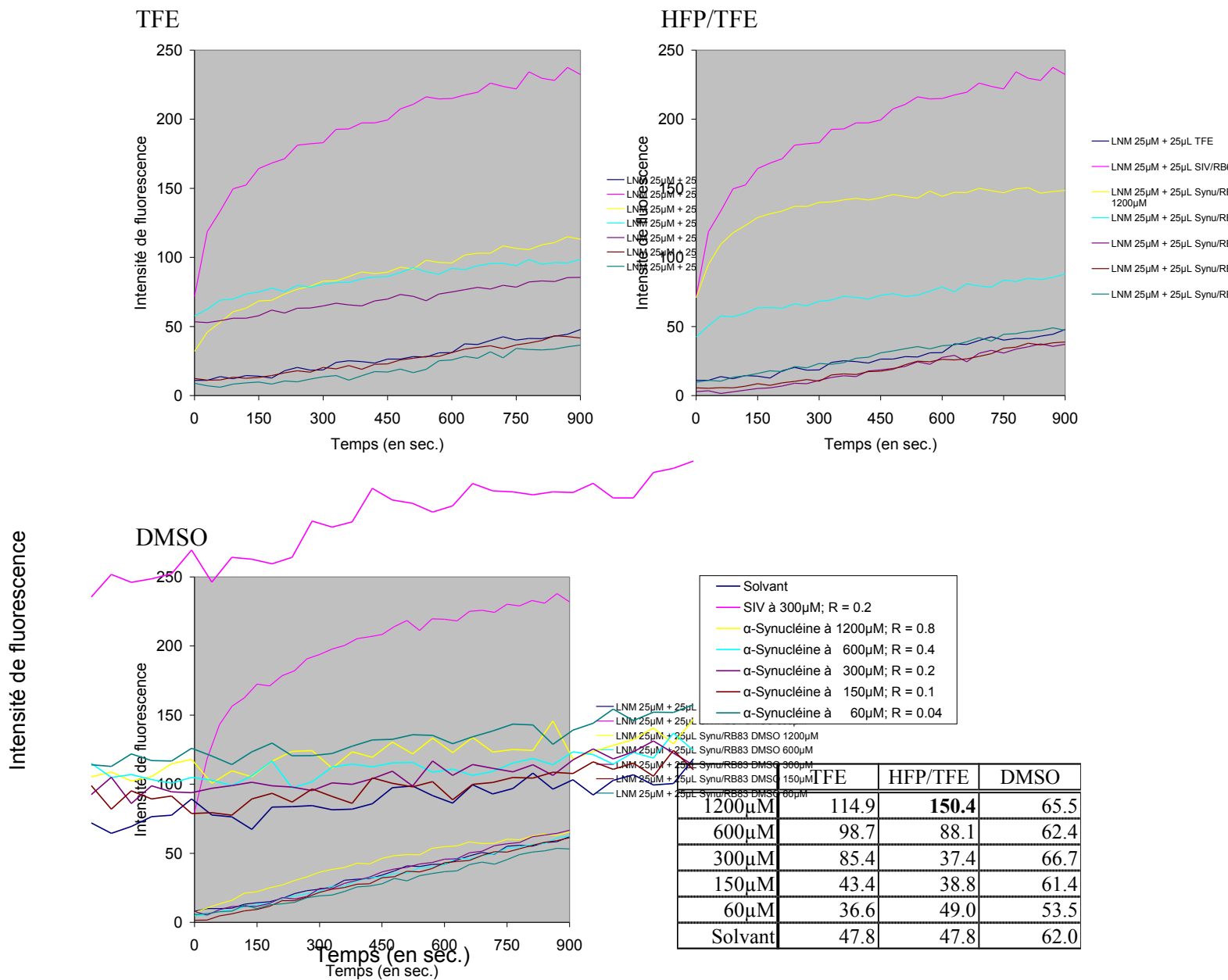


Figure IV.7. : Mesures de fusion de liposomes réalisées à pH 7,4 avec le peptide de l' α -synucléine dissous dans du TFE, de l'HFP/TFE et du DMSO. Le SIV sert de contrôle positif et figure en rose. Le tableau regroupe les valeurs d'intensité de fluorescence maximum de chaque courbe.

La figure IV.7. montre que le peptide oblique de l' α -synucléine, lorsqu'il est dissous dans de l'HFP/TFE et se trouve à un rapport R de 0,8, induit de la fusion de phase lipidique (voir valeur en gras du tableau). La fusion est dose-dépendante (Voir annexes 7).

IV.1.2.5. Récapitulatif

Les graphiques présentés ci-dessus montrent que le phénomène de fusion de phase lipidique a pu être observé lorsque le peptide était dissous dans du TFE ou de l'HFP/TFE et mis en présence de LUV chargés, de SUV chargés ou de SUV non chargés. Pour avoir une image plus générale des résultats obtenus avec le peptide, le tableau récapitulatif IV.2. est présenté ci-dessous. On considère arbitrairement qu'il y a fusion lorsque la différence des intensités de fluorescence induite par le peptide et le solvant est supérieur à 100.

Le phénomène de fusion n'est jamais observé lorsque le peptide est dissous dans le DMSO. Par contre, lorsqu'il est dissous dans du TFE ou de l'HFP/TFE, il induit une fusion significative et dose-dépendante. Toutes les valeurs indiquées dans le tableau IV.2. correspondent aux intensité de fluorescence observées pour un rapport peptides/lipides de 0,8.

LOT : RB83		LUV NC	LUV C	SUV NC	SUV C
pH 7,4	TFE	57	106,1	67,1	117,6
	HFP/TFE	89,9	125,1	102,6	101,1
	DMSO	-4,4	7,8	3,5	34,9

Tableau IV.2.: Récapitulatif des mesures réalisées avec le lot RB83 du peptide oblique de l' α -synucléine. Ces chiffres correspondent aux maximum d'intensité de fluorescence induite par le peptide à 1200 μ M et dont la contribution du solvant a été soustraite (R = 0,8).

IV.1.3. SM1466-1a

Les mêmes expériences ont été répétées pour le lot SM1466-1a du peptide de l' α -synucléine. Le peptide du lot SM1466-1a correspond au peptide oblique de l' α -synucléine auquel on a rajouté du côté N-terminal un PIP₂-Binding Peptide (PBP). Celui-ci va permettre d'adresser le peptide à la membrane et de diminuer ainsi la concentration peptidique nécessaire à la fusion.

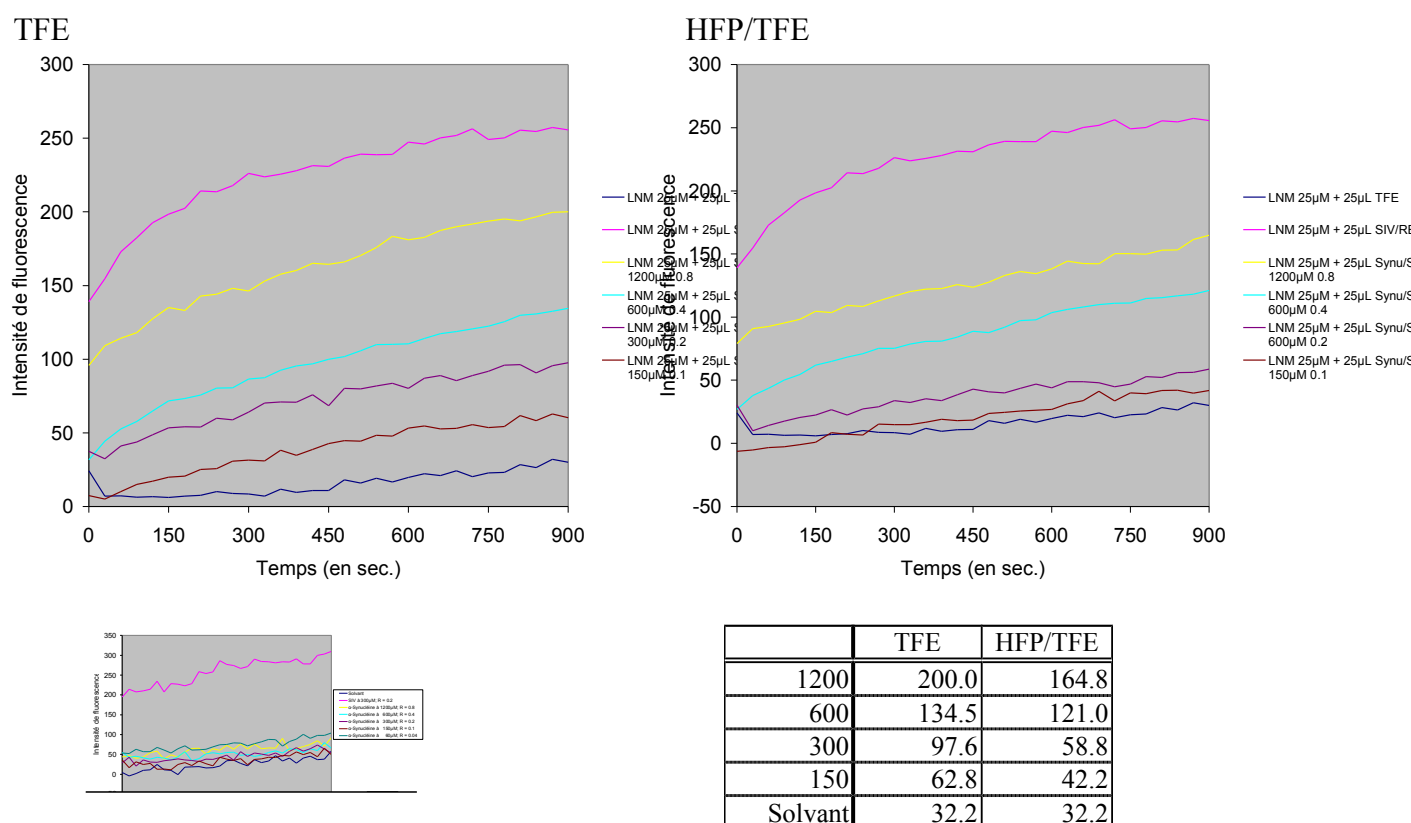


Figure IV.8. : Mesures de fusion de SUV chargés comprenant du lipide PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate) réalisées à pH 7,4 avec le peptide de l' α -synucléine dissous dans du TFE, de l'HFP/TFE et du DMSO. Le SIV sert de contrôle positif et figure en rose. Le tableau regroupe les valeurs d'intensité de fluorescence maximum de chaque courbe.

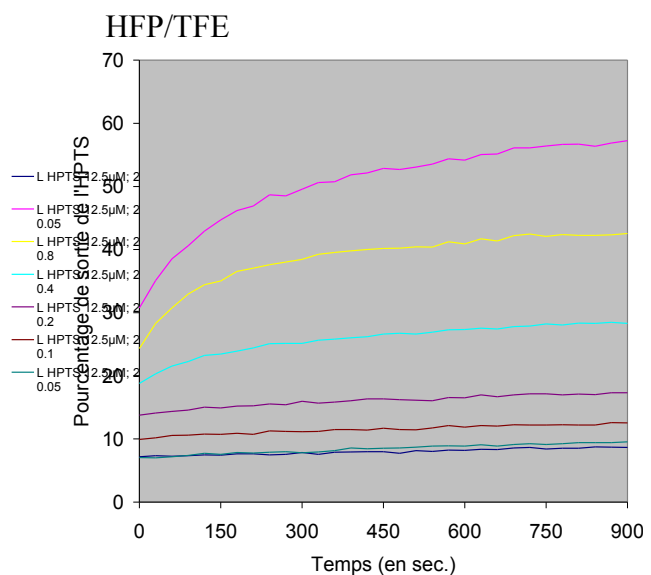
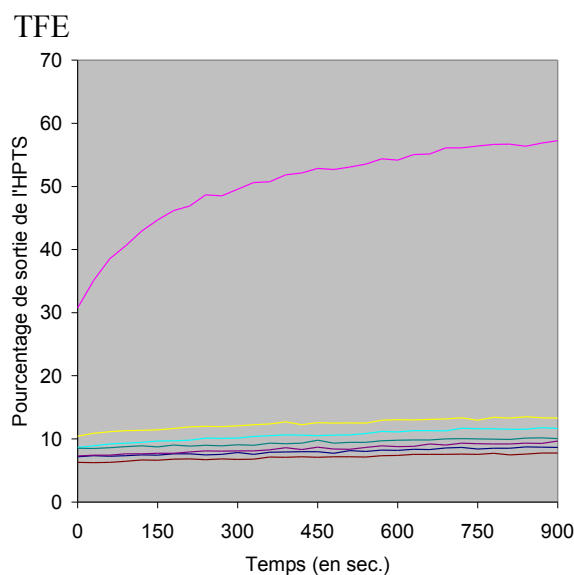
La figure IV.8. montre que le peptide oblique de l' α -synucléine, lorsqu'il est dissous dans de l'HFP/TFE ou du TFE, et se trouve à un rapport R supérieur ou égal à 0,4, induit de la fusion de phase lipidique (voir valeur en gras du tableau). La fusion est dose-dépendante (Voir annexes 8). De plus, la fusion induite par ce peptide est supérieure à celle produite par le peptide de l' α -synucléine du lot RB83 (Figure IV.8).

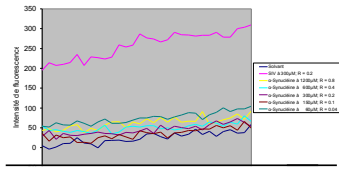
IV.2. Mesures de perméabilité lipidique

Les mesures de perméabilité lipidique se basent sur l'atténuation de la fluorescence de l'HPTS par le DPX. Ces molécules sont encapsulées dans les mêmes liposomes ; si il y a perméabilisation de la membrane, une augmentation de l'intensité de fluorescence de l'HPTS libérée sera observée. Différents types de liposomes sont utilisés lors ces expériences, à savoir des liposomes unilamellaires de petite taille (SUV) ou de grande taille (LUV), composés de lipides neutres et chargés négativement (PC, PE, PI, PS, SM, CHOL). De plus, ces liposomes sont préparés en utilisant une solution tampon à pH 7,4. Le peptide oblique de l' α -synucléine, quant à lui, a été dissous dans le TFE et l'HFP/TFE, qui permettent au peptide d'induire de la fusion lipidique. Différents rapports molaires peptide/lipide R ont été testés.

Les résultats se présentent sous la forme de pourcentage de sortie de l'HPTS. Ce dernier est calculé en prenant comme zéro, la fluorescence associée à l'ajout de 25 μ l de tampon et comme 100%, la fluorescence associée à l'ajout de 25 μ l de Triton X-100. Il s'agit d'un détergent qui perméabilise totalement les membranes. Sur les graphiques présentés, les intensités de fluorescence correspondant au peptide oblique de l' α -synucléine sont comparés à l'intensité induite par le peptide oblique du SIV. Ce peptide a été largement 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.

IV.2.1. RB69



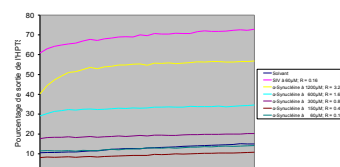
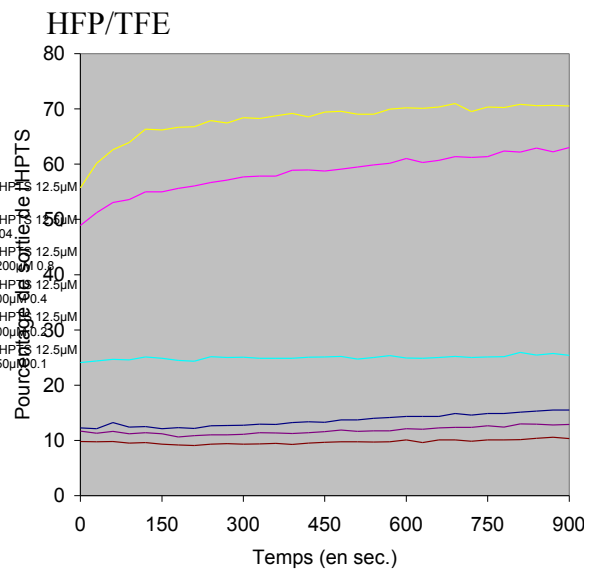
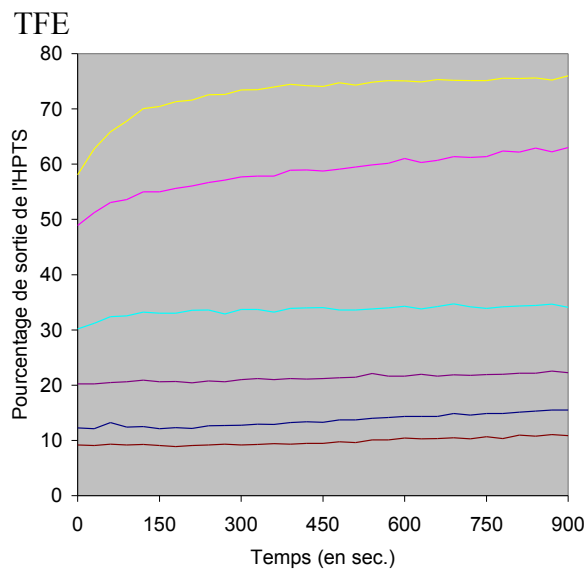


	TFE	HFP/TFE
1200µM	13.5	42.5
600µM	11.8	28.5
300µM	9.7	17.3
150µM	7.8	12.6
60µM	10.2	9.6
Solvant	8.8	8.8

Figure IV.9. : Mesures de perméabilité lipidique réalisées à pH 7,4 sur des SUV chargés avec le peptide de l'α-synucléine dissous dans du TFE ou de l'HFP/TFE. Le SIV sert de contrôle positif et figure en rose. La légende de ces graphiques se trouve en bas à droite, au-dessus d'un tableau regroupant les valeurs d'intensité de fluorescence maximum de chaque courbe.

La figure IV.9. montre que le peptide oblique de l'α-synucléine, lorsqu'il est dissous dans le TFE et l'HFP/TFE et se trouve à un rapport R supérieur ou égal à 0,4, induit de la perméabilité lipidique (voir valeur en gras du tableau). La perméabilité observée est dose-dépendante (Voir annexes 9). En ce qui concerne le lot RB69, seul les SUV chargés ont été utilisés lors des essais de perméabilité car c'est avec ce type de liposomes que les meilleurs résultats ont été observés en fusion de phase lipidique.

IV.2.2. RB83



	TFE	HFP/TFE
1200µM	76.0	71.0
600µM	34.7	25.9
300µM	22.5	13.0
150µM	11.0	10.5
Solvant	15.5	15.5

Figure IV.10. : Mesures de fusion de liposomes réalisées à pH 7,4 sur des LUV chargés avec le peptide de l' α -synucléine dissous dans du TFE ou de l'HFP/TFE. Le SIV sert de contrôle positif et figure en rose. Le tableau regroupe les valeurs d'intensité de fluorescence maximum de chaque courbe.

La figure IV.10. montre que le peptide oblique de l' α -synucléine, lorsqu'il est dissous dans du TFE ou de l'HFP/TFE et se trouve à un rapport R supérieur ou égal à 0,8, induit de la perméabilité lipidique (voir valeur en gras du tableau). La perméabilité observée est dose-dépendante (Voir annexes 10). En ce qui concerne le lot RB83, seul les LUV chargés ont été utilisés lors des essais de perméabilité, car c'est avec ce type de liposomes que les meilleurs résultats ont été observés en fusion de phase lipidique.

IV.3. Mesures infrarouge

La technique de spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier en Réflection 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 différents solvants, est étalé sur une plaque de germanium. Les résultats de l'analyse FTIR se trouvent dans le tableau IV.3.

Lot de peptide	Solvant employé	Total β	Total α	Random-coil	Turn
RB69	TFE	37	25	12	26
	HFP/TFE	- Résultats -	21	10	19
RB83	TFE	57	21	12	10
	HFP/TFE	57	16	9	19

Tableau IV.3.: Pourcentage ($\pm 5\%$) de peptide 67-78 de l' α -synucléine, 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).

Discussion et conclusion

V. Discussion et conclusion

L' α -synucléine est une petite protéine cytosolique de 140 acides aminés appartenant à la famille des synucléines et associée à la maladie de Parkinson. Cette protéine est dite amyloïdogénique car elle est capable de former des structures protéiques particulières appelées fibrilles amyloïdes, impliquées dans la maladie. Récemment, un peptide oblique a été découvert au sein de la séquence de cette protéine. Il s'agit du domaine 67-78. 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 mis en évidence dans ces protéines (Pillot T. *et al.*, 1997 ;Pillot T. *et al.*, 1996). 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. Ce polypeptide peut polymériser seul et accentue la fibrillation de l' α -synucléine (Giasson BI. *et al.*, 2001). 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.

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.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une thèse de doctorat portant sur l'étude des peptides obliques se trouvant au sein de protéines amyloïdogéniques. Les propriétés déstabilisatrices du peptide 67-78 de l' α -synucléine seront étudiées par des mesures de fluorescence et de sa conformation par spectroscopie infrarouge. Ce peptide pourrait avoir un rôle soit dans la neurotoxicité, soit dans la transconformation de cette protéine.

Les résultats obtenus en fusion de phase lipidique sur les deux lots indiquent que le peptide 67-78 de l' α -synucléine dissous dans du TFE ou de l'HFP/TFE induit la fusion de liposomes (LUV ou SUV) préférentiellement chargés négativement, et ce à un rapport peptide/lipide (R) supérieur ou égal à 0,8. Ces résultats montrent que le processus de fusion se produit préférentiellement lorsque les liposomes contiennent des phospholipides acides, ce qui correspond aux observations de Davidson *et al.* (Davidson WS. *et al.*, 1998) et que, pour qu'il y ait fusion, ce peptide doit être dissous dans un solvant qui favorise l'hélicité, tels que le TFE ou l'HFP/TFE. Cependant, ce peptide doit se trouver à un rapport peptide/lipide plus élevé que le peptide oblique du SIV pour induire de la fusion. 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. Il faut signaler que les deux lots de peptides ne donnent pas des résultats totalement identiques, le lot RB83 induisant notamment de la fusion en présence de SUV non chargés. Cette différence peut s'expliquer par la pureté qui n'a pas été reproduite d'un lot à l'autre, étant donné l'hydrophobicité du peptide.

Dans le cas du peptide de l' α -synucléine auquel un domaine ayant une spécificité pour le lipide PIP₂ (le PIP₂ Binding Peptide ou PBP) a été greffé, les résultats montrent que le peptide dissous dans de l'HFP/TFE ou du TFE, et à un rapport R supérieur ou égal à 0,4, induit de la fusion de phase lipidique. De plus, la fusion induite par ce peptide est supérieure à celle produite par le peptide de l' α -synucléine du lot RB83. Ce domaine permet d'adresser le peptide à la membrane et de diminuer ainsi la concentration peptidique nécessaire à la fusion. Decout A. *et al.* ont pu montrer que, dans le cas du peptide A β (29-42), la concentration

peptidique nécessaire pour induire la phénomène de fusion était diminuée d'un facteur six. Leurs résultats montrent également que le peptide oblique et le PBP conservent leurs propriétés respectives lorsqu'ils sont liés (Decout A. *et al.*, 1998).

En ce qui concerne la perméabilité lipidique, les résultats obtenus pour les deux lots testés montrent que le peptide oblique de l' α -synucléine possède une activité déstabilisatrice. Ce peptide induit la perméabilité lipidique pour un rapport molaire peptide/lipide à partir de 0,4. Ces résultats viennent confirmer l'effet déstabilisant qu'a ce peptide sur les phospholipides et montrent qu'il est capable de perméabiliser une membrane lipidique.

Des mesures infrarouge 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. La conformation du peptide α -synu-PBP devrait également être étudiée.

En conclusion, cette étude a permis de montrer que le peptide oblique détecté par modélisation moléculaire au sein de la séquence de l' α -synucléine se comporte effectivement comme un peptide oblique. Celui-ci est capable d'induire de la fusion de phase lipidique et de la perméabilité lipidique. Par ailleurs, ces résultats suggèrent que ce peptide oblique pourrait jouer un rôle dans la maladie de Parkinson, soit par un effet neurotoxique, soit lors de la transconformation de la protéine, comme dans le cas de A β (maladie d'Alzheimer) et PrP (maladies à Prion).

Perspectives

VI. Perspectives

Les résultats de cette étude montrent que le peptide potentiellement oblique détecté au sein de la séquence de l' α -synucléine possède bien les propriétés des peptides obliques puisqu'il est capable d'induire de la fusion de phase lipidique. Du point de vue de sa conformation en solution, ce peptide doit encore être analysé par spectroscopie RMN et dichroïsme circulaire, et en présence de lipides, par RMN et spectroscopie IR. D'autre part, afin de montrer que la fusion observée est bien due au gradient d'hydrophobicité, des mutants du peptide oblique de l' α -synucléine dans lesquels le gradient est modifié ont été modélisés et seront étudiés expérimentalement.

A plus grande échelle, cette étude ouvre la voie de l'étude expérimentale d'autres peptides obliques détectés chez des protéines amyloïdogéniques. Cinq peptides obliques détectés n'ont pas encore été testés expérimentalement. Par ailleurs, le travail de recherche de protéines amyloïdogéniques et de peptides obliques au sein de leur séquence devrait se poursuivre. De plus, dans le cadre d'un doctorat, un protocole expérimental de transconformation protéique devrait être mis au point. Ce test devrait permettre d'éprouver l'hypothèse émise quant à l'implication des peptides obliques dans le phénomène de transconformation. 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).

Bibliographie

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. Anfinsen C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230.
3. Bartlett G.R. (1959). Phosphorus Assay in Column Chromatography. *Journal of Biological Chemistry* 234, 466-468.
4. Berson J.F., Theos A.C., Harper D.C., Tenza D., Raposo G., Marks M.S. (2003). Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *The Journal of Cell Biology* 161, 521-533.
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., Epanand 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. *Biochimica et Biophysica Acta* 1092, 267-273.
9. Brasseur R. (1991). Differentiation of lipid-associating helices by use of three-dimensional molecular hydrophobicity potential calculations. *Journal of Biological Chemistry* 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 in Biochemical Sciences* 22, 167-171.
11. Brasseur R. (2000). Tilted peptides : a motif for membrane destabilization (Hypothesis). *Molecular Membrane Biology* 17, 31-40.
12. Bucciantini M., Giannoni E., Chiti F., Baroni F., Formigli L., Zurdo J., Taddei N., Ramponi G., Dobson C.M., Stefani M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416, 507-511.
13. Bussell R., Eliezer D. (2001). Residual structure and dynamics in Parkinson's disease-associated mutants of alpha-synuclein. *Journal of Biological Chemistry* 276, 45996-46003.

14. Byler D.M., Susi H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* 25, 469-487.
15. 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.
16. Chandra S., Chen X., Rizo J., Jahn R., Sudhof T.C. (2003). A broken alpha -helix in folded alpha -synuclein. *Journal of Biological Chemistry* 278, 15313-15318.
17. Chapman M.R., Robinson L.S., Pinkner J.S., Roth R., Heuser J., Hammar M., Normark S., Hultgren S.J. (2002). Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295, 851-855.
18. Cohen A.S., Calkins E. (1959). Electron microscopic observation on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* 183,1202-1203.
19. Cohen B.I., Presnell S.R., Cohen F.E. (1993). Origins of structural diversity within sequentially identical hexapeptides. *Protein Science* 2, 2134-2145.
20. Crowet J.M. (2003) Contribution à l'étude des peptides obliques impliqués dans les phénomènes de transconformation. Mémoire de fin d'étude réalisé à la *Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux*. 74 p.
21. Davidson W.S., Jonas A., Clayton D.F., George J.M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *Journal of Biological Chemistry* 273, 9443-9449.
22. Decout A., Labeur C., Goethals M., Brasseur R., Vandekerckhove J., Rosseneu M. (1998). Enhanced efficiency of a targeted fusogenic peptide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1372, 102-116.
23. Dima R.I., Thirumalai D. (2002). Exploring the propensities of helices in PrP C to form beta sheet using NMR structures and sequence alignments. *Biophysical Journal* 83, 1268-1280.
24. Divry P., Florkin M. (1927). Sur les propriétés optiques de l'amyloïde. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales* 97, 1808-1810.
25. Dobson C.M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 329-332.
26. Eisenberg D., Weiss R., Terwilliger T. (1982). The helical hydrophobic moment : a measure of the amphiphilicity of the α -helix. *Nature* 299, 371-374.
27. 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. *European Journal of Biochemistry* 258, 157-163.

28. El-Agnaf O.M.A., Irvine G.B. (2002). Aggregation and neurotoxicity of α -synuclein and related peptides. *Biochemical Society Transactions* 30, 559-565.
29. Ellens H., Bentz J., Szoka F.C. (1986). Fusion of phosphatidylethanolamine-containing liposomes and mechanism of the L alpha-HII phase transition. *Biochemistry* 25, 4141-4147.
30. Fändrich M., Fletcher M.A., Dobson C.M. (2001). Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* 410, 165-166.
31. George J.M. (2001). The synucleins. *Genome Biology* 3, 3002.1-3002.6.
32. 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. *Journal of Biological Chemistry* 276, 2380-2386.
33. 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 41, 1287-1289.
34. 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. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 193, 409-420.
35. Grateau G. (2000). Physiopathologie des amyloses. *Revue du Rhumatisme* 67, 189-196.
36. Han X., Bushweller J.H., Cafiso D.S., Tamm L.K. (2001). Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nature Structural Biology* 8, 715-720.
37. 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. *Annual Review of Biochemistry* 66, 385-407.
38. 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. *The EMBO Journal* 10, 2747-2755.
39. Ionescu-Zanetti C., Khurana R., Gillespie J.R., Petrick T.S., Trabachino L.C., Minert L.J., Carter S.A., Fink A. L. (1999). Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 13175-13179.
40. Jaskólski M. (2001). 3D domain swapping, protein oligomerization, and amyloid formation. *Acta Biochimica Polonica* 48, 807-827.
41. Jenkins J., Pickersgill R. (2001). The architecture of parallel beta-helices and related folds. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 77, 111-175.

42. Johansson J. (2003) Molecular determinants for amyloid fibril formation: lessons from lung surfactant protein C. *Swiss Medical Weekly* 133, 275-282.
43. Kabsch W., Sander C. (1984). On the use of sequence homologies to predict protein structure: identical pentapeptides can have completely different conformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 81, 1075-1078.
44. Kallberg Y., Gustafsson M., Persson B., Thyberg J., Johansson J. (2001). Prediction of amyloid fibril-forming proteins. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12945-12950.
45. 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.
46. Kelly J.W. (1996). Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Current Opinion in Structural Biology* 6, 11-17.
47. Kelly J.W. (1998). The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Current Opinion in Structural Biology* 8, 101-106.
48. Kelly J.W. and Blach W.E. (2003). Amyloid as a natural product. *The Journal of Cell Biology* 161, 461-462.
49. Khurana R., Ionescu-Zanetti C., Pope M., Li J., Nielson L., Ramírez-Alvarado M., Regan L., Fink A.L, Carter S.A. (2003). A General Model for Amyloid Fibril Assembly Based on Morphological Studies Using Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* 85, 1135-1144.
50. 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. *Journal of Biological Chemistry* 277, 671-678.
51. Lins L., Thomas-Soumarmon A., Pillot T., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Brasseur R. (1999). Molecular determinants of the interaction between the C-terminal domain of Alzheimer's β -amyloid peptide and apolipoprotein E α -helices. *Journal of Neurochemistry* 73, 758-769.
52. Lins L., Charleaux B., Thomas A., Brasseur R. (2001). Computational study of lipid-destabilising protein fragments: towards a comprehensive view of tilted peptides. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 44, 435-447.
53. 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 Engineering* 15, 513-520.
54. Martin I., Defrise-Quertain F., Mandieau V., Nielsen M.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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175, 872-879.

55. 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. *Journal of Virology* 68, 1139-1148.
56. 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. *European Journal of Biochemistry* 249, 708-715.
57. 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. *European Journal of Biochemistry* 256, 570-579.
58. Perutz M.F., Finch J.T., Berriman J., Lesk A. (2002). Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99, 5591-5595.
59. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99, 16742-16747.
60. 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 ? *Journal of Theoretical Biology* 198, 173-181.
61. 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. *Journal of Biological Chemistry* 271, 28757-28765.
62. 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. *Journal of Biological Chemistry* 274, 381-393.
63. Pillot T., Goethals M., Najib J., Labeur C., Lins L., Chambaz J., Brasseur R., Vandekerckhove J., Rosseneu M. (1999). β -amyloid peptide interacts specifically with the Carboxy-terminal Domain of human Apolipoprotein E : Relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 72, 230-237.
64. Rahman M., Lins L., Thomas-Soumarmon A., Brasseur R. (1997). Are amphipatic asymmetric peptides ubiquitous structures for membrane destabilisation. *Journal of Molecular Modeling* 3, 203-215. E
65. Rajagopalan S., Andersen J.K. (2001). Alpha-synuclein aggregation : is it the toxic gain of function responsible for neurodegeneration in Parkinson's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* 122, 1499-1510.

66. Rochet J.C., Lansbury P.T. (2000). Fibrillogenesis: themes and variations. *Current Opinion in Structural Biology* 10, 60-8.
67. Schanck A., Brasseur R., Peuvot J. (1998). Destabilization of a model membrane by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Biological Chemistry* 273, 779-815.
68. Sipe J.D., Cohen A.S. (2000). Review : History of the Amyloid Fibril. *Journal of structural Biology* 130, 88-98.
69. 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 Engineering* 9, 317-321. D
70. Thirumalai D., Klimov D.K., Dima R.I. (2003). Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation. *Current Opinion in Structural Biology* 13, 146-159.
71. Turnbull S., Tabner B.J., El-Agnaf O.M.A., Moore S., Davies Y., Allsop D. (2001). *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* 30, 1163-1170.
72. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90, 11282-11286.
73. Uversky V.N., Lee H.J., Li J., Fink A.L., Lee S.J. (2001). Stabilization of Partially Folded Conformation during α -Synuclein Oligomerization in Both Purified and Cytosolic Preparations. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 43495-43498.
74. Uversky V.N., Li J., Fink A.L. (2001). Evidence for a Partially Folded Intermediate in α -Synuclein Fibril Formation. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 10737-10744.
75. Vonèche V., Portetelle D., Kettman R., Willems L., Limbach K., Paoletti E., Ruyschaert J.M., Burny A., Brasseur R. (1992). Fusogenic segment of bovine leukemia virus and simian immunodeficiency virus are interchangeable and mediate fusion by means of oblique insertion in the lipid bilayer of their target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89, 3810-3814. A
76. Wetzel R. (2002). Ideas of order for amyloid fibril structure. *Structure* 10, 1031-1036.
77. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99, 3563-3568.
78. Wood S.J., Wypych J., Steavenson S., Louis J.C., Citron M., Biere A.L. (1999). α -Synuclein Fibrillogenesis Is Nucleation-dependent. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 19509-19512.
79. Zerovnik E. (2002). Amyloid-fibril formation. Proposed mechanisms and relevance to conformational disease. *European Journal of Biochemistry* 269, 3362-3371.

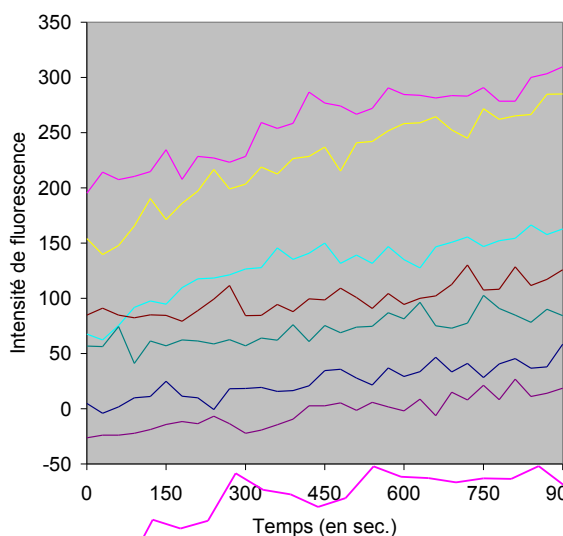
Annexes

Mesures de fusion de phase lipidique

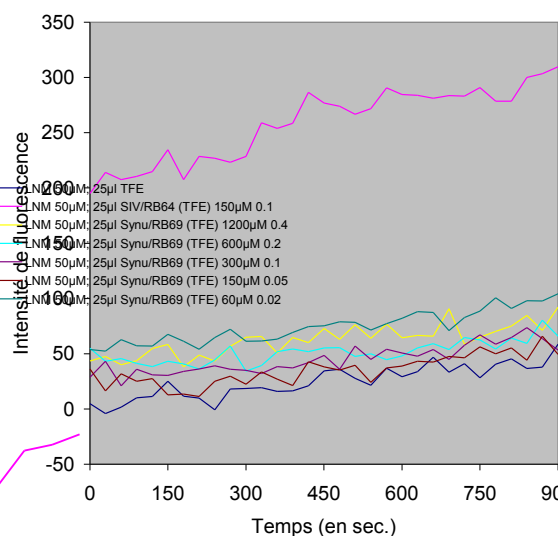
RB69 : LUV C pH 7,4

Mesures du 050503

TFE

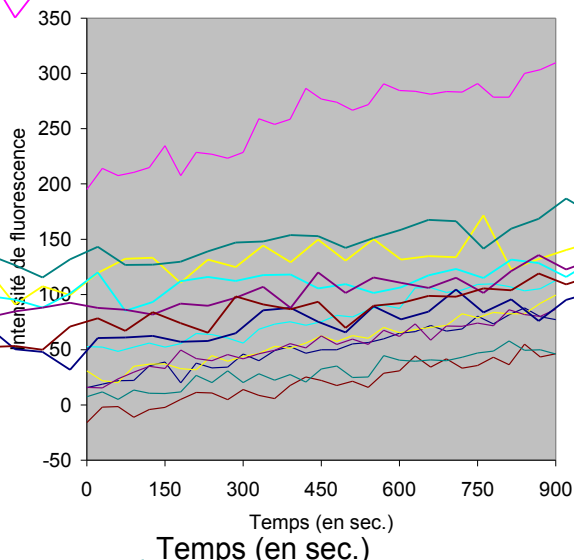


HFP/TFE



- LNM 50µM; 25µl TFE
- LNM 50µM; 25µl SIV/RB64 (HFP/TFE) 0.1
- LNM 50µM; 25µl Synu/RB69 (HFP/TFE) 1200µM 0.4
- LNM 50µM; 25µl Synu/RB69 (HFP/TFE) 600µM 0.2
- LNM 50µM; 25µl Synu/RB69 (HFP/TFE) 300µM 0.1
- LNM 50µM; 25µl Synu/RB69 (TFE) 150µM 0.05
- LNM 50µM; 25µl Synu/RB69 (TFE) 60µM 0.02

DMSO

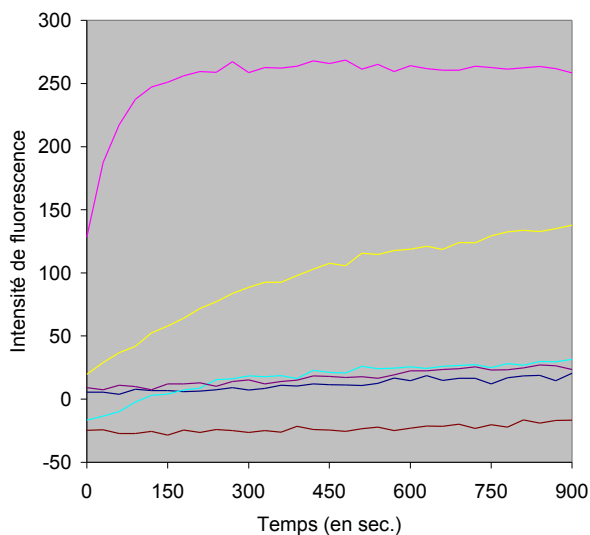


- Solvant
- SIV à 150µM; R = 0.05
- α-Synucléine à 1200µM; R = 0.4
- α-Synucléine à 600µM; R = 0.2
- α-Synucléine à 300µM; R = 0.1
- α-Synucléine à 150µM; R = 0.05
- α-Synucléine à 60µM; R = 0.02

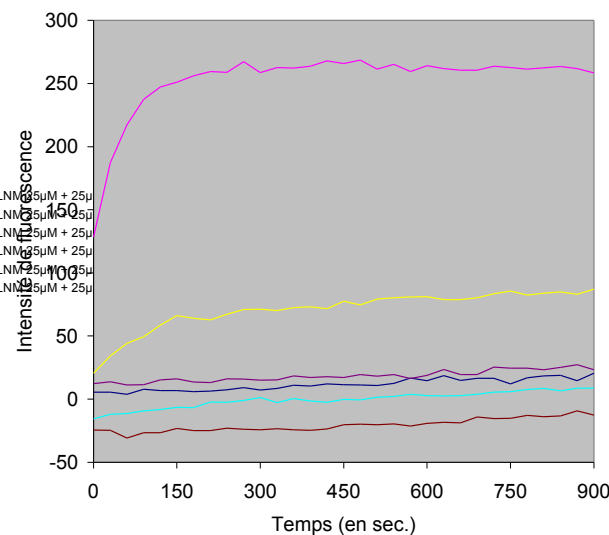
	TFE	HFP/TFE	DMSO
1200µM	285.1	92.2	99.4
600µM	166.5	80.3	112.6
300µM	26.8	73.8	86.6
150µM	130.4	65.9	55.1
60µM	102.5	104.3	57.9
Solvant	58.6	58.6	87.8

Mesures du 090204

TFE

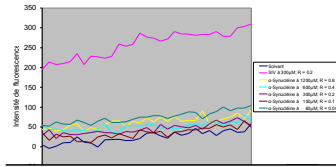


HFP/TFE



- LNM 25µM + 25µL TFE
- LNM 25µM + 25µL SIV
- LNM 25µM + 25µL Sy 1200µM
- LNM 25µM + 25µL Sy 600µM
- LNM 25µM + 25µL Sy 300µM
- LNM 25µM + 25µL Sy 150µM

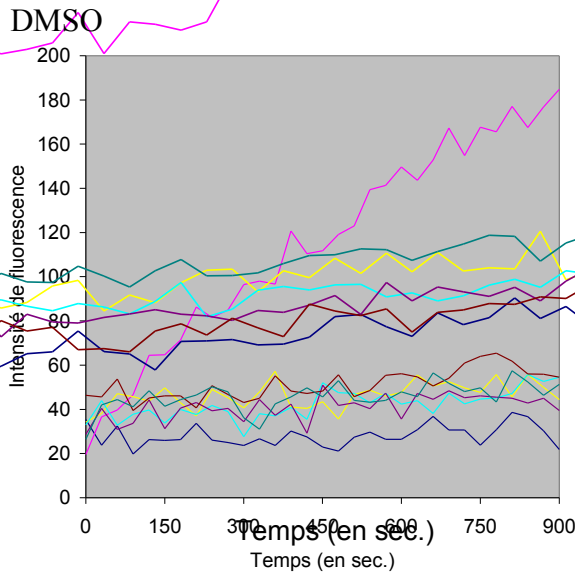
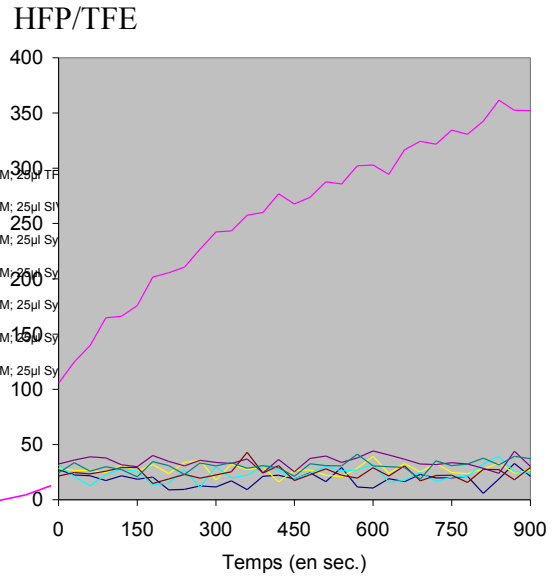
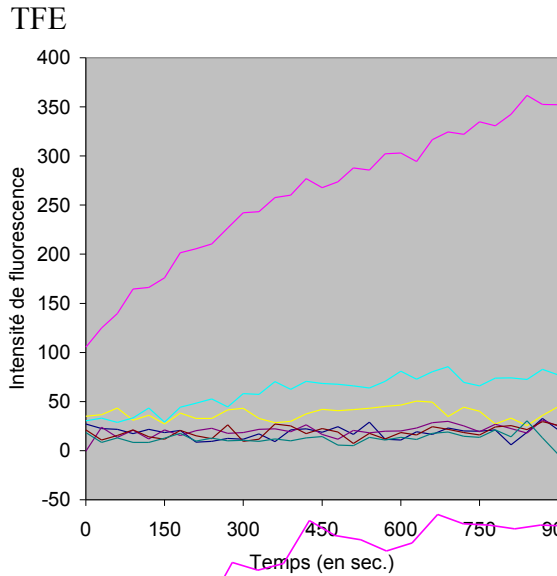
Mesures de fusion de phase lipidique



	TFE	HFP/TFE
1200µM	137.7	87.2
600µM	31.6	8.8
300µM	27.0	27.3
150µM	-16.3	-9.2
Solvant	20.7	20.7

RB69 : LUV NC pH 7,4

Mesures du 290403



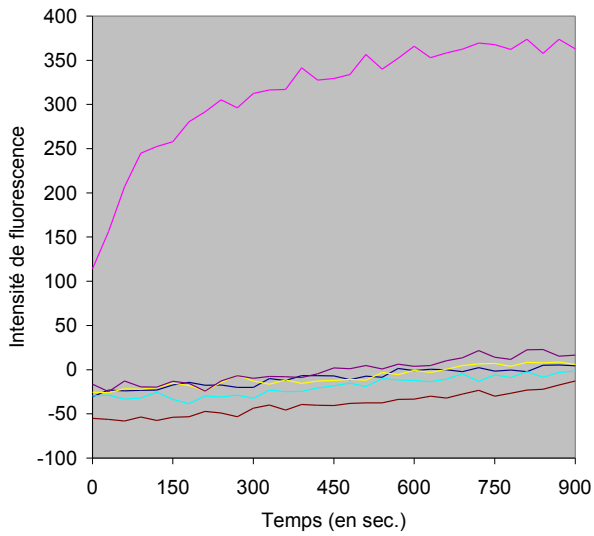
	TFE	HFP/TFE	DMSO
1200µM	50.4	39.4	57.2
600µM	85.6	39.3	55.7
300µM	31.3	44.2	50.9
150µM	29.6	43.0	65.5
60µM	30.5	41.4	57.5
Solvant	32.9	32.9	38.6

Intensité de fluorescence

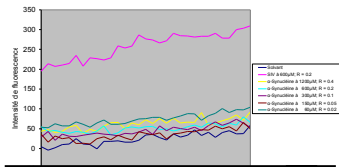
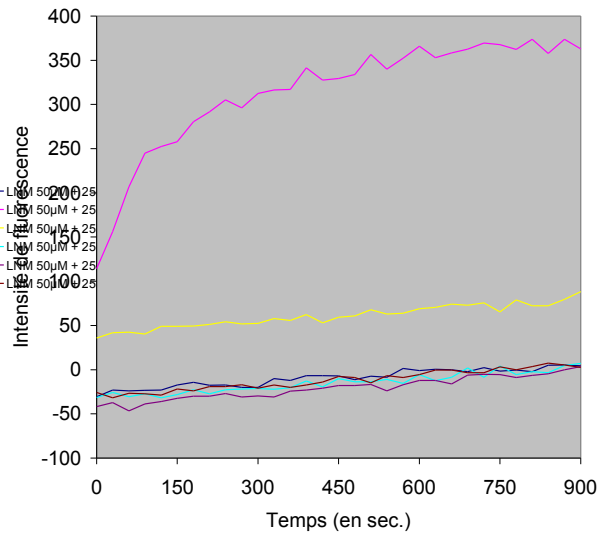
Mesures de fusion de phase lipidique

Mesures du 140104

TFE



HFP/TFE

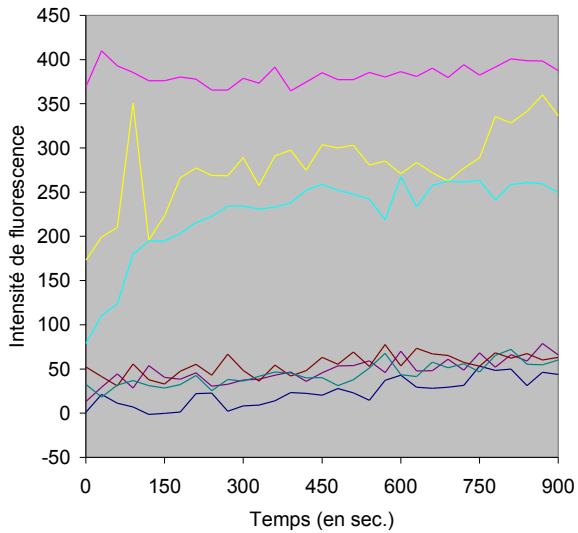


	TFE	HFP/TFE
1200 μ M	8.7	88.4
600 μ M	-1.5	7.1
300 μ M	22.9	3.4
150 μ M	-12.9	7.5
Solvant	5.5	5.5

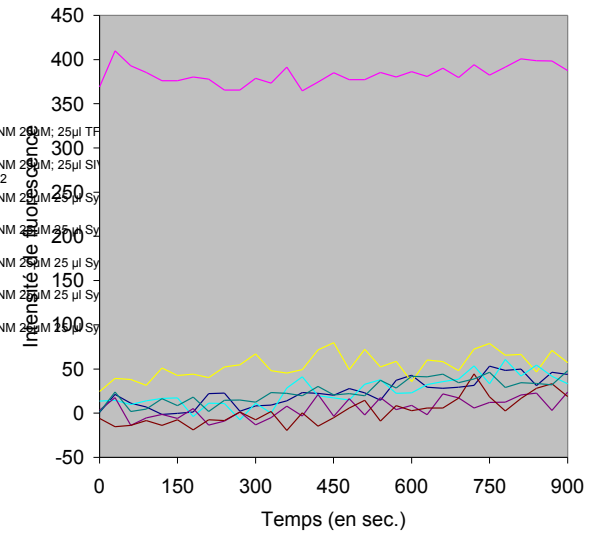
RB69 : SUV C pH 7,4

Mesures du 130503

TFE

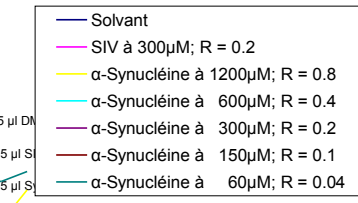
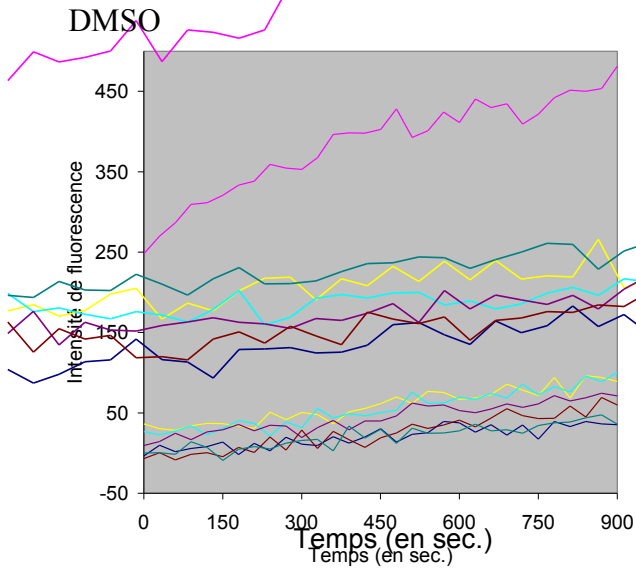


HFP/TFE



Mesures de fusion de phase lipidique

Intensité de fluorescence

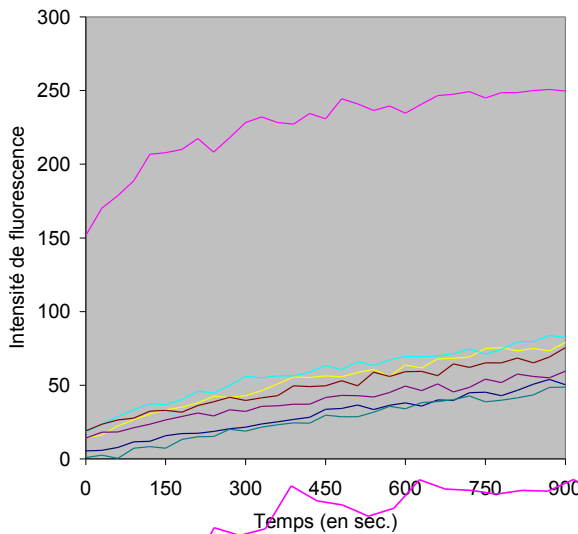


	TFE	HFP/TFE	DMSO
1200µM	360.0	79.9	96.6
600µM	267.2	60.8	100.4
300µM	79.0	24.0	74.5
150µM	77.8	44.5	69.0
60µM	72.3	47.9	47.7
Solvant	53.3	53.3	39.5

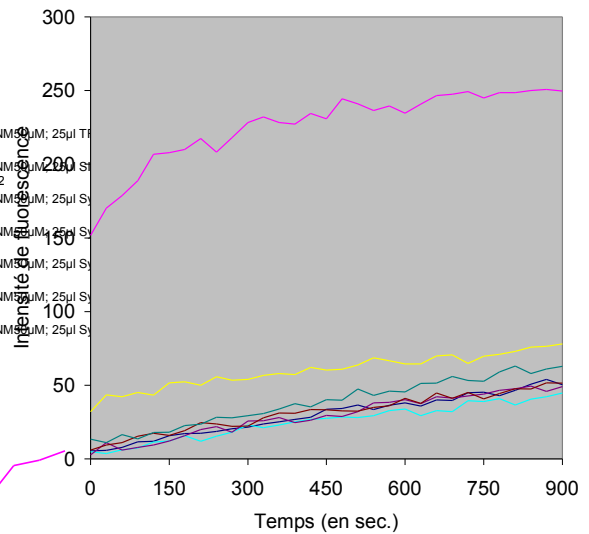
RB69 : SUV NC pH 7,4

Mesures du 050603

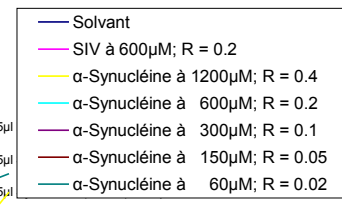
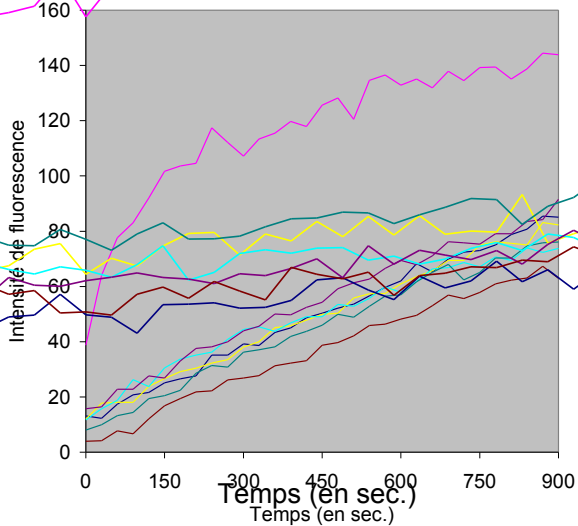
TFE



HFP/TFE



DMSO



	TFE	HFP/TFE	DMSO
1200µM	79.1	78.1	83.1
600µM	83.9	44.8	73.9
300µM	59.5	49.5	91.5
150µM	75.6	51.7	67.3
60µM	48.7	63.1	76.1
Solvant	54.0	54.0	85.5

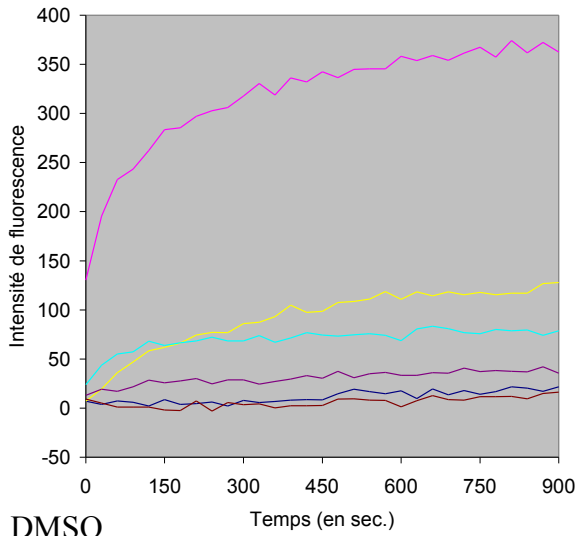
Intensité de fluorescence

Mesures de fusion de phase lipidique

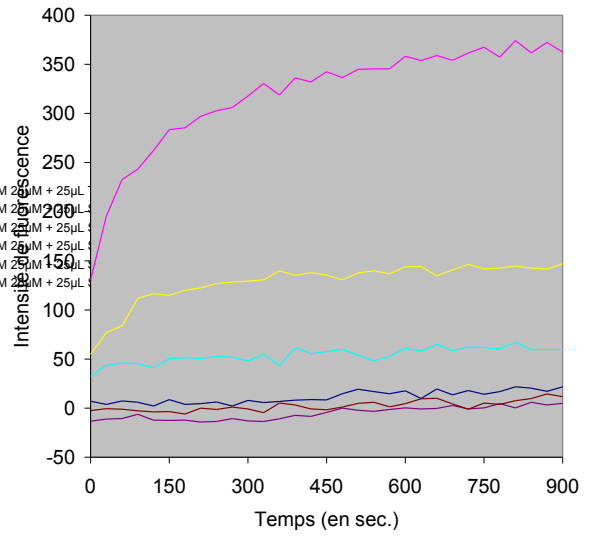
RB83 : LUV C pH 7,4

Mesures du 020704

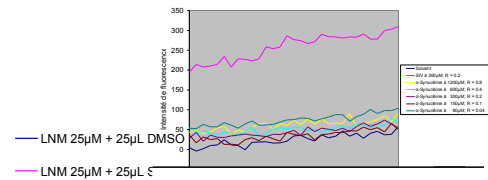
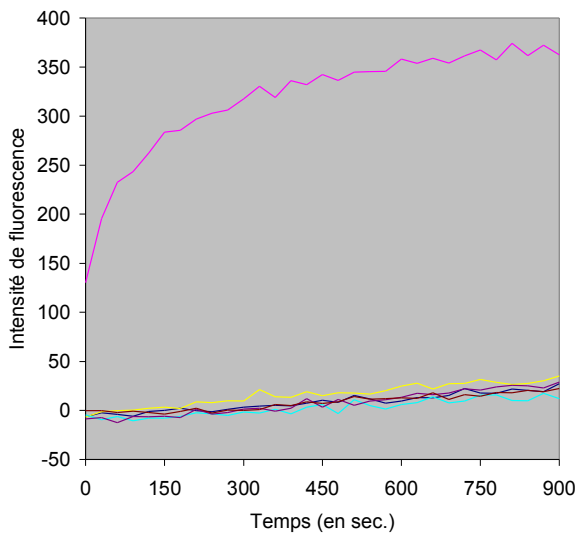
TFE



HFP/TFE



DMSO

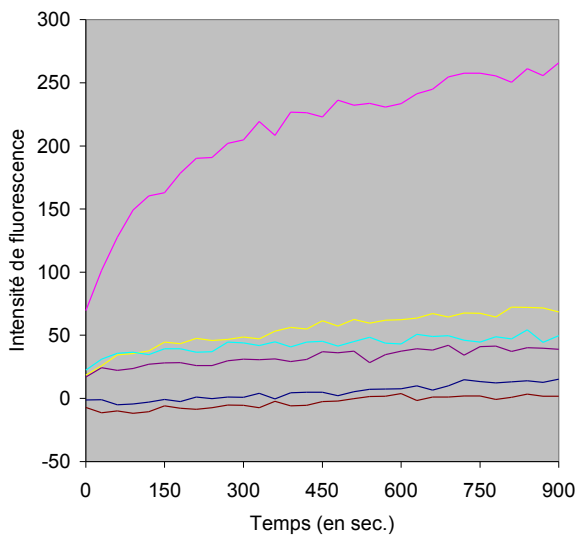


	TFE	HFP/TFE	DMSO
1200µM	127.9	146.9	35.1
600µM	83.3	67.0	17.5
300µM	42.2	6.1	29.0
150µM	16.3	14.3	22.5
Solvant	21.8	21.8	27.3

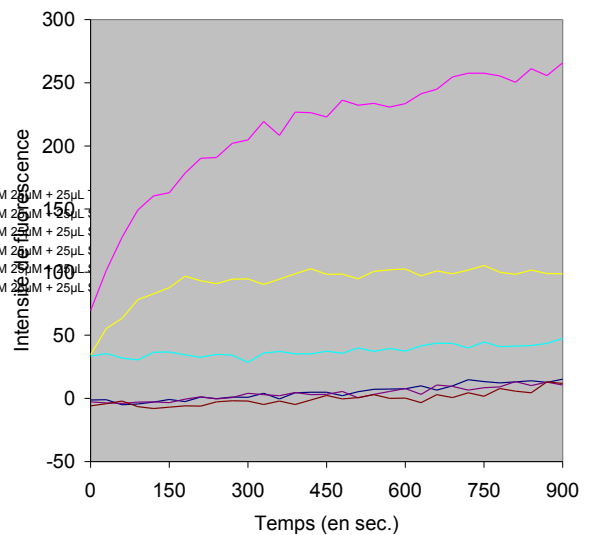
RB83 : LUV NC pH 7,4

Mesures du 020704

TFE

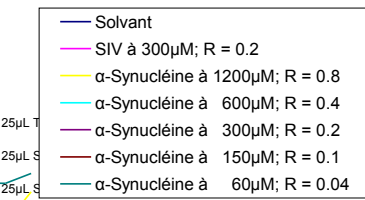
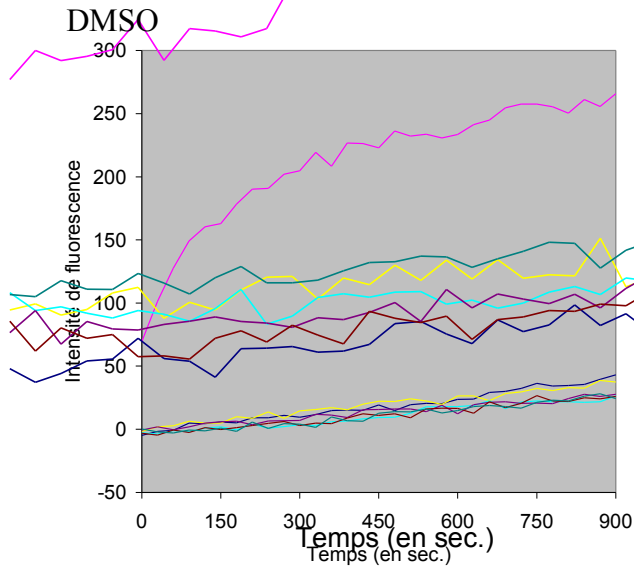


HFP/TFE



Mesures de fusion de phase lipidique

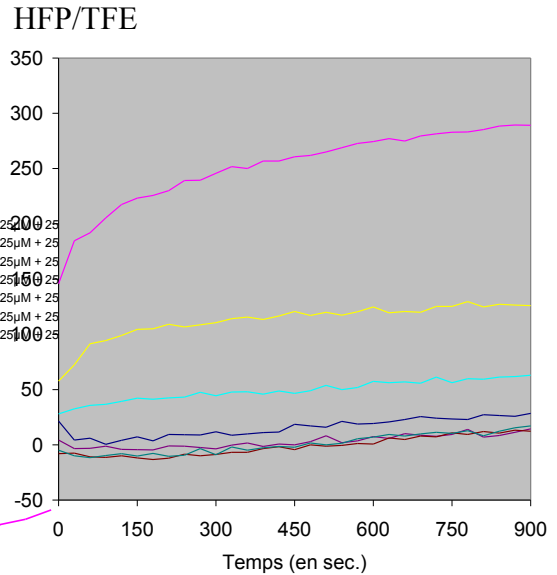
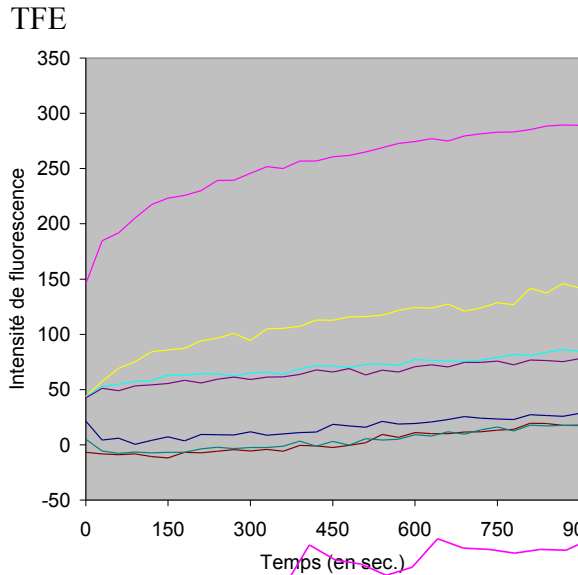
Intensité de fluorescence



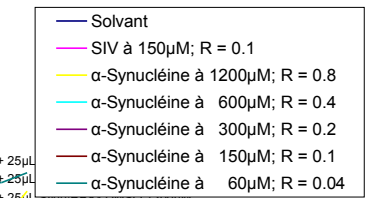
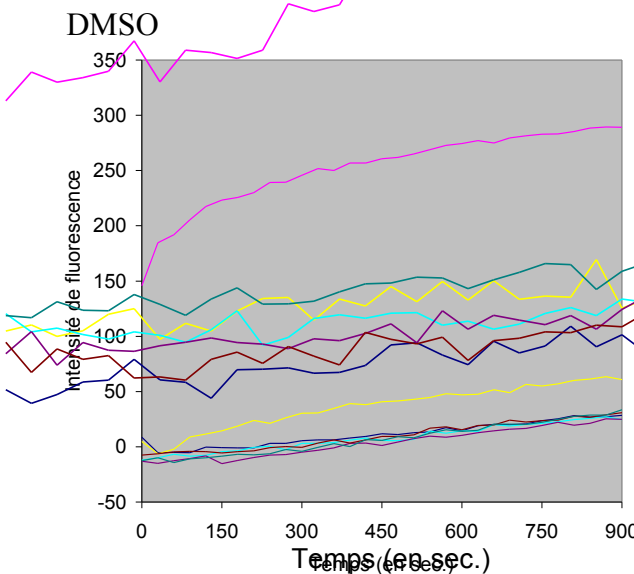
	TFE	HFP/TFE	DMSO
1200µM	72.3	105.2	38.8
600µM	54.4	47.6	26.6
300µM	42.1	13.3	27.8
150µM	3.8	13.3	26.6
60µM			28.1
Solvant	15.3	15.3	43.2

RB83 : SUV C pH 7,4

Mesures du 230604



Intensité de fluorescence



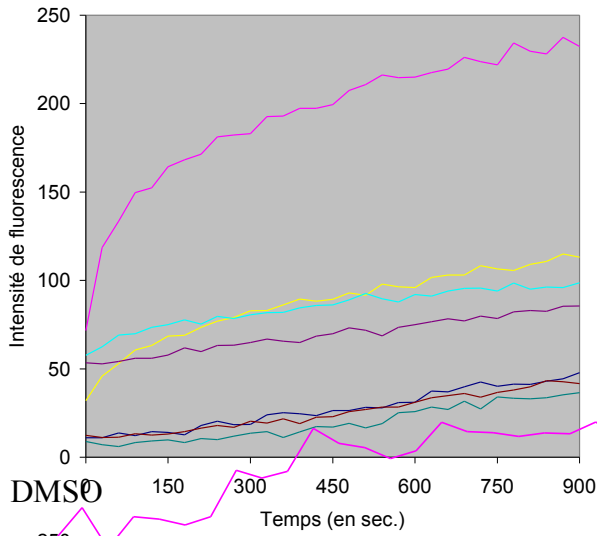
	TFE	HFP/TFE	DMSO
1200µM	146.1	129.6	63.4
600µM	86.2	63.1	27.1
300µM	78.0	14.5	25.4
150µM	19.6	13.1	30.8
60µM	17.8	17.1	33.5
Solvant	28.5	28.5	28.5

Mesures de fusion de phase lipidique

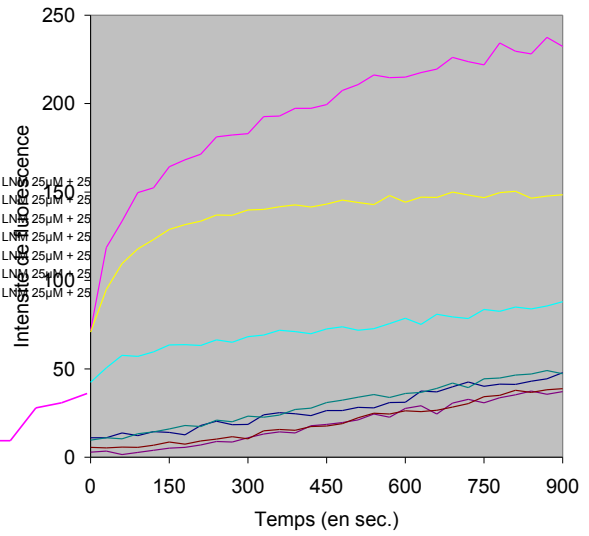
RB83 : SUV NC pH 7,4

Mesures du 230604

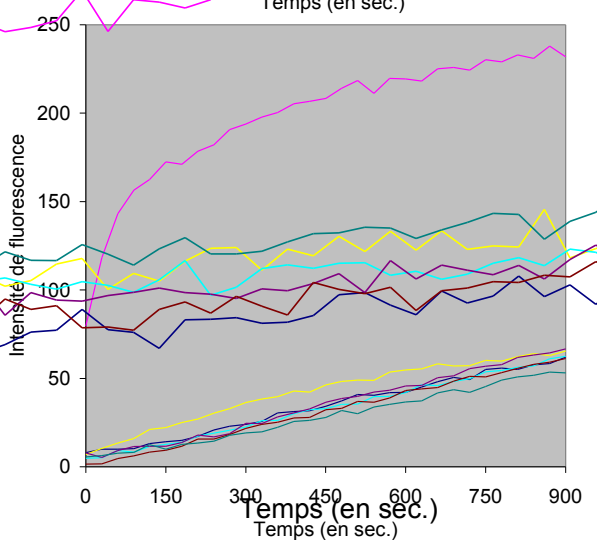
TFE



HFP/TFE



DMSO



- Solvant
- SIV à 300µM; R = 0.2
- α-Synucléine à 1200µM; R = 0.8
- α-Synucléine à 600µM; R = 0.4
- α-Synucléine à 300µM; R = 0.2
- α-Synucléine à 150µM; R = 0.1
- α-Synucléine à 60µM; R = 0.04

	TFE	HFP/TFE	DMSO
1200µM	114.9	150.4	65.5
600µM	98.7	88.1	62.4
300µM	85.4	37.4	66.7
150µM	43.4	38.8	61.4
60µM	36.6	49.0	53.5
Solvant	47.8	47.8	62.0

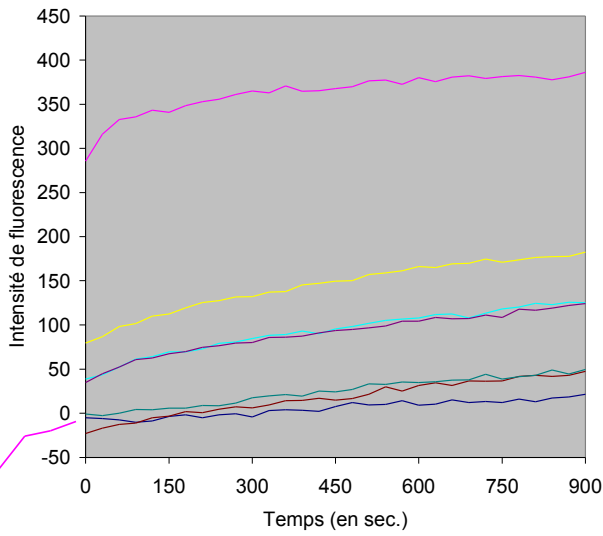
Intensité de fluorescence

Mesures de fusion de phase lipidique

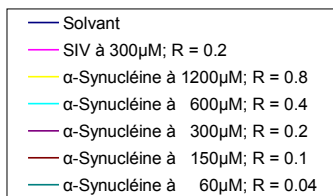
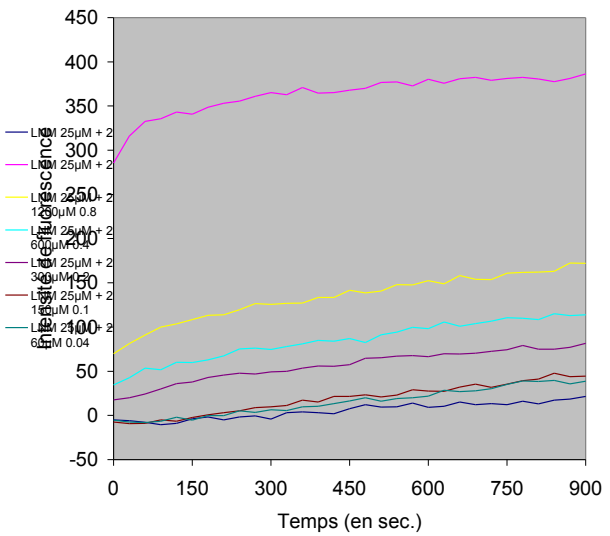
SM1466-1a : SUV C PIP₂ pH 7,4

Mesures du 110804

TFE



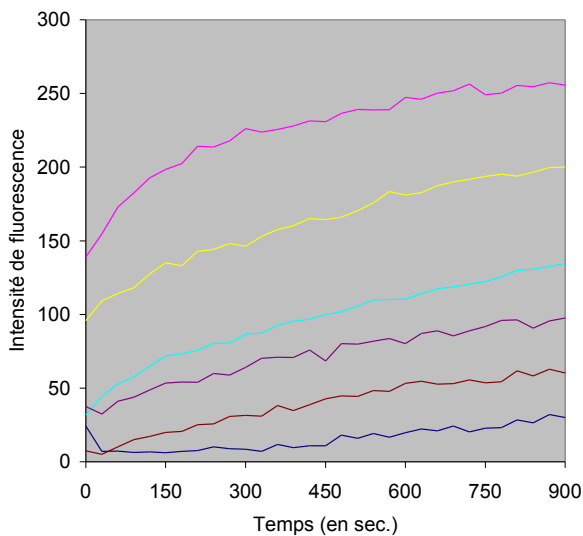
HFP/TFE



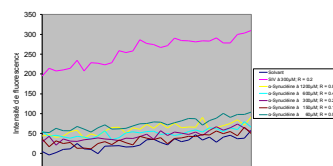
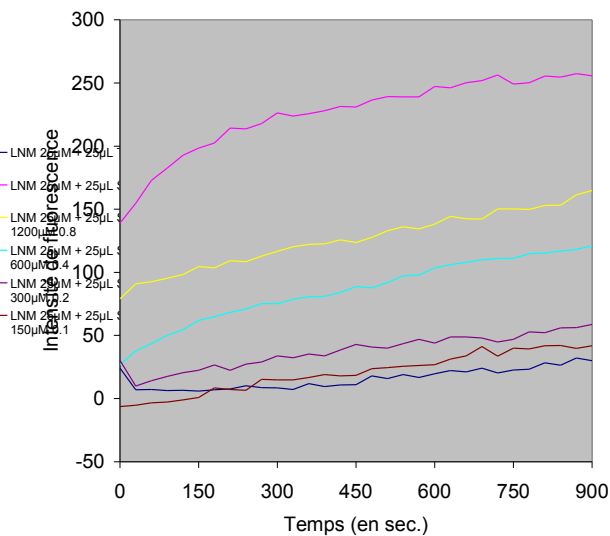
	TFE	HFP/TFE
1200	182.4	172.3
600	125.8	115.0
300	124.2	81.6
150	47.5	47.8
60	49.6	39.6
Solvant	21.4	21.4

Mesures du 120804

TFE



HFP/TFE



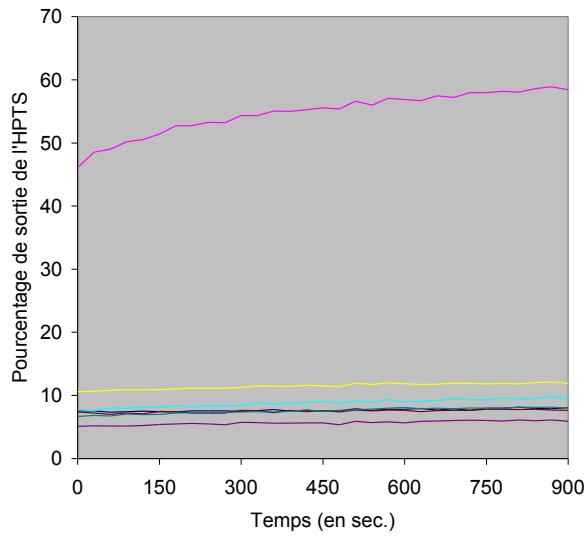
	TFE	HFP/TFE
1200	200.0	164.8
600	134.5	121.0
300	97.6	58.8
150	62.8	42.2
Solvant	32.2	32.2

Mesures de perméabilité

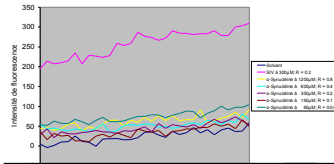
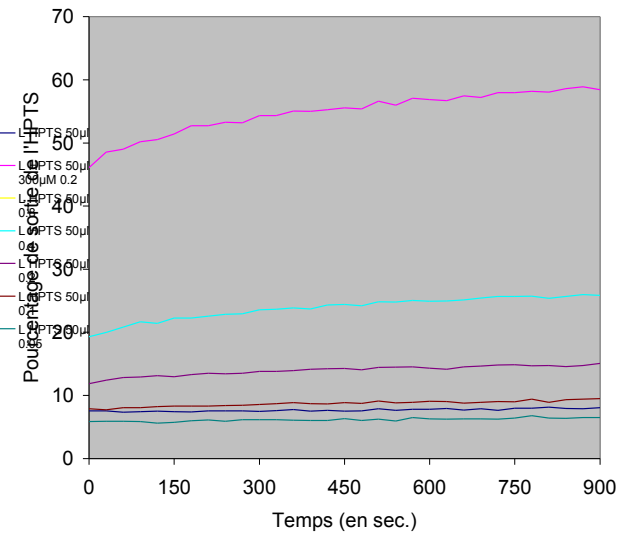
RB69 : SUV C pH 7,4

Mesures du 260603

TFE



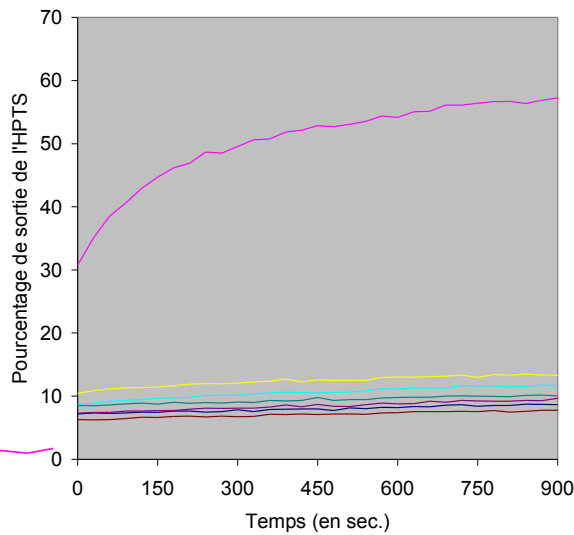
HFP/TFE



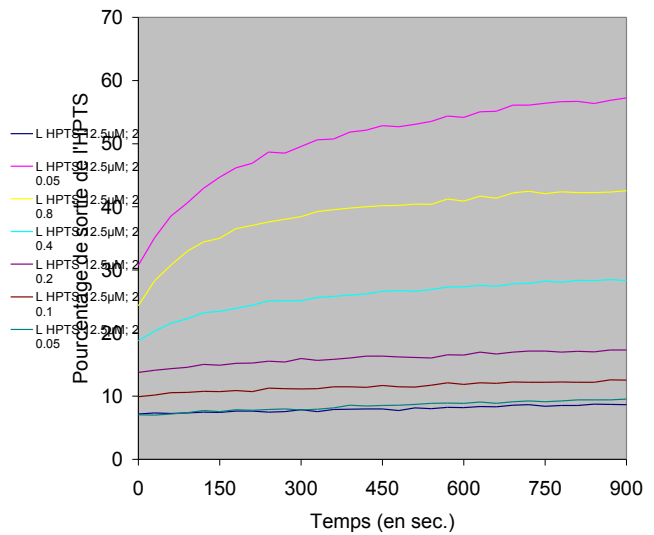
	TFE	HFP/TFE
1200µM	12.2	
600µM	9.9	26.0
300µM	6.1	15.1
150µM	7.8	9.5
60µM	8.2	6.8
Solvant	8.1	8.1

Mesures du 030703

TFE



HFP/TFE



— Solvant
— SIV à 60µM; R = 0.16
— α-Synucléine à 1200µM; R = 3.2
— α-Synucléine à 600µM; R = 1.6
— α-Synucléine à 300µM; R = 0.8
— α-Synucléine à 150µM; R = 0.4
— α-Synucléine à 60µM; R = 0.16

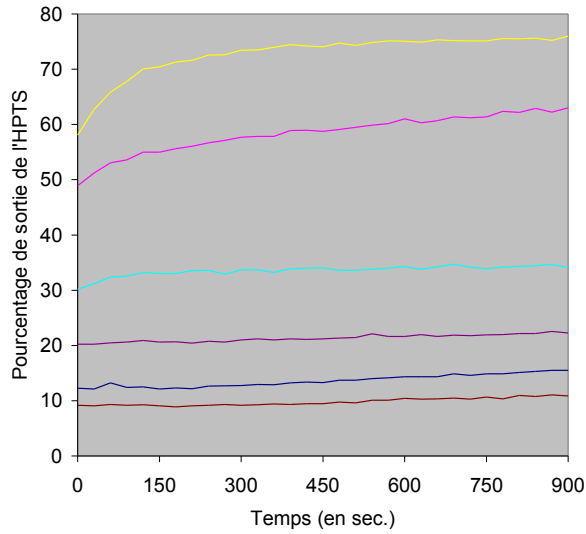
	TFE	HFP/TFE
1200µM	13.5	42.5
600µM	11.8	28.5
300µM	9.7	17.3
150µM	7.8	12.6
60µM	10.2	9.6
Solvant	8.8	8.8

Mesures de perméabilité

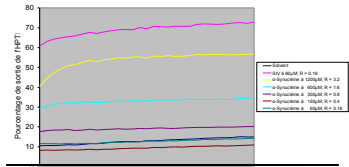
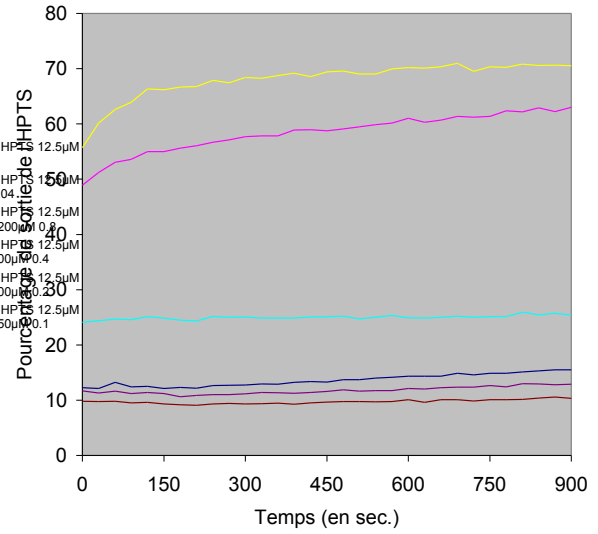
RB83 : LUV C pH 7,4

Mesures du 110804

TFE



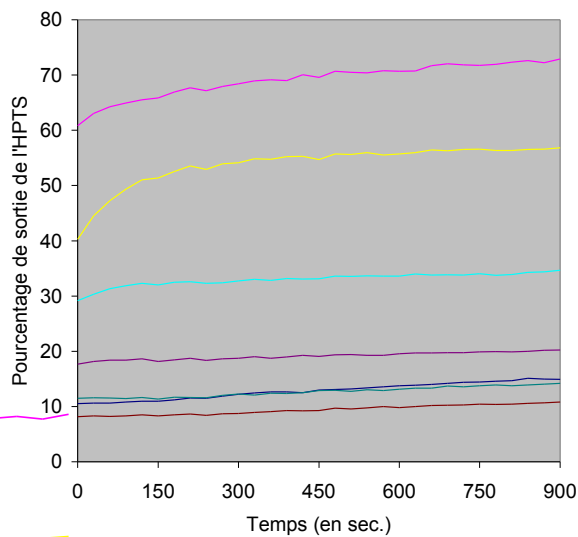
HFP/TFE



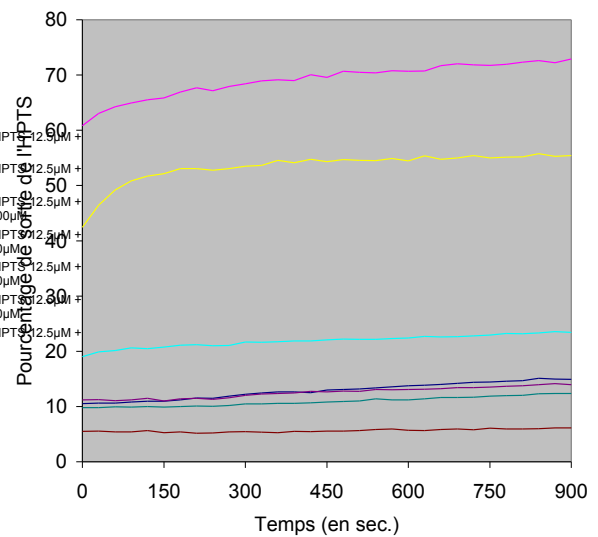
	TFE	HFP/TFE
1200µM	76.0	71.0
600µM	34.7	25.9
300µM	22.5	13.0
150µM	11.0	10.5
Solvant	15.5	15.5

Mesures du 120804

TFE



HFP/TFE



— Solvant
— SIV à 60µM; R = 0.16
— α-Synucléine à 1200µM; R = 3.2
— α-Synucléine à 600µM; R = 1.6
— α-Synucléine à 300µM; R = 0.8
— α-Synucléine à 150µM; R = 0.4
— α-Synucléine à 60µM; R = 0.16

	TFE	HFP/TFE
1200µM	56.8	55.8
600µM	34.6	23.6
300µM	20.2	14.2
150µM	10.8	6.2
60µM	14.2	12.4
Solvant	15.1	15.1