

COMMUNAUTE FRANÇAISE DE BELGIQUE  
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE  
FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLoux

# Détection et caractérisation de peptides obliques au sein de protéines amyloïdogéniques

Jean-Marc CROWET

Essai présenté en vue de l'obtention du grade de docteur  
en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteurs : Pr. Robert Brasseur  
Dr. Laurence Lins

2008



**Crowet Jean-Marc (2008).** Détection et caractérisation de peptides obliques au sein de protéines amyloïdogéniques (thèse de doctorat). Gembloux Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 151 p., 20 tabl., 68 fig.

**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. Ces phénomènes ne sont pas encore complètement expliqués tant au niveau énergétique que structural.

Les peptides obliques sont de courts fragments protéiques de 11 à 19 acides aminés qui sont capables de s'insérer obliquement dans les membranes biologiques et de les déstabiliser. Récemment, des peptides obliques ont été mis en évidence dans deux protéines amyloïdogéniques responsables de maladies neurodégénératives. Il s'agit du peptide  $\beta$  amyloïde, qui cause la maladie d'Alzheimer, et de la protéine PrP, agent de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

Au sein des protéines amyloïdogéniques, les peptides obliques pourraient être impliqués dans l'effet neurotoxique de ces protéines. En affectant directement la membrane cellulaire grâce à leurs propriétés déstabilisatrices, ils conduiraient à la mort cellulaire. D'autre part, les peptides obliques pourraient aussi être impliqués dans le processus de transconformation de ces protéines.

Le but de ce travail est de mettre en évidence des fragments obliques parmi d'autres protéines amyloïdogéniques décrites dans la littérature, par des méthodes de modélisation moléculaire puis d'étudier expérimentalement les propriétés de plusieurs de ces peptides vis-à-vis des liposomes, ainsi que leur structure et leur toxicité. Ce travail a également permis de poser les bases d'une méthode de détection automatique des peptides obliques. A l'issue de cette étude, 22 peptides obliques, appartenant à 18 protéines amyloïdogéniques différentes, ont pu être mis en évidence parmi un ensemble de 53 protéines étudiées, et 7 peptides obliques ont été étudiés expérimentalement. Les résultats renforcent l'hypothèse d'une implication de certains peptides obliques dans les phénomènes de transconformation et/ou de toxicité associés aux protéines amyloïdogéniques.

**Crowet Jean-Marc (2008).** Detection et characterization of tilted peptides in amyloid proteins (thèse de doctorat in French). Gembloux, Belgium **Gembloux Agricultural Faculty**, 151 p., 20 tabl., 68 fig.

**Summary :** The study of amyloidogenic proteins is of interest in biochemistry because these proteins undergo conformational changes and aggregation. Both processes are largely implicated in several diseases including Alzheimer's, Parkinson's or Creutzfeldt-Jakob's disease. These phenomena are not completely understood, either at a structural or energetical point of view.

Tilted peptides are short protein fragment (11 to 19 residues) that adopt a tilted orientation when inserted into biological membranes and destabilise them. Recently, tilted peptides have been detected in two amyloidogenic proteins involved in neurodegenerative diseases; the amyloid  $\beta$  peptide responsible for Alzheimer's disease, and the PrP protein that causes Creutzfeldt-Jakob's disease.

Tilted peptides could be responsible for the neurotoxic effects of these proteins. Due to their destabilising properties, they could interact directly with the membrane leading to cell death. Tilted peptides could also be involved in the conformational process of the proteins.

The aim of this work is to detect tilted fragments in other amyloidogenic proteins by molecular modelling and to study some of these peptides experimentally to evidence their lipid destabilizing properties, their structure and their toxicity. In addition, this work enable the design of an automatic method of detection for tilted peptides. Twenty-two tilted peptides from 18 different proteins have been detected among 53 amyloidogenic proteins and 7 peptides were tested experimentally. The results support the hypothesis that some tilted peptides could be involved in transconformational processes and/or cytotoxicity related to amyloidogenic proteins.

**Copyright :** *Aux termes de la loi belge du 22 mars 1886, sur le droit d'auteur, seul l'auteur a le droit de reproduire cet ouvrage ou d'en autoriser la reproduction de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous une autre forme est donc faite en violation de la loi.*

## ***Remerciements***

A l'issue de ce travail, je tiens tout d'abord à remercier le professeur Robert Brasseur, directeur du Centre de Biophysique Moléculaire Numérique de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, qui m'a permis de réaliser cette thèse de doctorat au sein du CBMN, pour son accueil et son soutien.

Je souhaite remercier le docteur 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 ainsi que de l'article scientifique associé.

J'exprime toute ma gratitude à mes deux rapporteurs, Martine Nguyen, professeur à l'Université de Liège et Magali Deleu, chercheur qualifié FNRS à la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, pour avoir accepté d'évaluer mon travail et je remercie les professeurs André Théwis, Michel Paquot et Daniel Portetelle de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux pour avoir accepté de participer à mon jury.

Merci à tous les membres présents et passés de l'équipe du CBMN et plus particulièrement Christelle Flore, pour son aide précieuse au sein du laboratoire, Didier Bastogne et Gaëtan Gillet, pour leur aide et leurs conseils en informatique et programmation, Jean-Marc Delseth, Colette Zeches et Viviane Godecharles, pour leur aide au niveau administratif, et Nicolas Delsaux, Sébastien Deshayes, Sébastien Santini, Benoît Charlotiaux, Aurélien Lorin, Marc Decaffmeyer et Benoît Adam pour leur sens de l'humour et leur bonne humeur. Merci à Sébastien Santini pour son travail de relecture. Je tiens également à remercier Ingrid Dupiereux concernant les tests de toxicité qu'elle a réalisés au sein du CRPP de l'ULg.

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans les soutiens financiers qu'ont bien voulu m'octroyer le Fonds National de la Recherche Scientifique, par l'intermédiaire d'une bourse FRIA, et la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, par l'intermédiaire d'une bourse de doctorat de 6 mois durant les années 2007 et 2008.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, mes amis pour leur soutien tout au long de cette thèse et plus particulièrement Elisa, pour son amour et son aide précieuse durant ces années.



# Table des matières

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>I.1. Protéines amyloïdogéniques et fibrilles amyloïdes</b>	<b>1</b>
I.1.1. Définition du terme “Amyloïde”	1
I.1.2. Caractéristiques des protéines amyloïdogéniques et structures amyloïdes	4
I.1.3. Formation des fibrilles amyloïdes	6
I.1.3.1. Cinétique de la fibrillation	6
I.1.3.2. Facteurs influençant la fibrillation	7
I.1.4. Modèles proposés pour la structure des fibrilles amyloïdes	9
I.1.5. Toxicité associée aux protéines amyloïdogéniques	12
I.1.6. Méthodes de prédiction de régions amyloïdes	13
<b>I.2. Protéines amyloïdogéniques et maladies neurodégénératives</b>	<b>15</b>
I.2.1. Le peptide $\beta$ amyloïde	15
I.2.1.1. Génération du peptide $\beta$ amyloïde	15
I.2.1.2. Mutations et protéines impliquées dans la maladie d’Alzheimer	17
I.2.1.3. Conformations du peptide $\beta$ amyloïde	18
I.2.2. L’ $\alpha$ -synucléine	20
I.2.2.1. Pathologies associées à l’ $\alpha$ -synucléine	20
I.2.2.2. Structure de l’ $\alpha$ -synucléine	22
I.2.2.3. Mise en évidence d’un peptide amyloïdogénique	24
<b>I.3. Protéines prions</b>	<b>26</b>
I.3.1. La protéine PrP	26
I.3.1.1. Découverte des prions	28
I.3.1.2. Conformations de la protéine PrP	29
I.3.1.3. La barrière inter-espèce et les souches de prions	32
I.3.2. Les protéines prions de champignons	33
I.3.2.1. Description des prions de champignons	34
I.3.2.2. Propriétés des prions et structures amyloïdes	35
I.3.2.3. Le rôle des chaperonnes	36
I.3.2.4. La barrière inter-espèce et les souches de prions	36
I.3.2.5. Fonctions biologiques des prions de champignons	38
<b>I.4. Les peptides obliques</b>	<b>39</b>
I.4.1. Propriétés des peptides obliques	39

I.4.2. Importance biologique des peptides obliques	41
I.4.3. Hypothèses sur le(s) rôle(s) des peptides obliques au sein des protéines amyloïdogéniques	42
<b>II. BUT DU TRAVAIL</b>	<b>44</b>
<hr/>	
<b>III. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>45</b>
<hr/>	
<b>III.1. Matériel</b>	<b>45</b>
III.1.1. <i>In silico</i>	45
III.1.2. Partie expérimentale	45
<b>III.2. Méthodes</b>	<b>47</b>
III.2.1. Analyse de la séquence	47
III.2.1.1. La méthode HCA (Hydrophobic Cluster Analysis)	47
III.2.1.2. La méthode H $\alpha$ de Jähnig	48
III.2.1.3. Les prédictions de structures secondaires	49
III.2.1.4. Détermination de l'hydrophobicité moyenne <H>	49
III.2.2. Approche de modélisation moléculaire	<b>50</b>
III.2.2.1. Construction et minimisation des peptides	50
III.2.2.2. Méthode IMPALA	50
a) Représentation de la bicouche lipidique	50
b) Contrainte de perturbation lipidique	51
c) Contrainte hydrophobe	52
III.2.2.3. Nappe des contraintes	52
III.2.2.4. Optimisation par dynamique angulaire	52
III.2.2.5. Procédure stochastique de prédiction de structure	53
III.2.3. Méthodes expérimentales	<b>55</b>
III.2.3.1. Préparation des liposomes	55
a) Les liposomes multilamellaires (MLV)	55
b) Les liposomes unilamellaires de grande taille (LUV)	55
c) Les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV)	56
III.2.3.2. Détermination de la concentration en phospholipides	56
III.2.3.3. Mesures de fusion de phase lipidique	56
III.2.3.4. Mesures de perméabilité lipidique	57
III.2.3.5. Mesures de cytotoxicité	59
a) Culture cellulaire	59



b) Test de viabilité cellulaire	59
III.2.3.6. Mesures de dichroïsme circulaire	60
<b>IV. RESULTATS</b>	<b>62</b>
<b>IV.1. Mise au point d'une méthode de détection automatique des peptides obliques</b>	<b>62</b>
<b>IV.2. Recherche de peptides obliques</b>	<b>67</b>
IV.2.1. Protéines amyloïdogéniques et analyse de séquence	67
IV.2.2. L'α-synucléine	74
IV.2.2.1. Analyse de séquence	74
IV.2.2.2. Modélisation moléculaire des peptides	74
IV.2.2.3. Mesures de fusion de phase lipidique et perméabilité	78
IV.2.2.4. Mesures de cytotoxicité <i>in vitro</i>	80
IV.2.2.5. Détermination de la structure secondaire	80
IV.2.3. La protéine Sup35	82
IV.2.3.1. Mesures de fusion de phase lipidique et perméabilité	83
IV.2.3.2. Mesures de cytotoxicité <i>in vitro</i>	84
IV.2.3.3. Détermination de la structure secondaire	85
IV.2.4. La protéine Ure2	86
IV.2.4.1. Mesures de fusion de phase lipidique et perméabilité	87
IV.2.4.2. Mesures de cytotoxicité <i>in vitro</i>	88
IV.2.4.3. Détermination de la structure secondaire	89
IV.2.5 La protéine HET-s	90
IV.2.5.1. Analyse de séquence	90
IV.2.5.2. Modélisation moléculaire des peptides	90
IV.2.5.3. Mesures de fusion de phase lipidique et perméabilité	92
IV.2.5.4. Mesures de cytotoxicité <i>in vitro</i>	93
IV.2.5.5. Détermination de la structure secondaire	94
IV.2.6. L'insuline	95
IV.2.6.1. Analyse de séquence	95
IV.2.6.2. Modélisation moléculaire des peptides	96
IV.2.6.3. Mesures de fusion de phase lipidique	97
IV.2.7. La transthyretine	99
IV.2.7.1. Analyse de séquence	99
IV.2.7.2. Modélisation moléculaire des peptides	100
IV.2.7.3. Mesures de fusion de phase lipidique	101

IV.2.8. La protéine HypF	102
IV.2.8.1. Analyse de séquence	102
IV.2.8.2. Modélisation moléculaire des peptides	102
IV.2.8.3. Mesures de fusion de phase lipidique	104
<b><u>V. DISCUSSION</u></b>	<b>105</b>
<b>V.1. La méthode de détection automatique des peptides obliques</b>	<b>105</b>
<b>V.2. Analyse des protéines amyloïdogéniques</b>	<b>106</b>
<b>V.3. L'α-synucléine</b>	<b>107</b>
<b>V.4. Les prions</b>	<b>111</b>
<b>V.5. Les autres protéines</b>	<b>112</b>
<b><u>VI. CONCLUSION GENERALE</u></b>	<b>114</b>
<b><u>VII. PERSPECTIVES</u></b>	<b>116</b>
<b><u>VIII. BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>118</b>
<b><u>IX. ANNEXES</u></b>	<b>136</b>
<b>Annexe I</b>	<b>136</b>
Echelle d'hydrophobicité consensus d'Eisenberg (Eisenberg D. <i>et al.</i> , 1982)	
<b>Annexe II</b>	<b>137</b>
Codes une lettre et trois lettres des acides aminés	
<b>Annexe III</b>	<b>138</b>
Code source du module sélection de la méthode de détection automatique.	
<b>Annexe IV</b>	<b>139</b>
Crowet J.M., Lins L., Dupiereux I., Elmoualija B., Lorin A., Charloteaux B., Stroobant V., Heinen E., Brasseur R. (2007). Tilted properties of the 67-78 fragment of alpha-synuclein are responsible for membrane destabilization and neurotoxicity. <i>Proteins</i> 68, 936-947.	
<b>Annexe V</b>	<b>140</b>
Charloteaux B., Lorin A., Crowet J.M., Stroobant V., Lins L., Thomas A., Brasseur R. (2006). The N-terminal 12 residue long peptide of HIV gp41 is the minimal peptide sufficient to induce significant T-cell-like membrane destabilization <i>in vitro</i> . <i>J. Mol. Biol.</i> 359, 597-609.	

## ***Liste des abréviations***

Å : angström ( $10^{-10}$  m)

AANS : acide aminonaphtylsulfonique

A $\beta$  : peptide  $\beta$  amyloïde

ABri : *british amyloid peptide*

ADan : *danish amyloid peptide*

AFM : microscopie à force atomique (*atomic force microscopy*)

Apo : apolipoprotéine

APP : protéine précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde ( *$\beta$ -amyloid precursor protein*)

ATR-FTIR : spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier en réflexion totale atténuée (*attenuated total reflection - Fourier transform infrared*)

BLV : virus de la leucémie bovine (*bovine leukemia virus*)

BSE : encéphalopathie spongiforme bovine (*bovine spongiform encephalopathy*)

C $\alpha$  : carbone  $\alpha$

CD : dichroïsme circulaire (*circular dichroism*)

CHOL : cholestérol

CJD : maladie de Creutzfeldt-Jakob (*Creutzfeldt-Jakob's disease*)

CWD : maladie débilitante chronique (*chronic wasting disease*)

DMEM : *Dulbecco's minimum Eagle medium*

DMSO : diméthylsulfoxyde

DPX : p-xylylènebis[pyridinium] bromide

EM : microscopie électronique (*electron microscopy*)

EPR : résonance paramagnétique électronique (*electronic paramagnetic resonance*)

ESST : encéphalopathies spongiformes subaïgues transmissibles

FAP : polyneuropathie amyloïdotique familiale (*familial amyloid polyneuropathy*)

FBS : sérum fœtal de bœuf (*fetal bovine serum*)

fCJD : maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale (familial CJD)

FFI : insomnie familiale fatale (*fatal familial insomnia*)

FSE : encéphalopathie spongiforme féline (*feline spongiform encephalopathy*)

FSI : insomnie sporadique fatale (*fatal sporadic insomnia*)

gp : glycoprotéine

GPI : glycosylphosphatidylinositol

GSS : maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (*Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease*)

HA2 : sous-unité membranaire de l'hémagglutinine, glycoprotéine de fusion du virus de l'influenza

HCA : analyse d'amas hydrophobes (*hydrophobic cluster analysis*)

HCHWA-D : hémorragie cérébrale héréditaire avec amyloïdose de type hollandais (*hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of the Dutch type*)

HFP : hexafluoropropanol

HGH : hormone de croissance humaine (human growth hormone)

HIV : virus de l'immunodéficience humaine (*human immunodeficiency virus*)

HPTS : acide 8-hydroxypyrrène-1,3,6-trisulfonique

HSPG : protéoglycanes à chaînes héparanes sulfates (*heparan sulfate proteoglycan*)

IAPP : polypeptide de l'amyloïde des îlots (*islet amyloid polypeptide*)

iCJD : maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogénique (iatrogenic CJD)

IMPALA : *integral membrane protein and lipid association*

LRRK2 : *leucine-rich repeat kinase 2*

LUV : liposomes unilamellaires de grande taille (*large unilamellar vesicle*)

MBM : farines de viande et d'os (meat and bone meal)

MLV : liposomes multilamellaires (*multilamellar vesicle*)

MSA : atrophie multisystématisée (*multiple system atrophy*)

MTS : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium

NAC : composant non amyloïde (*non amyloid component*)

ND : non déterminé

NDV : virus de la maladie de Newcastle (*Newcastle disease virus*)

NPS@ : *Network Protein Sequence Analysis*

PBS : tampon phosphate salin (*phosphate buffered saline*)

PDB : banque de données de protéines (*protein data bank*)

PC : phosphatidylcholine

PE : phosphatidyléthanolamine

Pho : hydrophobe

Phi : hydrophile

PI : phosphatidylinositol

Pmel17 : *Melanocyte protein Pmel 17*

PMS : phénazine méthosulfate

PrP : protéine prion  
PrP<sup>c</sup> : protéine prion sous sa forme cellulaire  
PrP<sup>sc</sup> : protéine prion sous sa forme infectieuse (scrapie)  
PS : phosphatidylsérine  
PS : préséniline (PS1 et PS2)  
R18 : octadecylrhodamine chloride B  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
RMS : racine carrée de la moyenne du carré (*root mean square*)  
RNQ1 : *rich in asparagine and glutamine protein 1*  
ROS : molécules oxygénées réactives (*reactive oxygen species*)  
Rx : rayons X  
SAP : protéine amyloïde P du sérum (*serum amyloid P*)  
Sc : scrapie  
sCJD: maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique (sporadic CJD)  
SDS : sodium dodécylsulfate  
SH3 : *Src homology 3 domain*  
SIV : virus de l'immunodéficience simienne (*simian immunodeficiency virus*)  
SM : sphingomyéline  
SRS : *sequence retrieval system*  
SSEs : éléments de structure secondaire (*secondary structure elements*)  
SUV : liposomes unilamellaires de petite taille (*small unilamellar vesicle*)  
SynuM53 : mutant 53 du peptide oblique de l' $\alpha$ -synucléine  
TFE : trifluoroéthanol  
ThT : thioflavine T  
TME : encéphalopathie transmissible du vison (transmissible mink encephalopathy)  
TTR : transthyretine  
vCJD : variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogénique (variant CJD)  
Virus du SRAS : virus du syndrome respiratoire aigu sévère (*severe acute respiratory syndrome virus*)  
WT : forme sauvage (*wild type*)



# **INTRODUCTION**





## I. Introduction

### I.1. Protéines amyloïdogéniques et fibrilles amyloïdes

#### I.1.1. Définition du terme “Amyloïde”

En 1854, Rudolph Virchow introduisit le terme “amyloïde” pour désigner des corps ronds présents dans le cerveau en raison de leur ressemblance à des granules d’amidon et de leur réaction particulière à la coloration à l’iode. Cette dénomination fut ensuite étendue à d’autres structures humaines anormales présentant les mêmes caractéristiques. Friedreich et Kekule démontrèrent rapidement que les dépôts amyloïdes sont principalement formés de protéines et, en 1970, Glenner et ses collègues identifiaient pour la première fois une protéine constitutive de dépôts amyloïdes. Il s’agissait de chaînes légères d’immunoglobuline. Depuis, le nombre de protéines amyloïdogéniques connues ne cesse de s’accroître (Kyle R.A., 2001 ; Sipe J.D. *et al.*, 2000 ; Glenner G.G. *et al.*, 1970).

La définition actuelle du terme “amyloïde”, recommandée par le comité de nomenclature de la société internationale de l’amyloïdose en 2004, se réfère aux dépôts extracellulaires de fibrilles de protéines présentant une apparence caractéristique en microscopie électronique, un spectre de diffraction aux rayons X typique et une affinité pour le rouge Congo avec une biréfringence verte concomitante (voir I.1.2.). Cette nomenclature inclut actuellement 24 protéines humaines (Tableau I) et 8 protéines animales (Westermarck P. *et al.*, 2005). Les autres protéines, dont les agrégats présentent certains caractères amyloïdes, seront préférentiellement nommées “amyloid-like”. Par exemple, les fibrilles d’ $\alpha$ -synucléine, qui forment les corps de Lewy de la maladie de Parkinson, présentent les caractéristiques amyloïdes, hormis leur caractère extra-cytoplasmique et la capacité à lier le rouge Congo (Westermarck P., 2005). Les protéines amyloïdogéniques sont associées à des amyloïdoses, ou amyloses, classées en amyloïdoses systémiques ou localisées en fonction de la répartition des dépôts amyloïdes dans l’organisme (Tableau I).

Cependant, cette définition histopathologique pose quelques problèmes puisque des protéines sans lien avec des amyloïdoses se sont montrées capables de former des fibrilles “amyloid-like” *in vitro* ou *in vivo* et qu’il ne semble pas y avoir de différences structurales entre fibrilles amyloïdes et “amyloid-like” (Makin O.S. *et al.*, 2005 ; Sipe J.D. *et al.*, 2000). Une définition biophysique plus large inclut tout polypeptide capable d’adopter la structure

- Introduction -

“cross  $\beta$ ” caractéristique des fibrilles amyloïdes (voir I.1.2.). Celle-ci inclut donc les protéines formant des fibrilles “amyloid-like” intracellulaires ou intranucléaires et tient compte de toutes les protéines et/ou fragments capables de former des fibrilles avec une structure “cross  $\beta$ ” *in vitro* (Tableau II) (Uversky V.N. *et al.*, 2004 ; López de la Paz M. *et al.*, 2002). Plusieurs études récentes réalisées *in vitro* ont montré que des protéines, telles que l’apomyoglobine et le domaine SH3 de la phosphatidylinositol-3-kinase, pouvaient former des fibrilles sans pour autant être associées à une maladie (Fändrich M. *et al.*, 2001).

*Tableau I : Précurseurs de protéines ou peptides amyloïdogéniques chez l’homme et maladies associées (Westermarck P. et al. 2005)*

<b>Précurseur de protéines ou peptides amyloïdogéniques</b>	<b>Maladie associée</b>	<b>Dépôts systémiques (S) ou localisés (L)</b>
Les chaînes légères d’immunoglobuline	Amyloïdose AL	S, L
Les chaînes lourdes d’immunoglobine	Amyloïdose AH	S, L
La $\beta$ -2-microglobuline	Amyloïdose liée à l’hémodialyse (AH)	S (L?)
La transthyretine	Amyloïdose systémique sénile	S (L?)
La protéine amyloïde A sérique	Amyloïdose AA	S
L’apolipoprotéine AI	Amyloïdose polyneuropathique de type III (FAP III)	S, L
L’apolipoprotéine AII	Amyloïdose systémique héréditaire	S
L’apolipoprotéine AIV	Amyloïdose systémique	S
La gelsoline	Amyloïdose familiale de type finnois	S
Le lysozyme	Amyloïdose systémique héréditaire	S
La chaîne A $\alpha$ du fibrinogène	Amyloïdose rénale héréditaire	S
La cystatine C	Hémorragie cérébrale héréditaire avec amyloïdose, type islandais	S
La protéine membranaire de type 2B	Démence héréditaire britannique	S, L
La protéine APP (“Amyloid Precursor Protein”)	Maladie d’Alzheimer	L
La protéine PrP (“Prion protein”)	Maladie de Creutzfeldt-Jakob	L
La calcitonine	Cancer médullaire de la thyroïde	L
L’amyline (“Islet Amyloid Polypeptide”)	Diabète de type II	L
Le facteur atrial natriurétique	Amyloïdose atriale	L
La prolactine	Dépôts amyloïdes localisés dans les glandes pituitary	L
L’insuline	Amyloïdose localisée due à des injections d’insuline	L
La lactadherine	Amyloïdoses du média aortique	L
La kératoépithéline	Amyloïdose cornéenne	L
La lactoferrine	Amyloïdose cornéenne	L
<i>La protéine tbn</i>	<i>Tumeurs odontogéniques</i>	<i>L</i>

*La protéine tbn est en italique car il s’agit d’une protéine dont le nom est toujours provisoire.*

Toutefois, contrairement aux fibrilles amyloïdes obtenues *in vitro*, les dépôts amyloïdes formés *in vivo* ne se composent pas uniquement de la protéine amyloïde principale mais également de plusieurs autres composants additionnels. Ceux-ci incluent la protéine amyloïde P du sérum (SAP), des protéoglycanes à chaînes héparanes sulfates (HSPG) et, dans certains cas, l'apolipoprotéine E. Bien que la SAP et les protéoglycanes soient toujours présents *in vivo*, des fibrilles peuvent être formées *in vitro* en leur absence. L'importance de ces composants n'est pas claire mais certains, particulièrement le SAP et les HSPG, semblent stabiliser les fibrilles et favoriser l'amyloïdogénèse. Cependant, on ne sait pas encore s'ils agissent sur les fibrilles en croissance ou par d'autres mécanismes, par exemple en jouant sur la conformation des protéines (Sipe J.D. *et al.*, 2000 ; Westermark P., 2005).

Tableau II : Protéines précurseurs de protéines ou peptides formant des fibrilles "amyloid-like" (Uversky V.N. *et al.*, 2004 ; Huff M.E. *et al.*, 2003)

L'α-lactalbumine	Le facteur GAGA	Des peptides <i>ata de novo</i>
L'α-synucléine	La glycoprotéine B du virus de l'Herpes simplex	Des protéines <i>de novo</i> d'une librairie combinatoire
L'acylphosphatase	L'huntingtine	Des homopolypeptides solubles : poly-L, -E et -T.
L'anticorps de souris F11	La protéine HypF	La protéine antigel de type I
L'apolipoprotéine CII	Le lysozyme du blanc d'oeuf de poule	La carboxypeptidase A2
L'ataxine-1	La méthionine aminopeptidase	Les chaplines
L'atrophine-1	La monelline	Les protéines du chorion
La β-lactoglobuline	La myoglobine	Les curlis
Les betabellines (15D et 16D)	La protéine OspA	La protéine FBP28
La protéine C du surfactant	La phosphatidylinositol-3-kinase	La fibronectine
La protéine CR1	La phosphoglycerate kinase	La protéine HET-s
Le facteur de croissance des fibroblastes	La prothymosine α	Les hydrophobines
La protéine CspA	Le récepteur d'androgène	La protéine Pmel17
La protéine CspB	La stefin B	La protéine RNQ1
Le cytochrome c552	La protéine Tau	La protéine Sup35
La protéine fibre des adénovirus		La protéine Ure2
La protéine G		

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. *et al.*, 2003). Plusieurs articles récents permettent d'étayer cette thèse ; il s'agit entre autres des travaux de Berson *et al.* qui portent sur la fibrillation de la glycoprotéine Pmel17 dans les mélanosomes (Berson J.F. *et al.*, 2003) et de ceux de Chapman *et al.* sur la formation de fibres extracellulaires, appelées Curlis, par *Escherichia coli* et *Salmonella spp.* (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, 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 (Huff M.A. *et al.*, 2003).

### I.1.2. Caractéristiques des protéines amyloïdogéniques et structures amyloïdes

Les protéines qui forment les dépôts amyloïdes correspondent à des protéines naturellement produites par l'organisme et ne possédant pas de relation entre elles. A l'état natif, les protéines amyloïdogéniques possèdent peu d'homologie de séquence et de structure (Kelly J.W., 1996). En effet, leur conformation native peut être hélicoïdale, en feuillet  $\beta$ , en passant par des protéines non structurées. Le changement conformationnel qu'elles subissent au cours de la fibrillation accroît généralement leur contenu en structure  $\beta$  (Grateau G., 2000). Les fibrilles formées sont insolubles et résistantes à la protéolyse et vont s'agréger en dépôts amyloïdes (Figure 1) (Sipe J.D. *et al.*, 2000 ; Ohnishi S. *et al.*, 2004).

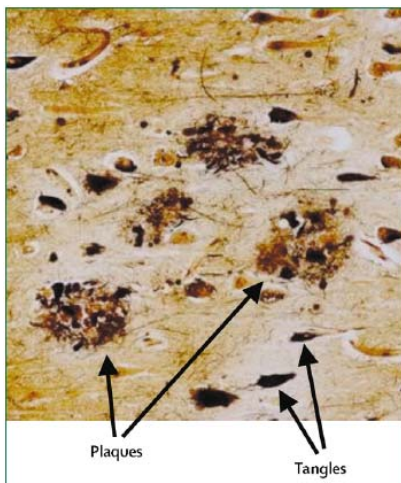


Figure 1 : Plaques amyloïdes et enchevêtrement neurofibrillaires ("tangles") de la maladie d'Alzheimer (Blennow K. *et al.*, 2006).

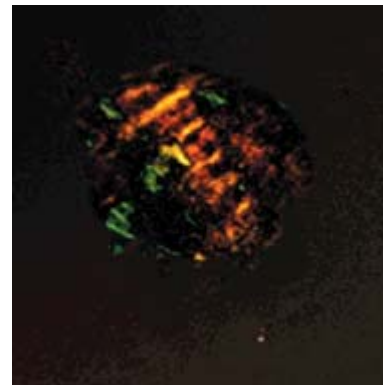


Figure 2 : Biréfringence observée pour des fibrilles amyloïdes du peptide A $\beta$  colorées au rouge Congo sous une lumière polarisée (Conway K.A. *et al.*, 2000).

Comme cité plus haut, les dépôts amyloïdes possèdent plusieurs propriétés qui permettent de les caractériser. Tout d'abord, Divry et Florkin ont pu montrer en 1927 que

sous une lumière polarisée, les dépôts amyloïdes colorés au rouge Congo possèdent une biréfringence vert pomme caractéristique (Figure 2) (Divry P. *et al.*, 1927). Cette propriété optique démontre la nature non amorphe des fibrilles amyloïdes (Ohnishi S. *et al.*, 2004). La Thioflavine T est également utilisée pour mettre en évidence les fibrilles amyloïdes. Lorsque ce marqueur se lie aux fibrilles, une augmentation de fluorescence est observée (LeVine H., 1993 ; Naiki H. *et al.*, 1989). En ce qui concerne la forme générale des fibrilles, Cohen et ses collègues ont pu montrer par microscopie électronique que les dépôts amyloïdes sont composés de fibrilles torsadées et non ramifiées de 70 à 120 Å de large et de longueur indéterminée (Figure 3) (Cohen A.S. *et al.*, 1959). Finalement, à la fin des années 60, deux études de diffraction aux rayons X ont montré que les fibrilles amyloïdes possèdent une structure ordonnée appelée “cross  $\beta$ ”, dans laquelle les chaînes polypeptidiques adoptent une conformation où les feuilletts  $\beta$  se propagent dans la direction du grand axe des fibrilles et les brins  $\beta$  individuels perpendiculairement à cette dernière (Figure 4) (Eanes E.D. *et al.*, 1968 ; Bonar L. *et al.*, 1969). Les caractéristiques du spectre de diffraction montrent une forte réflexion méridienne à 4.8Å qui correspond à la distance entre les brins  $\beta$  liés par des ponts hydrogènes et une plus faible réflexion équatoriale à 10-11Å qui correspond à la distance entre feuilletts  $\beta$  dans les plaques amyloïdes (Serpell L.C., 2000).

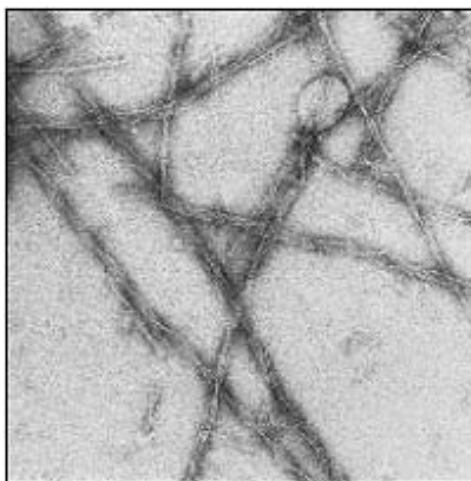


Figure 3 : Fibrilles amyloïdes vues par microscopie électronique (Dobson C.M., 1999).

La structure des fibrilles amyloïdes a été étudiée en utilisant une variété de techniques incluant la diffraction aux rayons X et la RMN du solide. Cependant, leur étude est difficile en raison de leur caractère fibrillaire et de leur insolubilité. La détermination de la structure atomique haute résolution de plusieurs courts peptides amyloïdogéniques dans leur conformation  $\beta$  croisée n'a d'ailleurs été réalisée que très récemment. Ces structures ont été

déterminées par diffraction aux rayons X à partir de microcristaux formés par ces peptides et ont d'abord été obtenues pour deux fragments de la protéine prion de levure Sup35p (GNNQQNY et NNQQNY) puis pour d'autres fragments appartenant entre autres au peptide A $\beta$ , à la protéine Tau et à la protéine PrP (Neslon R. *et al.*, 2005 ; Sawaya M.R. *et al.*, 2007). La séquence de ces peptides est constituée d'acides aminés dont le volume et la polarité varie largement d'un peptide à l'autre, mais conserve la propriété d'être auto-complémentaire. Les structures obtenues, appelées "steric zipper", correspondent à deux feuillets  $\beta$  étroitement associés dont les chaînes latérales sont interdigitées (Figure 4) (Neslon R. *et al.*, 2006 ; Sawaya M.R. *et al.*, 2007). L'acquisition de ces structures est une grande avancée. Cependant, elles correspondent à des fragments protéiques assez courts et ne représentent donc pas forcément les structures adoptées par les protéines entières au sein des fibrilles amyloïdes. Plusieurs modèles tentant d'expliquer la structure et le mécanisme de formation des fibrilles amyloïdes ont été proposés et sont développés au chapitre I.1.4.

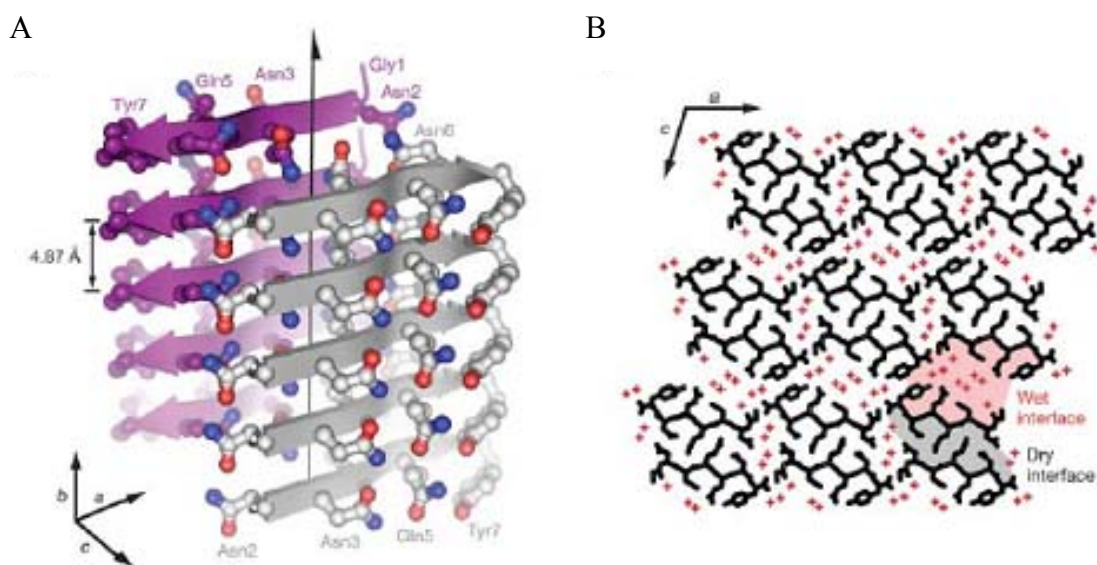


Figure 4 : Structure 3D de fibrilles amyloïdes du peptide GNNQQNY de Sup35p (Nelson R. *et al.*, 2005). A) paire de feuillets  $\beta$  formant la structure de la fibrille, dont l'axe est représentée par une flèche. B) feuillets  $\beta$  vus du haut, les peptides sont en noir et les molécules d'eau en rouge.

Les études de dichroïsme circulaire (CD) et de spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier indiquent, quant à elles, un contenu élevé en feuillets  $\beta$  pour les fibrilles amyloïdes (Makin O.S. *et al.*, 2005 ; Ohnishi S. *et al.*, 2004). De plus, les études de microscopie à force atomique (AFM) et de microscopie électronique ont montré que les fibrilles amyloïdes sont

composées de plusieurs sous-unités appelées protofilaments qui peuvent donner différentes morphologies aux fibrilles amyloïdes. Par exemple, Jiménez *et al.* ont montré que les fibrilles d'insuline pouvaient être formées de 2, 4 ou 6 protofilaments, bien que la taille et la forme des protofilaments soient toujours les mêmes (Jiménez J.L. *et al.* 2002 ; Makin O.S. *et al.*, 2005).

### I.1.3. Formation des fibrilles amyloïdes

#### I.1.3.1. Cinétique de la fibrillation

Les modèles cinétiques les plus rencontrés dans la littérature sont le mécanisme de nucléation-polymérisation et le modèle assisté d'une matrice (Figure 5). Ce dernier 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. 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 ; Soto C. *et al.*, 2006) ; le noyau de nucléation pouvant être un monomère ou un oligomère dont la conformation est altérée (Murphy R.M., 2007).

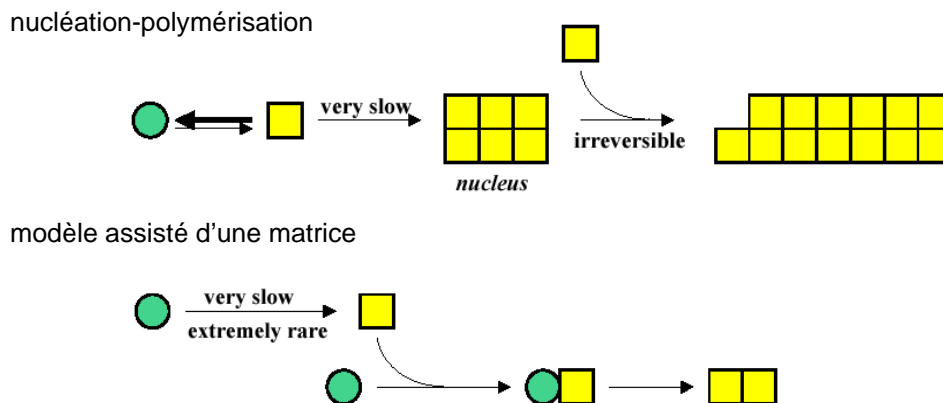


Figure 5 : Schémas représentant le mécanisme de nucléation-polymérisation et le modèle assisté d'une matrice. Les disques verts représentent les protéines sous leur forme normale et les carrés jaunes sous leur forme amyloïde.

Au-delà d'une concentration critique, les solutions protéiques forment spontanément des fibrilles après une phase de latence qui peut varier considérablement. Ensemencer une

solution de protéines amyloïdes avec des fibrilles préformées réduit significativement la phase de latence en éliminant l'étape de nucléation (Westermarck P., 2005).

Selon Murphy, il peut être utile de considérer les mécanismes d'initiation et de croissance des fibrilles amyloïdes séparément. L'initiation pourrait se produire (a) par une conversion cinétiquement ou thermodynamiquement défavorable d'un monomère en noyau de nucléation ; (b) par la collision entre deux monomères conduisant à la transconformation de l'un ou des deux en une conformation amyloïde ; ou (c) par l'association de monomères en oligomères non structurés, suivi d'une transconformation vers un oligomère structuré. Quant à la croissance, elle pourrait se produire (a) par l'ajout de monomères natifs à un agrégat structuré préexistant, suivie par une transconformation ; (b) par une auto-association indéfinie de monomères dans une conformation amyloïde ; ou (c) par l'association d'oligomères en agrégats plus importants (Murphy R.M., 2007). Plusieurs de ces mécanismes se retrouvent dans les modèles de la figure 5. Une idée largement acceptée est que la fibrillogénèse requiert qu'un intermédiaire partiellement structuré soit formé pour être initiée (Rochet J.C. *et al.*, 2000). Bien que ce soit toujours matière à débat, il a été suggéré que cet intermédiaire soit partiellement hélicoïdal. En effet, une étude détaillée de la fibrillation du peptide A $\beta$ , réalisée par Kirkitadze *et al.*, a montré que la formation des fibrilles devait inclure une population transitoire de structures en hélice  $\alpha$  (Kirkitadze M.D. *et al.*, 2001).

#### I.1.3.2. Facteurs influençant la fibrillation

Du point de vue moléculaire et énergétique, les phénomènes de transconformation et de formation des fibrilles restent très mal connus. Selon Kelly, la formation de fibrilles amyloïdes résulterait d'une combinaison de facteurs incluant la séquence et l'environnement (Kelly J.W., 1998). Différents facteurs déclenchant la fibrillation ont par ailleurs été déterminés. Il s'agit notamment de la protéolyse, la présence de mutations, l'augmentation de la concentration et des modifications de pH ou de température (Grateau G., 2000). Les mutations de la transthyretine connues pour être associées à des amyloïdoses héréditaires semblent agir par déstabilisation de l'état natif de la protéine. En 1991, Kelly a pu montrer que de la transthyretine purifiée pouvait être convertie en fibrilles amyloïdes par l'intermédiaire d'un changement de conformation induit par une diminution de pH (Colon W. *et al.*, 1991).

La nature a développé différentes stratégies afin d'éviter le contact entre fragments amyloïdogéniques et donc leur agrégation (Westermarck P., 2005). Dobson et ses collègues



suggèrent 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 ; Frändrich M. *et al.*, 2001). La protection naturelle des protéines contenant des structures  $\beta$  vis-à-vis de l'agrégation passe par le "design" des brins  $\beta$  se trouvant aux interfaces, c'est à dire aux extrémités des feuillets  $\beta$ . Par exemple, il peut y avoir formation de feuillets  $\beta$  continus dans des tonneaux  $\beta$ , recouvrement des bords des feuillets par des boucles ou des résidus chargés au centre d'un brin hydrophobe. Ces mécanismes ont été appliqués *in vitro* et il a été montré que l'ajout d'une proline ou d'une charge à des peptides amyloïdes inhibe la formation de fibrilles amyloïdes. Il est donc raisonnable de supposer que l'absence de ces protections peut conduire à la formation de fibrilles amyloïdes (Richardson J.S. *et al.*, 2002 ; Moriarty D.F. *et al.*, 1999 ; Ohnishi S. *et al.*, 2004).

Frändrich et Dobson ont récemment démontré que des polypeptides tels que des polythréonine, polyglutamate et polylysine, sont capables de former des fibrilles. Ces résultats les ont conduits à proposer que, contrairement au repliement des protéines, dirigé par des interactions tertiaires entre chaînes latérales ou entre chaînes latérales et squelette, la formation de fibrilles amyloïdes soit dirigée par l'interaction entre les squelettes peptidiques. Cette hypothèse, appelée "Inverse side-chain effect", est en accord avec le fait que les fibrilles amyloïdes ont une structure "cross  $\beta$ " similaire, quelle que soit la séquence en acides aminés (Frändrich M. *et al.*, 2002 ; Ohnishi S. *et al.*, 2004). Elle est également en accord avec une autre hypothèse proposée par l'équipe de Dobson selon laquelle toutes les protéines peuvent former des fibrilles amyloïdes si les conditions déstabilisantes sont suffisantes (Dobson C.M., 1999). Cependant, d'autres études montrent que la composition en acides aminés intervient dans la fibrillation. En effet, tous les peptides ne sont pas capables de former des fibrilles amyloïdes facilement et la modification de la composition en acides aminés peut affecter l'amyloïdogénicité (Ohnishi S. *et al.*, 2004). D'autre part, Esteras-Chopo *et al.* ont montré que l'insertion d'un peptide amyloïdogénique au sein d'une protéine pouvait la rendre amyloïdogénique. Selon eux, l'amyloïdogénicité des protéines pourrait être confinée dans de courts domaines, c'est l'"Amyloid Stretch Hypothesis" (Esteras-Chopo A. *et al.*, 2005).

#### **I.1.4. Modèles proposés pour la structure des fibrilles amyloïdes**

Un des premiers modèles proposés pour les fibrilles amyloïdes est le modèle des feuillets  $\beta$  organisés en hélice présenté à la figure 6. Celui-ci a été construit par Blake *et al.* à

partir de l'étude par diffraction aux rayons X de fibrilles formées par un mutant de la transthyrétine. Leurs résultats montraient que les fibrilles amyloïdes adoptaient la structure "cross  $\beta$ ", dans laquelle les chaînes polypeptidiques adoptent une conformation  $\beta$  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 (Blake C. *et al.*, 1996 ; Jaskólski M., 2001).

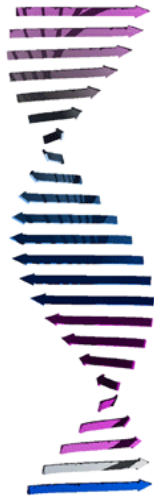


Figure 6 : Modèle de la structure "cross- $\beta$ " des fibrilles amyloïdes (Blake C. *et al.*, 1996).

Le modèle du "steric zipper" a été proposé par Perutz et ses collègues sur base des protéines amyloïdes possédant des régions anormalement étendues de polyglutamines, telles que l'Huntingtine, Ure2p, ... Dans ce modèle, les feuilletts  $\beta$  sont stabilisés par un réseau de liens hydrogène impliquant des résidus polaires tels que l'asparagine et la glutamine (Ohnishi S. *et al.*, 2004 ; Perutz M.F. *et al.*, 1994). La structure des fibrilles correspondrait alors à une épingle  $\beta$  croisée ("cross  $\beta$  spine") bordée par les structures natives résiduelles. Ce modèle correspond aux structures déterminées par Nelson *et al.* en 2006 (Figure 4).

Les hélices  $\beta$  parallèles ont été fréquemment suggérées comme la structure des fibrilles amyloïdes (Figure 7) (Nelson R. *et al.*, 2006 ; Wille H. *et al.*, 2002). Dans ce type de structure, existant également pour des protéines non amyloïdogéniques (cf. l'UDP-N-acetylglucosamine acyltransférase), les brins  $\beta$  s'organisent de façon cylindrique pour former une hélice  $\beta$  (Perutz M.F. *et al.*, 2002). Les brins  $\beta$  de l'hélice créent des ponts hydrogène avec leurs voisins pour former un feuillet  $\beta$  parallèle (Wetzel R., 2002). Ce type de modèle a été proposé pour l'insuline, un domaine SH3 et la protéine PrP. Cette dernière a été proposée

par l'équipe de Prusiner sur base de données de microscopie électronique (Jiménez J.L. *et al.*, 2002 ; Wille H. *et al.*, 2002).

Il existe également le modèle structural bêta super-plissé (“parallel superpleated  $\beta$ -structure”) pour lequel des fragments désordonnés forment un serpentин de brins  $\beta$ , participant chacun à un feuillet  $\beta$  différent. La structure “cross  $\beta$ ” se formerait à partir de segments protéiques qui sont peu structurés à l'état natif (Figure 8). Ce modèle a récemment été proposé pour le domaine désordonné C-terminal de la protéine Het-s, la partie N-terminale des prions de levure Ure2p et Sup35p, pour l'amyline, pour les segments polyglutamine de la protéine Huntingtin et le peptide A $\beta$  (Kajava A.V. *et al.*, 2004 ; Neslon R. *et al.*, 2006).



Figure 7 : Hélice  $\beta$  parallèle formée par les résidus 1-178 de l'UDP-N-acetylglucosamine acyltransférase (Protein Data Bank code 1 lxa) (Wetzel R., 2002).

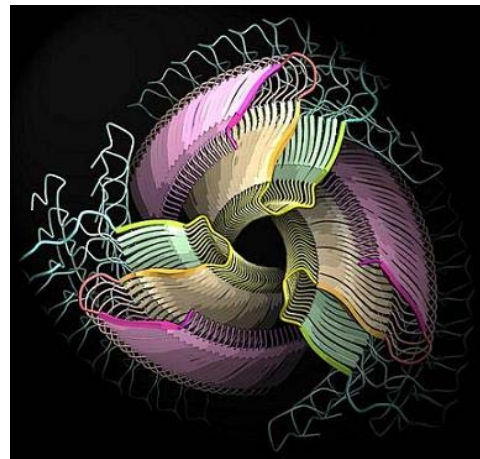


Figure 8 : Modèle structural bêta super-plissé des fibrilles amyloïdes de l'amyline (<http://www.crbm.cnrs.fr/FR/DpB08b.php>).

Une autre option correspond à l'échange de domaines (“domain-swapping”). Il s'agit d'un mécanisme au cours duquel au moins deux protéines échangent un ou plusieurs domaines structuraux pour former un dimère ou un oligomère. Suite à l'échange des domaines, il pourrait y avoir formation d'un “cross  $\beta$  spine”. Cette structure a été obtenue pour une ribonucléase A (RNase A) (Figure 9) (Sambashivan S. *et al.*, 2005 ; Neslon R. *et al.*, 2006). Des études cristallographiques ont identifié ce mécanisme pour la formation d'un dimère de PrP<sup>c</sup>, de  $\beta_2$ -microglobuline et de Cystatine C humaine. Cependant, ce phénomène n'est applicable qu'à des protéines suffisamment grandes et le spectre de diffraction caractéristique des fibrilles amyloïdes ne peut être obtenu que si les brins sont

perpendiculaires. L'échange de domaines avec ou sans formation de "cross  $\beta$  spine" ne peut donc être généralisé à toutes les protéines (Janowski R. *et al.*, 2001 ; Ohnishi S. *et al.*, 2004 ; Neslon R. *et al.*, 2006).

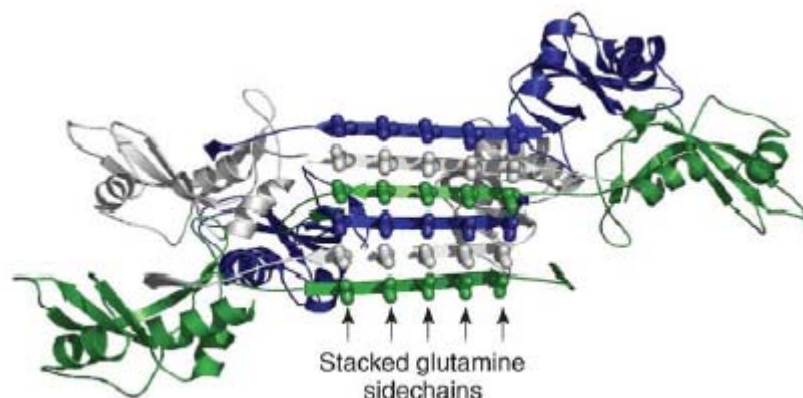


Figure 9 : Schéma représentant le modèle de l'échange de domaines avec "cross  $\beta$  spine" pour le mutant polyglutamine de la RNase A (Neslon R. *et al.*, 2006).

Enfin, il existe également le modèle de l'empilement direct, c'est-à-dire qu'une surface nouvellement exposée d'une protéine va interagir avec une surface complémentaire de la même protéine. Ce modèle a été proposé pour la superoxide dismutase et la transthyretine. Cependant, on ne sait pas encore si toutes les caractéristiques des fibrilles amyloïdes telles que la structure  $\beta$  croisée et la forte stabilité sont respectées (Olofsson A. *et al.*, 2004 ; Neslon R. *et al.*, 2006).

### **I.1.5. Toxicité associée aux protéines amyloïdogéniques**

La compréhension des mécanismes responsables de la toxicité associée aux protéines amyloïdogéniques est encore limitée et fait l'objet d'intenses recherches et débats. Une des problématiques réside dans l'identification de la (des) espèce(s) amyloïdogénique(s) qui est (sont) toxique(s). On a longtemps proposé que les fibrilles amyloïdes étaient l'élément toxique responsable de la mort cellulaire dans les tissus affectés. Cependant, plusieurs études récentes suggèrent que l'espèce la plus toxique pour les cellules correspond à des intermédiaires oligomériques dans la formation des fibrilles amyloïdes, ces dernières étant moins toxiques (Stefani M. *et al.*, 2003). De plus, Bucciantini *et al.* ont montré que les oligomères de la phosphatidylinositol-3-kinase et de HypF, qui ne sont associés à aucune

pathogénicité, peuvent également être cytotoxiques (Bucciantini M. *et al.*, 2002). Un effet protecteur a même été proposé pour les fibrilles amyloïdes, celles-ci intégrant les intermédiaires toxiques lors de la croissance des fibrilles (Glabe C.G., 2006). Un autre fait marquant est que ces intermédiaires oligomériques présentent un motif structural commun, absent chez les monomères et les fibrilles amyloïdes. Ce fait se base sur la reconnaissance spécifique par un anticorps des intermédiaires oligomériques de différentes protéines amyloïdogéniques. Cet anticorps anti-oligomère inhibe également leur toxicité *in vitro* (Kayed R. *et al.*, 2003).

Il a été montré que les intermédiaires oligomériques de différentes protéines sont capables de perméabiliser les membranes cellulaires et les bicouches lipidiques. Des structures en forme de pore ont d'ailleurs été décrites par AFM pour des protéines amyloïdogéniques telles que le peptide A $\beta$ , l' $\alpha$ -synucléine ou l'IAPP (Lashuel H.A. *et al.*, 2002 ; Kagan B.L. *et al.*, 2004 ; Quist A. *et al.*, 2005 ; Lal R. *et al.*, 2007). Cette perméabilisation pourrait correspondre à un mécanisme toxique initial et conduire à l'altération de l'homéostasie des ions, au dysfonctionnement cellulaire et finalement à la mort cellulaire observée. En effet, la perméabilisation des membranes cellulaires par les oligomères induirait une augmentation intracellulaire de la concentration en calcium, suivie de la production de molécules oxygénées réactives (ROS), l'altération des voies de signalisation et une disfonction mitochondriale (Glabe C.G., 2006).

#### **I.1.6. Méthodes de prédiction de régions amyloïdes**

Plusieurs méthodes de prédiction des régions amyloïdes des protéines ont été mises au point ces dernières années. Il y a tout d'abord la méthode de Lopez de la Paz *et al.* qui se base sur la présence d'un motif peptidique de six résidus. Pour obtenir ce motif, ils ont testé les propriétés amyloïdogéniques de mutants du peptide STVIIIE, peptide amyloïdogénique découvert par design *de novo* en 2002 par Lopez de la Paz *et al.* Les mutations sont testées une par une pour chaque position et si un peptide mutant conserve la capacité de former des fibrilles, l'acide aminé ayant servi pour la mutation est ajouté au motif comme acide aminé possible pour cette position (Lopez de la Paz M. *et al.*, 2002 ; Lopez de la Paz M. *et al.*, 2004). Cependant, cette méthode présume que l'effet d'un acide aminé ne dépend que de sa position et n'est pas influencé par les autres acides aminés du peptide, ce qui peut générer des

faux positifs et ne permet pas de reconnaître des peptides amyloïdogéniques connus tels que le peptide NNQQNY (Thompson M.J. *et al.* 2006).

Les protéines amyloïdogéniques possèdent peu d'homologies de séquence et de structure entre elles. Plusieurs méthodes de prédiction se basent donc sur les propriétés des acides aminés (hydrophobicité, charge, ...) et la propension des séquences peptidiques à former des hélices  $\alpha$  ou des brins  $\beta$  pour prédire les régions amyloïdogéniques. Cette approche leur permet de construire des fonctions reprenant ces différents facteurs puis d'évaluer leur capacité à retrouver différents peptides amyloïdogéniques observés *in vitro* à partir de la séquence entière (Pawar A.P. *et al.*, 2005 ; Galzitskaya O.V. *et al.*, 2006).

D'autre part, l'étude de Kallberg *et al.* montre que plusieurs protéines amyloïdogéniques présentent dans leur structure native des hélices  $\alpha$  dans des régions qui sont théoriquement prédites en brins  $\beta$ . Cette observation 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 (Kallberg Y. *et al.*, 2001 ; Dima R.I. *et al.*, 2002). Cependant, cette méthode n'est valable que pour les protéines dont la structure tridimensionnelle est connue. Pour répondre à cela, l'équipe de Yoon propose donc une autre méthode basée sur cette hypothèse qui permet de prédire la propension des séquences à former des brins  $\beta$  non natifs en considérant la structure secondaire en terme de contact tertiaire. Les séquences qui présentent une discordance entre la probabilité d'adopter une structure  $\alpha$  pauvre en contacts tertiaires et une structure  $\beta$  riche en contacts sont recherchées (Yoon S. *et al.*, 2004).

Finalement, Thompson *et al.* ont mis au point une méthode qui utilise la structure Rx déterminée pour le peptide NNQQNY de Sup35p comme modèle pour trouver d'autres séquences capables de former des " steric zipper " (Thompson M.J. *et al.* 2006). Avec cette méthode, un peptide de six résidus va remplacer le peptide NNQQNY dans sa structure cristalline. L'un des feuillets de la structure est alors translaté parallèlement et perpendiculairement à l'autre et l'énergie de chacune de ces structures est estimée. L'énergie la plus basse rencontrée correspond à la prédiction et si elle est inférieure à une valeur seuil, le peptide est considéré comme amyloïdogénique (Thompson M.J. *et al.* 2006 ; Nelson R. *et al.*, 2005).

## **I.2. Protéines amyloïdogéniques et maladies neurodégénératives**

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 ou de Parkinson. Ensuite, ces phénomènes ne sont pas encore complètement expliqués tant au niveau énergétique que structural (Žerovnik E., 2002). Dans cette partie, les cas du peptide A $\beta$  et de l' $\alpha$ -synucléine seront traités.

### **I.2.1. Le peptide $\beta$ amyloïde**

Le peptide  $\beta$  amyloïde (ou A $\beta$ ) est le composant majeur des plaques séniles extracellulaires trouvées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Masters C.L., 1985). Cette dernière est la forme la plus commune de démence (50 à 60% des cas) et affecte plus de 20 millions de personnes à travers le monde (Blennow K. *et al.*, 2006 ; Goedert M. *et al.*, 2006). La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative associée à une perte progressive de la mémoire et est caractérisée par la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires, constitués de la protéine Tau anormalement phosphorylée, et des plaques séniles extracellulaires, constituées de fibrilles amyloïdes formées à partir du peptide A $\beta$  (Mager P.P. *et al.*, 2002 ; Kelly J.W., 1996).

#### **I.2.1.1. Génération du peptide $\beta$ amyloïde**

Le peptide A $\beta$  est le produit normal du clivage d'une protéine transmembranaire appelée APP (" $\beta$ -amyloid precursor protein") dont la fonction biologique reste inconnue. Cette protéine comporte trois domaines, un domaine N-terminal extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intra-cytoplasmique. Le clivage peut avoir lieu de deux façons différentes, la voie amyloïdogénique ou non-amyloïdogénique, et fait intervenir trois enzymes :  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -secrétases (Figure 10). Lors de la voie non-amyloïdogénique, c'est-à-dire sans formation de peptides A $\beta$ , l'APP est clivée par la secrétase  $\alpha$ , générant les fragments sAPP $\alpha$  et C83. La secrétase  $\gamma$  génère ensuite le peptide p3, considéré comme non-amyloïdogénique, à partir du fragment C-terminal C83. Dans la voie

amyloïdogénique, la sécrétase  $\beta$  génère le peptide sAPP $\beta$  et le fragment C99. Puis, à partir du fragment C99, la sécrétase  $\gamma$  va générer le peptide A $\beta$ . La sécrétase  $\gamma$  est un complexe enzymatique encore mal connu, comprenant les présénilines (PS1 ou PS2), la nicastrine et les protéines aph-1 et pen-2, les présénilines constituant le site actif. Le site de clivage de la  $\gamma$ -sécrétase peut varier, générant des peptides A $\beta$  constitués de 39 à 43 résidus (Clippingdale A.B. *et al.*, 2001 ; Blennow K. *et al.*, 2006).

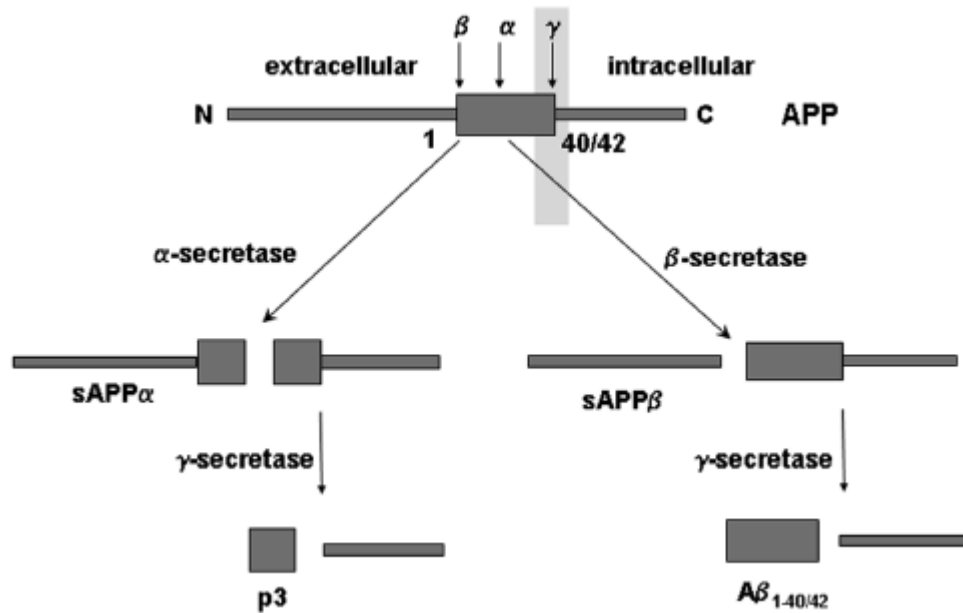


Figure 10 : Représentation schématique du clivage de l'APP (Canevari L. *et al.*, 2004).

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

Comme pour les autres protéines amyloïdogéniques, le peptide A $\beta$  suivrait un mécanisme de nucléation-polymérisation (Harper J.D. *et al.*, 1997). Plusieurs études ont démontré l'importance du domaine C-terminal dans l'agrégation et la stabilisation des fibrilles (Lansbury P.T.J. *et al.*, 1995). Un rôle a également été suggéré pour le domaine central du peptide A $\beta$ . Hughes *et al.* ont démontré que le peptide A $\beta$  pouvait interagir avec lui-même. Cette équipe et celle de Festy ont suggéré que cette interaction pourrait être une



étape dans la formation des fibrilles (Hughes S.R. *et al.*, 1996 ; Festy F. *et al.*, 2001). De plus, le peptide A $\beta$  1-42 pourrait agir comme un noyau de nucléation pour l'agrégation du peptide A $\beta$  1-40 (Jarrett J.T. *et al.*, 1993).

### I.2.1.2. Mutations et protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer se déclare généralement de façon sporadique chez des personnes âgées de plus de 65 ans. Cependant, des mutations dans le gène de la protéine APP et des présénilines sont associées à des formes familiales autosomales dominantes de la maladie. Celles-ci correspondent à environ 10% des cas et se déclarent généralement avant l'âge de 65 ans (Newman M. *et al.*, 2007 ; Blennow K. *et al.*, 2006). 20 mutations non-sens du gène de l'APP ont été décrites (Figure 11). Ces mutations provoquent une augmentation de la production ou de la proportion de peptide A $\beta$  (1-42) (Citron M. *et al.*, 1992 ; Goedert M. *et al.*, 2006 ; Selkoe D.J., 1997). La mutation E22Q du peptide A $\beta$  entraîne quant à elle l'hémorragie cérébrale héréditaire avec amyloïdose de type hollandais (HCHWA-D), caractérisée par des hémorragies récurrentes dues au dépôt du peptide A $\beta$  dans les parois des vaisseaux sanguins cérébraux (Goedert M. *et al.*, 2006 ; Maat-Schieman M. *et al.*, 2005). Plus de 160 mutations du gène de la préséniline 1 ont également été identifiées et sont la cause la plus commune de la forme héréditaire de la maladie d'Alzheimer (Levy-Lahad E. *et al.*, 1995 ; Goedert M. *et al.*, 2006). Ces mutations augmentent le rapport A $\beta$ (1-42)/A $\beta$ (1-40) (Citron M. *et al.*, 1997 ; Goedert M. *et al.*, 2006).

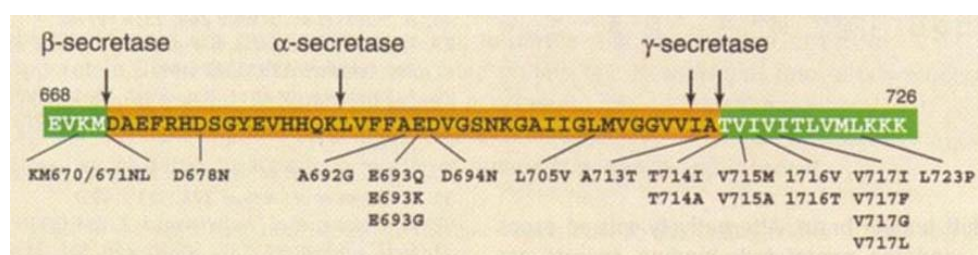


Figure 11 : Mutations de la protéine APP associées aux formes familiales de la maladie d'Alzheimer (Goedert M. *et al.*, 2006).

Au-delà de 65 ans, le seul facteur de susceptibilité génétique reconnu pour la maladie d'Alzheimer correspond au gène de l'Apolipoprotéine E4. L'Apolipoprotéine E présente trois

isoformes appelées ApoE2, ApoE3 et ApoE4 qui ne diffèrent que par deux acides aminés. L'ApoE3 possède une cystéine en position 112 et une arginine en position 158, tandis que l'ApoE4 possède deux arginines à ces positions et l'ApoE2, deux cystéines (Chartier-Harlin M.C. *et al.*, 2002). L'ApoE3 est l'isoforme la plus fréquente (environ 74%) et le facteur de risque le plus élevé est associé au génotype E4/E4 (Thomas P. *et al.*, 2007). La présence de l'isoforme ApoE4 est associée à une plus grande incidence de la maladie d'Alzheimer et à une plus grande quantité de dépôts d'A $\beta$  dans le cerveau ; tandis que l'ApoE3 se lie au peptide A $\beta$  plus fortement et a un effet protecteur contre la toxicité du peptide A $\beta$  *in vitro* (Canevari L. *et al.*, 2004).

Il a été montré que les personnes présentant le syndrome de Down, ou trisomie 21, développent systématiquement les caractéristiques neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer à partir de 40 ans. En effet, le gène de l'APP se trouve sur le chromosome 21 et il a été montré qu'une augmentation du dosage ou une duplication du gène de l'APP était une autre cause de la maladie d'Alzheimer (Mehta P.D. *et al.*, 2007 ; Goedert M. *et al.*, 2006).

### I.2.1.3. Conformations du peptide $\beta$ amyloïde

Les études conformationnelles du peptide A $\beta$  en solution sont compliquées en raison de sa tendance à s'agréger. De plus, ces études ont montré qu'*in vitro*, le peptide A $\beta$  pouvait adopter des conformations différentes en fonction des conditions expérimentales et de la longueur du fragment étudié. Dans le cas du peptide A $\beta$ , cette flexibilité conformationnelle est intéressante puisqu'elle peut être associée à une transition d'une structure  $\alpha$  ou random-coil à une structure  $\beta$  causant l'agrégation du peptide et la formation des fibrilles amyloïdes (Crescenzi O. *et al.*, 2002). Kirkitaze *et al.* ont détecté la formation d'un intermédiaire partiellement hélicoïdal lors de la fibrillation et proposent que la formation de cette structure soit cruciale lors de la formation des fibrilles (Kirkitaze M.D. *et al.*, 2001).

Plusieurs études réalisées en solution montrent que le peptide A $\beta$  adopte plutôt une conformation random-coil. Cependant, des études RMN des peptides A $\beta$  1-40 et A $\beta$  1-42 menées dans différents solvants mimant l'interface entre un milieu aqueux et apolaire, comme des micelles de SDS, et dans des solvants reproduisant un microenvironnement apolaire, comme une solution de trifluoroéthanol, ont permis de mettre en évidence deux régions hélicoïdales (8-25 et 28-38) séparées par un  $\beta$ -turn. Il est intéressant de voir que la seconde hélice correspond à la région transmembranaire de l'APP et qu'elle pourrait donc s'insérer dans les membranes (Coles M. *et al.*, 1998 ; Serpell L.C. *et al.*, 2000). De plus, la similarité

de cette structure avec celle du domaine de fusion de l'hémagglutinine du virus influenza (HA2), ainsi que l'homologie de séquence entre le domaine C-terminal du peptide A $\beta$  et le domaine de fusion de ce virus suggère un mécanisme direct de neurotoxicité (Crescenzi O. *et al.*, 2002). Une explication possible pour la neurotoxicité de ce peptide pourrait être la formation de pores dans la membrane causant la mort neuronale (Kawahara M. *et al.*, 2000). Des structures en forme d'anneaux ont d'ailleurs été observées par AFM (Lashuel H.A. *et al.*, 2002 ; Kagan B.L. *et al.*, 2004 ; Quist A. *et al.*, 2005 ; Lal R. *et al.*, 2007).

En ce qui concerne la conformation du peptide A $\beta$  dans les fibrilles amyloïdes, plusieurs modèles moléculaires ont été proposés. Un modèle récent proposé par Petkova *et al.* est présenté à la figure 12. 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  $\beta$  et forment des feuillettes  $\beta$  parallèles. Cette structure, qui correspond à une protofibrille, est formée par la juxtaposition des faces hydrophobes de deux protofilaments (Petkova A.T. *et al.*, 2002).

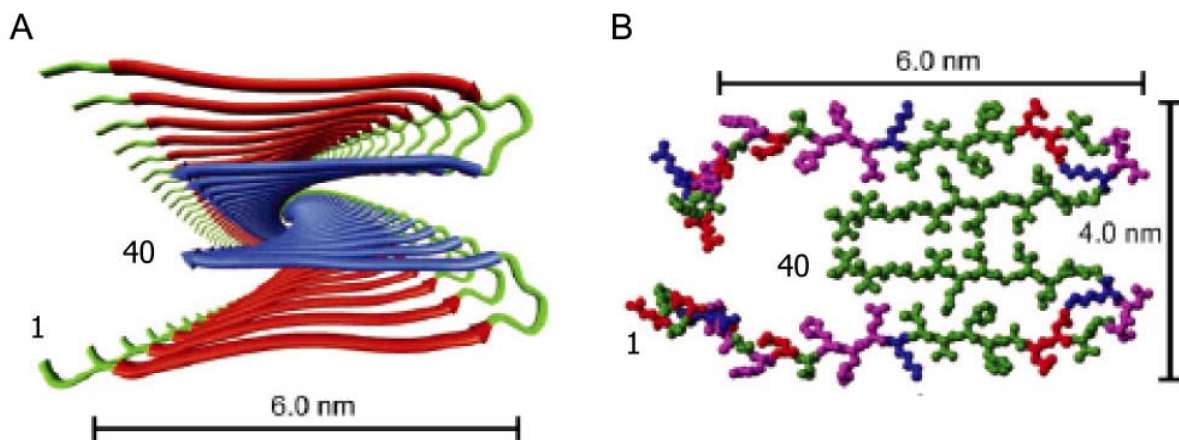


Figure 12 : Modèle structural du peptide A $\beta$  dans les protofibrilles. A) Représentation schématique d'une protofibrille. B) Détail des acides aminés. Les acides aminés hydrophobes sont représentés en vert, les polaires en mauve, les chargés négativement en rouge et les chargés positivement en bleu (Tycko R., 2003).

Un autre modèle a été proposé en 2005 par Lührs *et al.* à partir de l'étude RMN de fibrilles du peptide A $\beta$ (1-42). Ce peptide présente deux brins  $\beta$  correspondant aux résidus 18-26 et 31-42 reliés par une boucle (Figure 13). Les résidus impairs du brin  $\beta$  N-terminal d'un

peptide A $\beta$ (1-42) forment des interactions intermoléculaires avec les résidus pairs du brin  $\beta$  C-terminal du peptide adjacent (Lührs T. *et al.*, 2005).

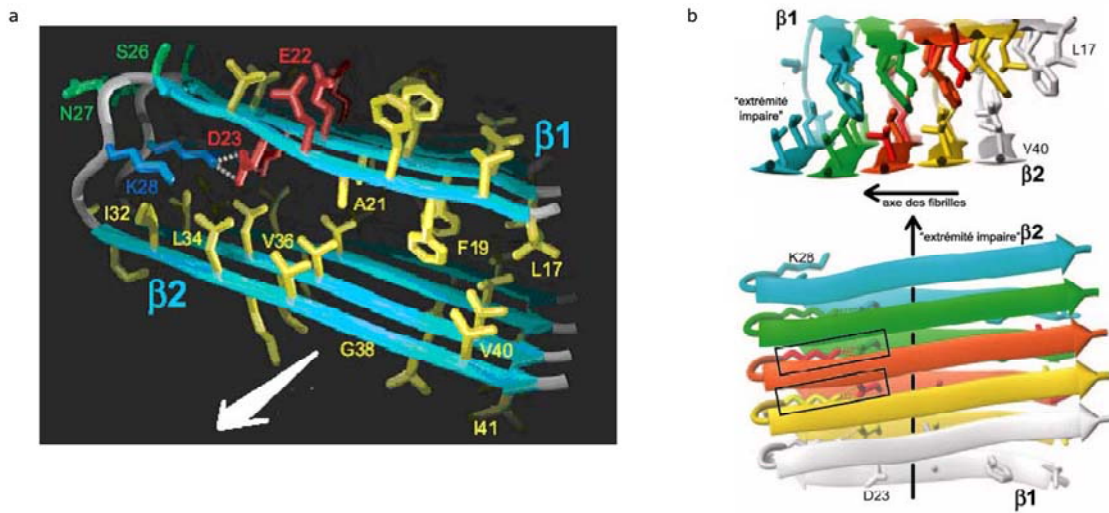


Figure 13 : Modèle proposé par Lührs *et al.* pour la structure 3D des protofilaments formés par le peptide A $\beta$ (1-42) (Lührs T. *et al.*, 2005).

### I.2.2. L' $\alpha$ -synucléine

L' $\alpha$ -synucléine est une petite protéine de 140 acides aminés 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' $\alpha$ -synucléine fait partie d'une famille de protéines qui comprend également la  $\beta$ - et la  $\gamma$ -synucléine. L' $\alpha$ -synucléine est principalement exprimée dans les neurones du système nerveux central et se concentre au niveau des terminaisons synaptiques des neurones. *In vivo*, une partie de l' $\alpha$ -synucléine est étroitement associée aux vésicules synaptiques (Uversky V.N. *et al.*, 2001 ; Corti O. *et al.*, 2003).

#### I.2.2.1. Pathologies associées à l' $\alpha$ -synucléine

La présence de dépôts d' $\alpha$ -synucléine, sous forme de fibrilles "amyloid-like", 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 (Uversky V.N.

*et al.*, 2001). Cette dernière est la maladie neurodégénérative la plus courante après la maladie d'Alzheimer et touche environ 1% des personnes âgées de 65 ans et 5% des personnes âgées de 85 ans. L'âge est le principal facteur de risque pour la maladie de Parkinson (Wood-Kaczmar A. *et al.*, 2006). 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. Ces inclusions sont formées par les fibrilles d' $\alpha$ -synucléine (Spillantini M.G. *et al.*, 1998). Il est probable que la perte de fonction biologique qui se produit suite à l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine ne soit pas responsable de la dégénérescence observée (Rajagopalan S. *et al.*, 2001). 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, une rigidité, une difficulté à déclencher les mouvements et une lenteur à les exécuter (Corti O. *et al.*, 2003). Les autres maladies associées à l' $\alpha$ -synucléine sont la variante à corps de Lewy de la maladie d'Alzheimer, la maladie de Hallervorden-Spaatz, l'atrophie multisystématisée (MSA) et la démence avec corps de Lewy (Giasson B.I. *et al.*, 2001). Un fragment de 35 résidus de l' $\alpha$ -synucléine, associé au peptide A $\beta$ , se retrouve également dans les plaques amyloïdes de la maladie d'Alzheimer. Ce fragment correspond aux acides aminés 61 à 95 de l' $\alpha$ -synucléine et est appelé, dans ce contexte, NAC pour "Non Amyloid Component" (Figure 14) (Ueda K. *et al.*, 1993).

La plupart des cas de maladie de Parkinson sont sporadiques mais il existe également des formes familiales (5 à 10%) dues principalement à des mutations dans les gènes de l' $\alpha$ -synucléine, de la parkine, de LRRK2, de PINK1 et de DJ-1 (Wood-Kaczmar A. *et al.*, 2006). Il existe trois mutations dans le gène de l' $\alpha$ -synucléine qui sont associées à des formes précoces et héréditaires de la maladie de Parkinson. Ces trois mutations correspondent à la substitution d'une alanine par une proline en position 30 (A30P), d'une alanine par une thréonine en position 53 (A53T) et d'un glutamate par une lysine en position 46 (E46K) (Figure 14). C'est la présence des deux premières mutations qui a permis d'établir un lien entre l' $\alpha$ -synucléine et la maladie de Parkinson. Les molécules d' $\alpha$ -synucléine qui portent ces mutations ont tendance à former des intermédiaires oligomériques plus rapidement que l' $\alpha$ -synucléine WT (Uversky V.N. *et al.*, 2001). La duplication et la triplication du gène de l' $\alpha$ -synucléine sont également liées à l'apparition de formes précoces et autosomales dominantes de la maladie de Parkinson (Chartier-Harlin M.C. *et al.*, 2004).

### I.2.2.2. Structure de l' $\alpha$ -synucléine

La séquence de l' $\alpha$ -synucléine est constituée d'une région N-terminale pouvant former des hélices  $\alpha$  amphipathiques (Bussel R. *et al.*, 2003) et d'une région C-terminale comportant de nombreux résidus acides (Figure 14) (Uversky V.N. *et al.*, 2001). La région N-terminale est caractérisée par sept répétitions imparfaites de onze résidus, contenant chacun deux lysines. Ces répétitions se retrouvent couramment dans le domaine des apolipoprotéines liant les lipides et qui peuvent former des hélices  $\alpha$  amphipathiques (Rajagopalan S. *et al.*, 2001). Les lysines formant une barrière chargée à l'interface hydrophile/hydrophobe (Bussel R. *et al.*, 2003). Il a été montré que l' $\alpha$ -synucléine se lie préférentiellement à de petites vésicules unilamellaires comportant des phospholipides acides. La liaison semble être stabilisée par des interactions ioniques entre l' $\alpha$ -synucléine chargée positivement et les phospholipides chargés négativement (Davidson W.S. *et al.*, 1998).

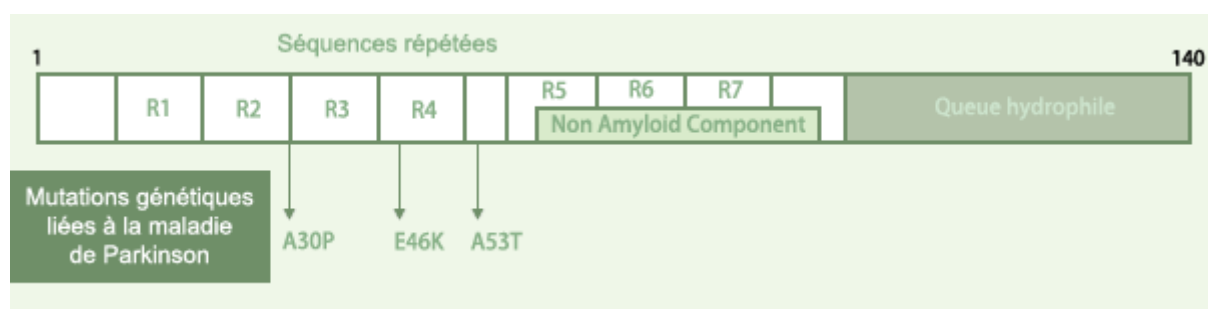


Figure 14 : Représentation schématique des informations structurales sur l' $\alpha$ -synucléine.

L' $\alpha$ -synucléine est peu structurée lorsqu'elle se trouve en solution ; en présence de membranes, son contenu en hélice  $\alpha$  augmente, passant de 3% à 80% (Davidson W.S. *et al.*, 1998). Les 98 résidus se trouvant du côté N-terminal adoptent une structure en hélice  $\alpha$  alors que les 42 résidus se trouvant du côté C-terminal restent en configuration random-coil (Davidson W.S. *et al.*, 1998).

Les prédictions de structure réalisées par Davidson *et al.* à partir de la séquence de l' $\alpha$ -synucléine permettent d'identifier cinq hélices  $\alpha$  amphipathiques potentielles (Davidson W.S. *et al.*, 1998). Cependant, Chandra *et al.* ont montré, sur base de résultats expérimentaux, que la région N-terminale de l' $\alpha$ -synucléine est composée de deux hélices  $\alpha$ , 1-43 et 46-98. Ces hélices se formeraient uniquement à l'interface protéine/liposome (Chandra S. *et al.*, 2003). Récemment, la structure de l' $\alpha$ -synucléine liée à des micelles a été résolue par Ulmer *et al.* Le

domaine N-terminal forme deux hélices  $\alpha$  antiparallèles incurvées (3-37 et 45-92), tandis que la queue acide C-terminale reste non structurée (Figure 15 ; Ulmer T.S. *et al.* 2005).

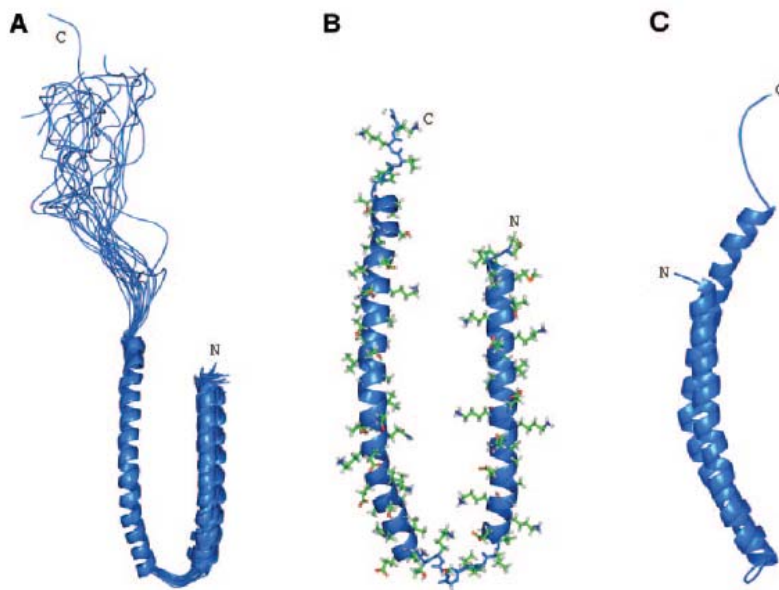


Figure 15 : Structure de l' $\alpha$ -synucléine liée aux micelles déterminée par RMN. A) Ensemble de vingt structures superposées sur l'hélice C-terminale. Structure moyenne vue de face (B) ou de profil (C) (Ulmer T.S. *et al.* 2005).

Les effets des mutations de l' $\alpha$ -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' $\alpha$ -synucléine mais limiterait également la conversion en  $\beta$ , 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' $\alpha$ -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 seraient responsables de la neurotoxicité. En effet, les mutations de l' $\alpha$ -synucléine induisent une forme précoce de la maladie. Or, celles-ci ont des comportements différents quant à la vitesse de fibrillation mais augmentent le taux d'oligomérisation. Donc, l'agent toxique doit se trouver sous forme oligomérique et non sous forme de fibrilles. Les mutations altéreraient les 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).

Il a été montré *in vitro* que les oligomères d' $\alpha$ -synucléine ont une plus grande affinité avec les liposomes que les monomères ou les fibrilles d' $\alpha$ -synucléine, et que sous cette forme cette protéine est capable de perméabiliser les liposomes (Lee H.J. *et al.*, 2002). Plusieurs groupes ont montré que l' $\alpha$ -synucléine pouvait adopter des structures en forme de pores et proposent que cette structure soit responsable de la perméabilisation observée, et donc de la cytotoxicité (Ding T.T. *et al.*, 2002 ; Lashuel H.A. *et al.*, 2003 ; Volles M.J. *et al.*, 2002). Il a également été montré que la dopamine stabilise les intermédiaires oligomériques d' $\alpha$ -synucléine. Cela pourrait expliquer pourquoi les neurones dopaminergiques sont les plus touchés et attribue un rôle à la dopamine dans la cytotoxicité (Conway K.A. *et al.*, 2001 ; Corti O. *et al.*, 2003).

Au point de vue cinétique, il a été montré que l' $\alpha$ -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 *et al.*, l' $\alpha$ -synucléine liée aux membranes a une tendance plus importante à former des agrégats que l' $\alpha$ -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' $\alpha$ -synucléine cytosolique (Lee H.J. *et al.*, 2002).

#### I.2.2.3. Mise en évidence d'un peptide amyloïdogénique

C'est la région 39-101 qui forme le corps des fibrilles et il a été montré que la région centrale de l' $\alpha$ -synucléine est cruciale pour l'agrégation et la cytotoxicité (Miake H. *et al.*, 2002 ; Del Mar C. *et al.*, 2005). Au sein de la famille des synucléines, l' $\alpha$ -synucléine possède des propriétés particulières qui pourraient expliquer pourquoi elle est capable de fibriller, alors que les autres non. Tout d'abord, selon le modèle de Chandra *et al.* concernant l'hélicité, l' $\alpha$ -synucléine possède une seconde hélice plus longue que celle de la  $\beta$ -synucléine. Ensuite, elle possède un domaine hydrophobe plus important que celui de la  $\gamma$ -synucléine (Chandra S. *et al.*, 2003). La différence entre l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -synucléine provient de la délétion des résidus 74-84 dans la séquence de la  $\beta$ -synucléine (George J.M., 2001). Sur base de cette différence, Giasson *et al.* avancent qu'un motif de douze acides aminés, correspondant aux résidus 71-82 du domaine hydrophobe de l' $\alpha$ -synucléine, est nécessaire et suffisant pour sa fibrillation. De plus, l'introduction d'un résidu chargé dans ce motif diminue le taux de polymérisation, une délétion empêche la formation de polymères et enfin, ce polypeptide peut polymériser seul et accentue la fibrillation de l' $\alpha$ -synucléine (Giasson B.I. *et al.*, 2001).



El-Agnaf *et al.* ont mis en évidence 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' $\alpha$ -synucléine. Ils désignent ce peptide comme étant le plus petit fragment possédant les propriétés d'agrégation et de toxicité (El-Agnaf O.M.A. *et al.*, 2002). 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  $\beta$  amyloïde et l'IAPP (Islet Amyloïde Polypeptide), comme montré en figure 16 (El-Agnaf O.M.A. *et al.*, 1998).



Figure 16 : Comparaison des séquences du NAC, du peptide A $\beta$ , 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. Protéines prions**

Les protéines prions sont généralement des protéines formant des structures amyloïdes. Elles sont particulières dans le sens où elles forment un agent infectieux capable de propager les structures amyloïdes d'un individu à un autre, que ce soit de façon pathologique pour la protéine PrP (protéine responsable de la maladie de Creutzfeld-Jacob) ou associée à des traits phénotypiques pour les protéines prions de champignons Ure2p, Sup35p, Rnq1p et HET-s. En plus des protéines prions naturelles, plusieurs groupes ont démontré que l'apolipoprotéine AII ou la protéine amyloïde A sérique, sous forme de fibrilles amyloïdes, pouvait déclencher ou accélérer une amyloïdose chez des souris saines suite à une injection ou à une absorption par voie orale, ce qui montre que le comportement prion pourrait être élargi à d'autres protéines amyloïdogéniques (Lundmark K. *et al.*, 2002, 2005 ; Korenaga T. *et al.*, 2006).

#### **I.3.1. La protéine PrP**

La protéine PrP humaine est une glycoprotéine membranaire comportant initialement 254 acides aminés. Suite à un processus de maturation, elle perd son peptide signal (résidus 1-22) et les 23 résidus C-terminaux sont remplacés par une ancre GPI (glycosyl phosphatidyl inositol) qui lui permet de se fixer à la membrane. Cette protéine possède deux sites de N-glycosylation aux résidus Asn181 et Asn197 et un pont disulfure entre les cystéines 179 et 214. Dans sa conformation native, celle-ci se compose de deux domaines, un domaine N-terminal (résidus 23-119) flexible de structure indéfinie qui contient cinq répétitions d'un octapeptide capable de lier les ions cuivre, et un domaine structuré C-terminal (résidus 120-231) présentant trois hélices  $\alpha$  (H1 : 144-154 ; H2 : 173-194 ; H3 : 200-228) et un feuillet  $\beta$  antiparallèle de deux brins (128-131 et 161-164) (Figure 17) (Liautard J.P. *et al.*, 2002). La compréhension de la fonction exacte de PrP est toujours limitée, bien que plusieurs fonctions lui aie été attribuées, telles que la liaison du cuivre, l'induction ou la protection contre l'apoptose ou la transduction de signal (Aguzzi A., 2006).

La protéine PrP est associée à plusieurs maladies appelées encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) ou maladies à prions, telles que la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD) ou l'insomnie familiale fatale (FFI). Les maladies à prions peuvent avoir une origine d'ordre sporadique, génétique ou infectieux (Tableau III). La plus commune

est la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD) avec 0,5 à 1,5 cas observé par million de personnes et par an. La déclaration sporadique de cette maladie correspond à environ 85% des cas, 10 à 15% sont d'origine génétique et 1% iatrogénique, c'est-à-dire dû à un acte médical tel qu'une greffe de cornée ou l'administration d'hormones extraites du cerveau de sujets atteints (Johnson R.T., 2005). Il existe également des cas de variantes de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Ceux-ci ont été observés chez de jeunes patients anglais alors que dans ce pays, plusieurs milliers de bovins nourris aux farines animales ont développé l'encéphalopathie spongiforme bovine (BSE) et ont été envoyés dans la chaîne alimentaire humaine. Il semble donc possible que les prions bovins puissent passer aux hommes par le biais de l'alimentation (Prusiner S.B., 1996 ; Coulthart M.B. *et al.*, 2001).

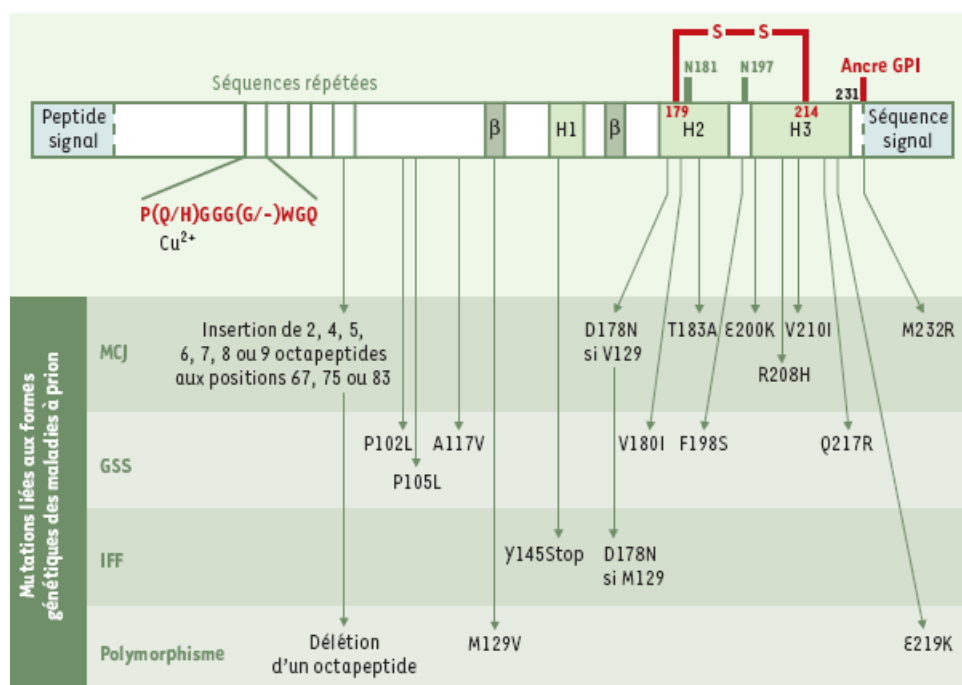


Figure 17 : Structure de la protéine PrP<sup>c</sup> humaine avec la localisation de différentes mutations de PrP et de la maladie en résultant (Liautard J.P. *et al.*, 2002).

Les maladies à prions peuvent avoir une origine héréditaire et à ce jour, on connaît plus de 20 mutations du gène de la PrP causant les formes héréditaires de ces maladies (Figure 17). Certaines de ces mutations sont connues pour induire la forme familiale de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD), la maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) et l'insomnie familiale fatale (FFI) (Prusiner S.B., 1994). Par contre, une transmission infectieuse est responsable du kuru. Il s'agit d'une maladie endémique de la Nouvelle Guinée découverte en 1957 et qui se transmet par cannibalisme (Gajdusek D.C. *et al.*, 1957 ; Zigas V. *et al.*, 1957).

La protéine PrP est une protéine très conservée parmi les mammifères, elle est donc également responsable de plusieurs maladies à prions animales (Tableau III). Celles-ci incluent entre autres la tremblante du mouton (ou scrapie) et l'encéphalopathie spongiforme bovine (BSE), aussi connue sous le nom de maladie de la vache folle (Prusiner S.B., 1996).

Tableau III : Maladies à prions rencontrées chez l'homme et différentes espèces de mammifères (Prusiner S.B., 1998)

Maladie	Hôte	Mécanisme de la pathogenèse
Kuru	Membres de la Tribu des Fore	Infection par le cannibalisme rituel
iCJD	Humains	Infection à partir d'HGH contaminée par des prions, de greffes de dure mère, ...
vCJD	Humains	Infection à partir de prions bovins?
fCJD	Humains	Mutations dans le gène de la protéine PrP
GSS	Humains	Mutations dans le gène de la protéine PrP
FFI	Humains	Mutations dans le gène de la protéine PrP (D178N, M129)
sCJD	Humains	Mutation somatique ou conversion spontanée de PrPc en PrPsc?
FSI	Humains	Mutation somatique ou conversion spontanée de PrPc en PrPsc?
Scrapie	Moutons	Infection de moutons génétiquement susceptibles
BSE	Bovins	Infection avec des MBM contaminées par des prions
TME	Visons	Infection avec des prions provenant de moutons ou de bovins
CWD	Cerfs mulet, Elans	Inconnu
FSE	Chats	Infection avec des tissus bovins ou des MBM contaminées par des prions
Encéphalopathies d'ongulés exotiques	Grand Coudoux, Nyala, Oryx	Infection avec des MBM contaminées par des prions

*iCJD, maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogénique CJD ; vCJD, variante de la CJD ; fCJD, CJD familiale ; sCJD, CJD sporadique ; GSS, maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker ; FFI, insomnie familiale fatale ; FSI, insomnie sporadique fatale ; BSE, encéphalopathie spongiforme bovine ; TME, encéphalopathie transmissible du vison ; CWD, maladie débilante chronique ; FSE, encéphalopathie spongiforme féline ; HGH, hormone de croissance humaine ; MBM, farines de viande et d'os.*

### I.3.1.1. Découverte des prions

La tremblante est une maladie neurologique fatale pour le mouton qui était déjà connue au 18<sup>ème</sup> siècle (Parry H.B., 1983) mais dont la nature infectieuse n'a été reconnue qu'en 1936 (Cuille J. *et al.*, 1936). En 1959, Hadlow suggéra que les pathologies cérébrales causées par le kuru et la tremblante étaient similaires et causées par un virus lent (Hadlow W.J., 1959). L'hypothèse du virus lent avait été proposée en 1954 par Bjorn Sigurdsson alors qu'il

travaillait sur la tremblante (Sigurdsson B., 1954). L'équipe de Alper (1967) puis celle de Gajdusek (1978) ont démontré que l'agent pathogène de la tremblante était très résistant aux rayonnements ionisants et ultraviolet qui dégradent normalement l'ADN (Alper T. *et al.*, 1967 ; Gibbs C.J. *et al.*, 1978). Les études de Prusiner ont ensuite montré que le pouvoir infectieux des prions n'était pas réduit par les méthodes qui dégradent l'ADN mais par les méthodes qui dénaturent les protéines. En 1982, Prusiner proposa l'hypothèse de la protéine seule ("Protein only hypothesis") et introduit le terme "prion" ("proteinaceous infectious particles") pour distinguer ces agents infectieux des virus, qui possèdent un matériel génétique (ADN ou ARN) (Prusiner S.B. 1982). Selon l'hypothèse de Prusiner, la protéine PrP se trouve sous deux conformations distinctes (PrP<sup>c</sup> et PrP<sup>sc</sup>) et la conformation PrP<sup>sc</sup> est capable de s'autopropager en convertissant PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup>. La forme cellulaire normale (PrP<sup>c</sup>) est soluble et sensible à la protéinase K, tandis que la forme infectieuse (PrP<sup>sc</sup>) est insoluble et résistante aux protéases (Prusiner S.B., 1996). La PrP<sup>sc</sup> correspondrait à la sous-unité constituant l'agent pathogène appelé prion. Au cours de la conversion, une portion de la structure hélicoïdale et random-coil de la PrP<sup>c</sup> va être transformée en feuillet  $\beta$ . La découverte des prions et de leurs modes d'action valut à Prusiner de recevoir le prix Nobel de médecine en 1997.

#### I.3.1.2. Conformations de la protéine PrP

Les deux isoformes de la protéine PrP possèdent la même séquence de 254 résidus et les études de spectrométrie de masse ont montré que leurs modifications post-translationnelles ne permettaient pas de les distinguer. Elles ne se différencient donc que par leur conformation. Des études de spectroscopie infrarouge (FTIR) et de dichroïsme circulaire ont démontré que la PrP<sup>c</sup> contient 42% d'hélice  $\alpha$  et 3% de feuillet  $\beta$  alors que la PrP<sup>sc</sup> contient 30% d'hélice  $\alpha$  et 43% de feuillet  $\beta$  (Prusiner S.B., 1996).

Dans un premier temps, à partir de la comparaison des séquences des protéines PrP de différentes espèces, de données expérimentales et d'études de modélisation moléculaire, quatre régions en hélice  $\alpha$  ont pu être proposées et un modèle tridimensionnel de PrP<sup>c</sup> a été généré (Figure 18 A). Ces hélices correspondent aux séquences 109-122 (hélice 1), 129-141 (hélice 2), 178-191 (hélice 3) et 202-213 (hélice 4). Quant à la PrP<sup>sc</sup>, elle a été modélisée en tenant compte de résultats expérimentaux sur la conformation de fragments de PrP. Le modèle présenté à la figure 18 B a été choisie parmi six autres modèles car sa structure présentait

notamment une meilleure corrélation avec les résidus impliqués dans la barrière inter-espèce (Figure 18 B) (Harrison P.M. *et al.*, 1997).

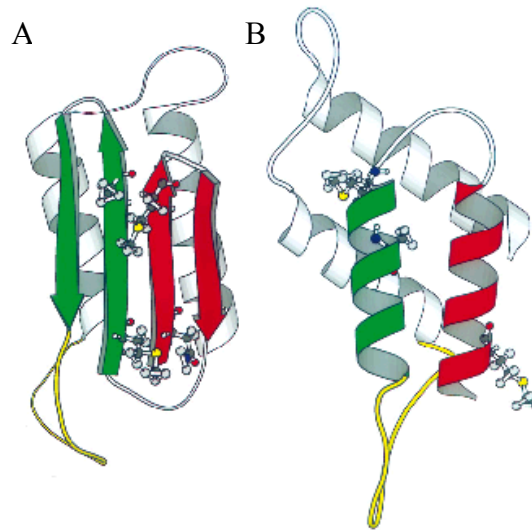


Figure 18 : Modèles plausibles pour la structure tertiaire de PrP<sup>c</sup> (A) et PrP<sup>sc</sup> (B) (Huang Z. *et al.*, 1995).

A l'heure actuelle, la structure RMN de la protéine PrP<sup>c</sup> de différentes espèces (homme, souris, hamster, ...) a été obtenue (Figure 19) (Zhan R. *et al.*, 2000 ; Riek R. *et al.*, 1996 ; Donne D.G. *et al.*, 1997). Ces structures révèlent une extrémité N-terminale (ou queue) désordonnée, un domaine globulaire avec trois hélices (H1 : 145-153 ; H2 : 172-194 ; H3 : 200-225) et un petit feuillet  $\beta$  antiparallèle (S1 : 128-131 ; S2 : 161-164). Ces derniers ne se retrouvent pas dans le modèle de la figure 18 A. (Harrison P.M. *et al.*, 1997).

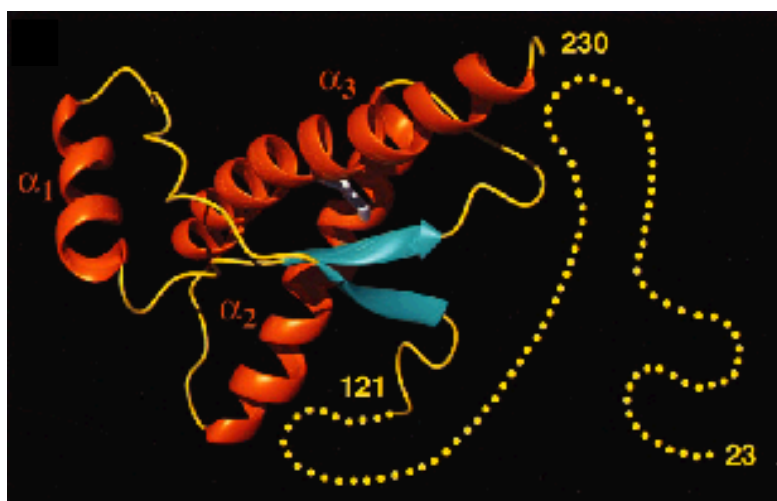


Figure 19 : Schéma de la structure tridimensionnelle de la protéine humaine hPrP (23-230). Les hélices  $\alpha$  sont représentées en rouge, les brins  $\beta$  en bleu et le domaine C-terminal non structuré en jaune (Zahn R. *et al.*, 2000).

La spectroscopie infrarouge (FTIR) a montré que les peptides correspondant aux quatre régions prédites en hélice  $\alpha$  ainsi que les segments PrP(113-127) et PrP(113-120) pouvaient aussi bien adopter une conformation  $\alpha$  que  $\beta$ , en fonction de leur environnement. En solution, ces peptides, excepté PrP(129-141), adoptent une conformation  $\beta$  et précipitent lentement sous forme de fibrilles amyloïdes. Le peptide PrP(113-120) est le plus amyloïdogénique (Harrison P.M. *et al.*, 1997). Nguyen *et al.* ont également montré que la région PrP(109-122) est importante pour le processus de conversion de PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup>. De petites quantités de PrP(109-122) sont capables d'induire la formation d'agrégats riches en structure  $\beta$  chez les fragments PrP(104-122) et PrP(129-141) qui ont normalement une structure hélicoïdale ou random-coil en solution (Nguyen J. *et al.*, 1995). De plus, la séquence 109-122, correspondant à l'hélice 1, est la région la plus conservée à travers les espèces et la présence de mutations dans cette région est associée à des formes héréditaires des maladies à prions (Harrison P.M. *et al.*, 1997).

Bien que la structure atomique exacte de PrP<sup>sc</sup> ne soit pas encore connue aujourd'hui, plusieurs modèles ont pu être construits sur base de différentes données expérimentales. En 2002, Wille *et al.* ont proposé un modèle en se basant sur des données de microscopie électronique de cristaux 2D avec une résolution de 7Å. Selon eux, seule une structure de PrP<sup>sc</sup> en hélice  $\beta$  parallèle permet de satisfaire les données (Figure 20). Au sein des fibrilles, cette structure formerait un trimère ou un hexamère d'hélices  $\beta$  droites ou gauches (Wille H. *et al.*, 2002). Leur dernière publication penche pour un trimère d'hélices  $\beta$  gauches, avec le fragment 89-175 formant l'hélice  $\beta$ , le reste de la protéine formant un faisceau d'hélices  $\alpha$  et les sucres restant à l'extérieur du faisceau. Dans ce modèle, l'hélice H1 se déplie pour évoluer vers une conformation en brins  $\beta$  (Wille H. *et al.*, 2002 ; Govaerts C. *et al.*, 2004).

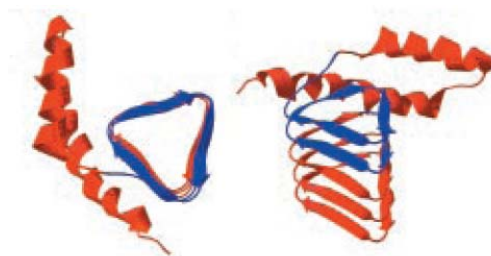


Figure 20 : Vues du haut et de côté d'un des modèles d'hélice  $\beta$  de PrP<sup>sc</sup> proposé par Wille *et al.* (Wille H. *et al.*, 2002).

Mornon *et al.* et DeMarco *et al.* ont également développé d'autres modèles qui concordent avec les données de microscopie électronique de Wille *et al.* (Figure 21 ; Mornon

J.P. *et al.*, 2002 ; DeMarco M.L. *et al.*, 2004). En utilisant des méthodes d'analyse de séquence et de modélisation, l'équipe de Mornon a proposé un modèle qui se base sur la conversion de l'hélice H2 en trois brins  $\beta$  successifs. Quant au modèle proposé par DeMarco, il se base sur des simulations de dynamique moléculaire réalisées à partir des résidus 109-219 de la protéine PrP de hamster portant la mutation D147N. Dans leur modèle, les trois hélices sont conservées, deux nouveaux brins sont formés, le brin E1 (116-119) et le brin E4 (135-140), et les brins S1 et S2 sont allongés et renommés E2 et E3. Les brins E1-E2-E3 forment alors un feuillet  $\beta$  de trois brins (DeMarco M.L. *et al.*, 2004).

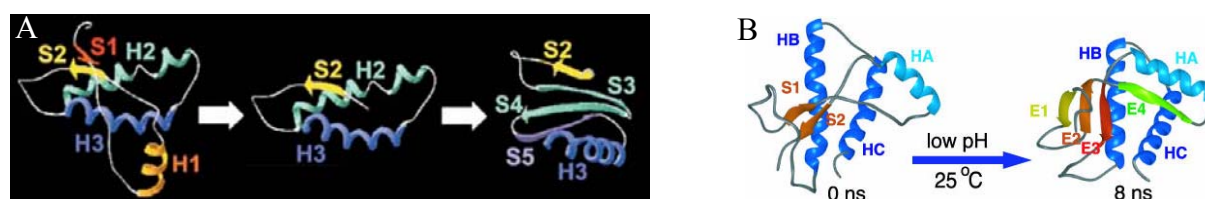


Figure 21 : Modèles de PrP<sup>sc</sup> obtenus par les équipes de Mornon (A) et DeMarco (B) (Mornon J.P. *et al.*, 2002 ; DeMarco M.L. *et al.*, 2004).

### I.3.1.3. La barrière inter-espèce et les souches de prions

Dans les années 1970, Gajdusek démontra que la tremblante pouvait être transmise d'un animal à un autre via l'injection intracérébrale d'une préparation de tissu de cerveau infecté (Gajdusek D.C. *et al.*, 1966). Cependant, la transmission de la maladie d'une espèce à une autre peut se révéler difficile, ce phénomène est appelé "barrière inter-espèce" (Prusiner S.B., 1996). Chez les mammifères, la barrière des espèces se traduit par des périodes d'incubation plus longues ou des transmissions inefficaces des ESSTs d'une espèce à une autre (Wickner R.B. *et al.*, 2007). Tout comme un virus peut avoir des souches distinctes, produisant des symptômes différents au sein d'hôtes génétiquement identiques, un prion peut également avoir différentes souches. Ce phénomène est reconnu depuis longtemps pour la tremblante (Bruce M.E. *et al.*, 1992). La PrP<sup>sc</sup> des souches de prions présente des fragments résistants aux protéases de différentes tailles ou des spectres infrarouges différents (Bessen R.A. *et al.*, 1992 ; Caughey B. *et al.*, 1998 ; Wickner R.B. *et al.*, 2007). Les souches de prion, ainsi que la barrière des espèces, résulteraient de différences de conformations entre PrP<sup>sc</sup> plutôt que dans la séquence. Il a été montré que les souches de prions sont affectées différemment par la barrière des espèces (Bruce M.E. *et al.*, 1992). Collinge a proposé que la protéine PrP de chacune des espèces est capable d'adopter des ensembles de conformations différentes et



qu'une souche donnée de prion ne peut infecter que les espèces pour lesquelles la protéine PrP peut adopter cette conformation (Figure 22 ; Collinge J., 1999). Par exemple, la BSE est une souche distincte d'ESSTs qui a une barrière d'espèces réduite comparée aux souches de tremblante (Wickner R.B. *et al.*, 2007).

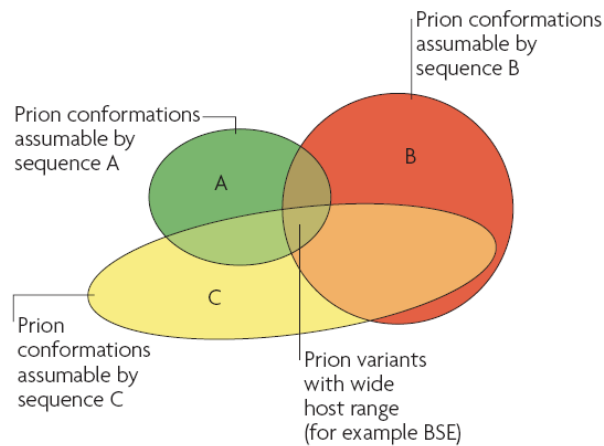


Figure 22 : Schéma expliquant le phénomène de barrière des espèces entre souches de prions (Wickner R.B. *et al.*, 2007).

### I.3.2. Les protéines prions de champignons

Bien que les prions soient généralement associés à des agents infectieux responsables d'encéphalopathies spongiformes subaigües transmissibles (ESST) chez les mammifères, le concept de prion a été étendu à des protéines de champignons en 1994 lorsque Wickner proposa que le comportement génétique de l'élément non mendélien [*URE3*] de *Saccharomyces cerevisiae* pouvait être expliqué si la protéine Ure2 formait un prion (Wickner R.B., 1994). A l'heure actuelle, six prions fongiques sont connus, incluant quatre protéines amyloïdes et deux enzymes (celles-ci ne seront pas abordées dans ce chapitre). Ces protéines amyloïdes correspondent aux protéines Ure2, Sup35 et Rnq1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et à la protéine HET-s du champignon filamentueux *Podospora anserina* (Wickner R.B. *et al.*, 2007). Ces prions sont transmis par l'intermédiaire d'un changement de conformation des protéines natives, la transconformation pouvant se propager par la configuration anormale. Les prions de levure sont caractérisés par un domaine riche en Q/N qui porte l'activité prion. Ces prions peuvent fournir différentes lignées héritées de façon non mendélienne (Sherman M.Y., 2004 ; Fowler D.M. *et al.*, 2007).

### I.3.2.1. Description des prions de champignons

[PSI<sup>+</sup>] et [URE3] sont deux éléments non chromosomiques de la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui ont respectivement été découverts par Brian Cox (Cox B.S., 1965) et François Lacroute (Lacroute F., 1971) et correspondent aux formes prions de Sup35p et Ure2p. Ure2p est une protéine de 354 acides aminés qui joue un rôle important dans la réponse cellulaire aux sources d'azote. Elle régule le catabolisme de l'azote et réprime les gènes codant pour les enzymes et transporteurs requis pour l'utilisation des sources pauvres en azote lorsque de bonnes sources d'azote ne sont pas disponibles (Lian H.Y. *et al.*, 2006). Cette protéine présente une homologie avec la glutathione S-transférase et se divise en deux domaines ; le domaine prion, qui correspond à la région N-terminale riche en asparagine et glutamine, et le domaine C-terminal qui porte la fonction de régulation du catabolisme de l'azote (Figure 23). Le domaine prion n'est pas structuré sous forme native (Pierce M.M. *et al.*, 2005). Le prion de la protéine Ure2 correspond à une forme amyloïde non fonctionnelle de la protéine Ure2 capable de s'autopropager.

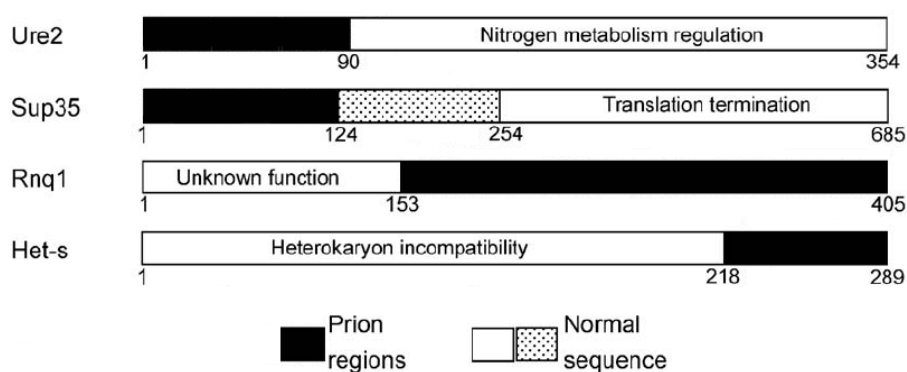


Figure 23 : Comparaison structurelle et fonctionnelle des protéines prions de champignons. Hormis pour la protéine Het-s, les domaines prions correspondent à des régions de poly-Q/N (Lian H.Y. *et al.*, 2006).

Sup35p est une protéine de 685 acides aminés qui agit comme facteur de terminaison de la traduction, assurant la fin de la synthèse protéique à un codon stop. L'agrégation de Sup35p empêche ce mécanisme et génère des protéines avec une extension du côté C-terminal. Sup35p est donc importante pour la fidélité de la traduction (Cox B.S., 1965). Sup35p est composée d'un domaine prion N-terminal (N) riche en asparagine et en glutamine de 123 résidus qui forme les fibrilles amyloïdes ; d'un domaine central (M) très chargé de 130 résidus et d'un domaine C-terminal (C) qui est suffisant pour la terminaison de la traduction

(TerAvanesyan A. *et al.*, 1994). Le domaine N-terminal n'est pas nécessaire à la fonction de Sup35p mais est requis pour la formation et la propagation de [PSI<sup>+</sup>], qui résulte d'un changement de conformation s'autopropageant de Sup35p. (Derkatch I.L. *et al.* 2004) La délétion du gène SUP35 ou uniquement de la partie codant pour le domaine C-terminal est létale (Kushnirov V.V. *et al.*, 1998).

Rnq1 est une protéine de 405 acides aminés dont le nom signifie "riche en résidus N et Q". Cette protéine est associée à l'élément non chromosomique [PIN<sup>+</sup>] correspondant à la forme amyloïde de Rnq1. [PIN<sup>+</sup>] est requis pour l'induction de [PSI<sup>+</sup>] (Derkatch I.L. *et al.*, 2001 ; Sondheimer N. *et al.*, 2000).

HET-s est une protéine de 289 acides aminés qui possède deux domaines distincts, le domaine globulaire N-terminal de 230 résidus et le domaine flexible C-terminal (230-289). Ce dernier forme le corps des fibrilles et peut induire seul la propagation du prion et la formation de fibrilles (Nazabal A. *et al.* 2005). Cette protéine est impliquée dans une réaction de mort cellulaire génétiquement programmée appelée incompatibilité végétative ("heterokaryon incompatibility"). Lorsque les hyphes de colonies adjacentes se rencontrent, ils peuvent fusionner et générer une cellule multinucléée, appelée hétérocaryon. Le locus het-s possède deux allèles, HET-s et HET-S qui ne diffèrent de HET-s que par 13 résidus. Seul le premier est capable de former des fibrilles amyloïdes. Il y a incompatibilité lorsqu'un hyphe contenant HET-s agrégé fusionne avec un hyphe contenant HET-S (les autres combinaisons ne posent pas de problème), ce qui tue l'hétérocaryon et crée une barrière entre les deux colonies (Dalstra H.J. *et al.*, 2005).

### I.3.2.2. Propriétés des prions et structures amyloïdes

Les prions fongiques possèdent trois traits génétiques caractéristiques qui les distinguent des virus et plasmides. Premièrement, même si un prion peut être traité, il peut néanmoins se représenter *de novo* dans la souche traitée parce que la protéine est encore présente dans la cellule et peut se retransformer en prion. Deuxièmement, une surproduction transitoire de la protéine devrait augmenter la fréquence d'apparition de la forme prion, simplement parce que plus de protéines sont susceptibles de se transformer. Troisièmement, le gène encodant la protéine est nécessaire à la propagation du prion et, pour les prions qui correspondent à la forme inactive d'une protéine, une mutation de ce gène peut produire le même phénotype que la présence du prion (Wickner R.B. *et al.*, 2007).

[*PSI*<sup>+</sup>], [URE3], [Het-s] et [*PIN*<sup>+</sup>] correspondent aux formes amyloïdes de Sup35p, Ure2p, HET-s et Rnq1 et il a été montré que chacun de ces prions est transmissible à des cellules non infectées en introduisant dans ces dernières des fibrilles amyloïdes formées *in vitro* à partir de la protéine recombinante correspondante (King C.Y. *et al.*, 1997 ; Baxa U. *et al.*, 2005 ; Dos Reis S. *et al.*, 2002 ; Brachmann A.B.U. *et al.*, 2005 ; Maddelein M.L. *et al.*, 2002 ; King C.Y. *et al.*, 2004 ; Patel B.K. *et al.*, 2007).

Le mélange aléatoire des acides aminés des domaines prions de Ure2p et de Sup35p n'empêche pas la formation des prions par ces protéines (Ross E.D. *et al.*, 2004 ; 2005). Ces résultats montreraient que ce n'est pas la séquence d'acides aminés qui détermine la capacité à former des prions mais le type d'acides aminés présents. Selon Wickner *et al.*, la structure la plus probable des fibrilles amyloïdes correspondrait à un feuillet  $\beta$  parallèle au sein duquel les acides aminés identiques de deux chaînes sont adjacents (Ross E.D. *et al.*, 2005 ; Chan J.C.C. *et al.*, 2005 ; Wickner R.B. *et al.*, 2007). Cette hypothèse est supportée par une étude réalisée par Shewmaker *et al.* en RMN du solide de fibrilles amyloïdes comportant des tyrosines marquées au <sup>13</sup>C (Shewmaker F. *et al.*, 2006). De plus, l'analyse par diffraction aux rayons X de structures amyloïdes formées par un peptide de sept résidus de Sup35N montre également cette structure (Nelson R. *et al.*, 2005).

#### I.3.2.3. Le rôle des chaperonnes

Pour *Saccharomyces cerevisiae*, plusieurs chaperonnes et leurs cofacteurs sont cruciaux pour la propagation des prions, incluant les chaperonnes Hsp104, Hsp70s, Hsp40s. La protéine "heat shock" 104 (Hsp104) est requise pour chacun des prions de levure (Wickner R.B. *et al.*, 2007 ; Chernoff Y.O. *et al.*, 1995 ; Moriyama H. *et al.*, 2000). En coopération avec Hsp70s et Hsp40s, Hsp104 peut désagréger les protéines dénaturées par la chaleur et l'on pense qu'elle intervient dans la propagation des prions en fragmentant les filaments amyloïdes pour former de nouveaux noyaux de nucléation. La surproduction de Hsp104 élimine [*PSI*<sup>+</sup>] mais pas [URE3] ou [*PIN*<sup>+</sup>] (Glover J.R. *et al.*, 1998 ; Tuite M.F. *et al.*, 2004 ; Wickner R.B. *et al.*, 2007).

#### I.3.2.4. La barrière inter-espèce et les souches de prions

Des souches de prions de levures ont été identifiées sur base de différences dans la stabilité et l'intensité du phénotype (Schlumpberger M. *et al.*, 2001 ; Bradley M.E. *et al.*,

2002) et il a été montré que la différence entre souches [*PSI*<sup>+</sup>] se base sur une différence dans la structure amyloïde. Tanaka *et al.* ont montré que SupNM, fragment de Sup35p comprenant les domaines N et M, peut adopter des conformations différentes dans les fibrilles amyloïdes lorsque la polymérisation est initiée à 4°C ou à 37°C. L'introduction de ces conformations, appelée Sc4 et Sc37, dans des levures induit respectivement un phénotype fort ou faible *in vivo* (Tanaka M. *et al.*, 2004). Ces différences héritables, associées à des souches de prions, sont donc dues à des différences de conformation entre Sc4 et Sc37. Toyama *et al.* montrent que la structure amyloïde de Sc4 couvre les acides aminés 4-37, tandis que celle de Sc37 comprend les acides aminés 4-70 ; de plus, l'introduction de mutations (proline) au niveau des résidus 38-70 affecte la croissance des fibrilles de Sc37 mais pas celle de Sc4 (Figure 24) (Toyama B.H. *et al.*, 2007). Ces données expliquent pourquoi Sc37 forme des fibrilles plus stables et montre une capacité réduite à subir la propagation due à Hsp104 (Tanaka M. *et al.*, 2006).

Tout comme chez les prions de mammifères, une barrière des espèces bloque l'induction de prions entre protéines Sup35 de différentes espèces de levures. Cette barrière serait également due aux différentes conformations que chacune des protéines Sup35 serait capable d'adopter (Santoso A. *et al.*, 2000 ; Tanaka M. *et al.*, 2005 ; Wickner R.B. *et al.*, 2007).

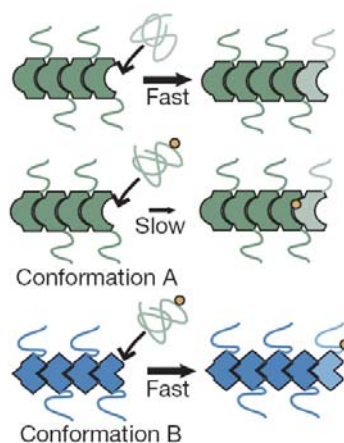


Figure 24 : Schéma montrant que l'introduction de mutations (disque jaune) dans les régions importantes pour la formation des fibrilles dans la conformation A (mais pas dans la conformation B) résulte en une diminution de la vitesse de polymérisation qui dépend de la conformation adoptée (Toyama B.H. *et al.*, 2007).

#### I.3.2.5. Fonctions biologiques des prions de champignons

Le prion [Het-s] est à la base de l'incompatibilité végétative, un processus utilisé par beaucoup de champignons filamenteux, pour prévenir l'infection par des virus fongiques, ce qui suggère que le prion de la protéine HET-s assume une fonction biologique (Wickner R.B. *et al.*, 2007). Le prion HET-s permettrait ainsi de limiter la progression d'infections virales en bloquant la fusion entre colonies différentes génétiquement (Fowler D.M. *et al.*, 2007).

Au sein des populations naturelles, les prions [*PSI*<sup>+</sup>] et [URE3] peuvent se déclarer *de novo* avec une fréquence aussi élevée que 10<sup>-6</sup>. Cependant, des études récentes montrent que les prions [*PSI*<sup>+</sup>] et [URE3] ne seraient pas fréquemment rencontrés au sein de différents isolats sauvages. Ceci laisse penser qu'un prion qui n'est pas trouvé au sein de levure sauvage doit être dommageable pour son hôte (Nakayashiki T. *et al.*, 2005 ; Resende C.G. *et al.*, 2003 ; Wickner R.B. *et al.*, 2007), bien que des levures [*PSI*<sup>+</sup>] ou [URE3] montrent des avantages de croissance sélectifs dans certaines conditions (True H.L. *et al.*, 2004). Un argument pour le rôle fonctionnel des prions [*PSI*<sup>+</sup>] et [URE3] est que le domaine N-terminal n'est pas essentiel à la fonction de la protéine mais qu'il a pourtant été maintenu au cours de l'évolution (Chernoff Y.O. *et al.*, 2000). Cependant, il a été montré que le domaine riche en N/Q de Ure2p de *Saccharomyces paradoxus*, qui ne diffère que légèrement de celui de *S. cerevisiae*, ne forme pas de prion et qu'il pourrait en fait avoir une fonction indépendante de la formation prion (Talarek N. *et al.*, 2005 ; Shewmaker F. *et al.*, 2007 ; Urakov V.N. *et al.*, 2006 ; Wickner R.B. *et al.*, 2007).

#### I.4. *Les peptides obliques*

Les peptides obliques sont de courts fragments protéiques de 11 à 18 acides aminés qui possèdent un gradient d'hydrophobicité le long de leur axe (Figure 25) lorsqu'ils sont en conformation hélicoïdale. Ce gradient leur permet de s'insérer obliquement par rapport à une interface hydrophile/hydrophobe, telle une membrane biologique (Brasseur R. *et al.*, 1990).

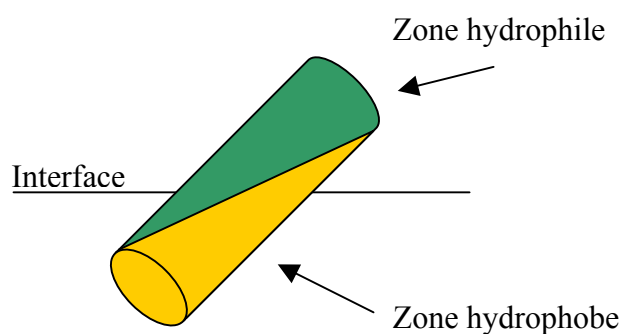


Figure 25 : Représentation schématique d'un peptide oblique.

Le premier peptide oblique fut mis en évidence par modélisation moléculaire en 1988 par l'équipe du professeur Brasseur. Il 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 *et al.* ont pu déterminer l'orientation oblique, sous forme d'hélice  $\alpha$ , 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 *et al.* ont utilisé la RMN et les techniques EPR pour montrer que le domaine de fusion de l'hémagglutinine du virus influenza adoptait une orientation oblique et une conformation hélicoïdale dans les conditions qui entraînent le phénomène de fusion de ce virus (Han X. *et al.*, 2001).

##### I.4.1. **Propriétés des peptides obliques**

Les peptides obliques possèdent une distribution asymétrique des résidus hydrophobes qui provoque l'apparition d'un gradient d'hydrophobicité le long de leur axe lorsqu'ils sont hélicoïdaux. En raison de ce gradient, l'angle d'insertion des peptides obliques dans les membranes se situe généralement entre  $30^\circ$  et  $60^\circ$ . Les peptides obliques se distinguent donc des hélices  $\alpha$  transmembranaires (Figure 26 a, c et d), qui s'orientent perpendiculairement à la

bicouche, et des hélices  $\alpha$  amphipathiques (Figure 26 b), qui s'orientent parallèlement au plan de la bicouche (Figure 26 e). Les peptides obliques possèdent généralement une hydrophobicité moyenne comprise entre 0,2 et 0,9 ; selon l'échelle d'hydrophobicité consensus d'Eisenberg (-2,5 à 1,4) (Eisenberg D. *et al.*, 1982).

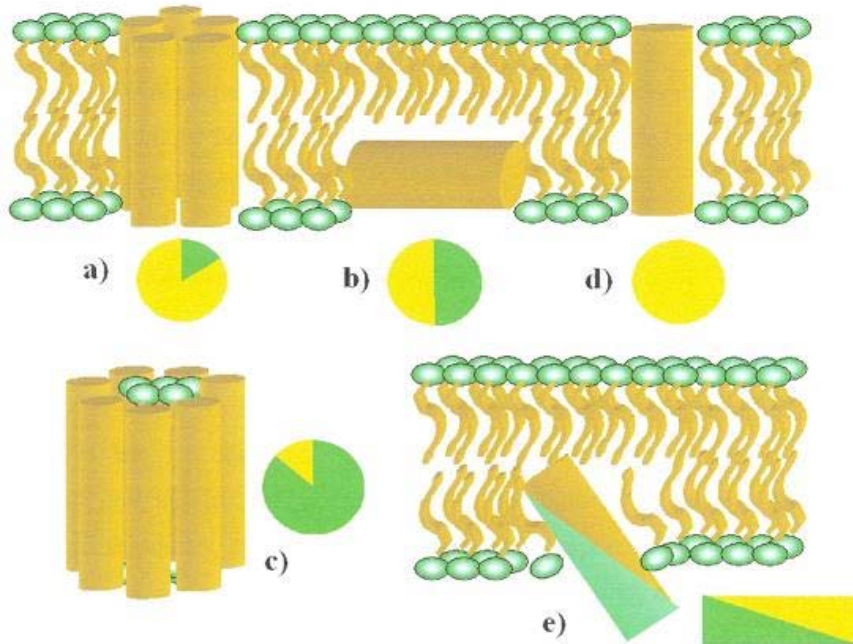


Figure 26 : Orientation des hélices alpha dans les membranes. La couleur orange représente des zones hydrophobes et la couleur verte, des zones hydrophiles (Brasseur R., 1997).

Par leur insertion oblique, ces peptides 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 de nouvelles 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  $45^\circ$  et  $55^\circ$  (Brasseur R., 2000).

D'un point de vue conformationnel, des études réalisées en spectroscopie infrarouge et en dichroïsme circulaire suggèrent que les peptides obliques adoptent plutôt une conformation  $\beta$  ou random-coil en solution et une conformation  $\alpha$  lors de leur interaction avec les lipides (Martin I. *et al.*, 1994).



### I.4.2. 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 détectés 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.

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 27 a). Lorsque la membrane est courbée, un feuillet de chaque bicouche peut, par une rotation de 90° (Figure 27 c), favoriser la formation d'une connexion semitoroïdale (Figure 27 d). Cette connexion peut alors se propager radialement pour former l'intermédiaire d'hémifusion (Figure 27 e). La tension sur cette bicouche conduit à sa rupture et à la formation du pore de fusion (Figure 27 f) (Brasseur R., 2000).

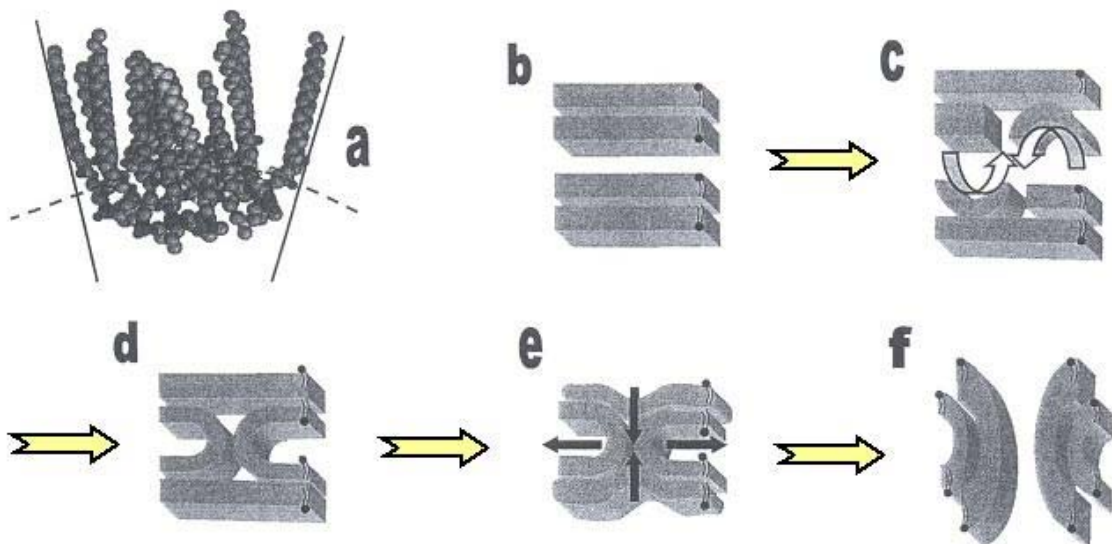


Figure 27 : Représentation schématique des événements conduisant à la fusion de deux membranes par l'intermédiaire d'un peptide oblique (Brasseur R., 2000).

Les peptides obliques pourraient intervenir dans d'autres processus biologiques. Ces peptides ont été trouvés dans la séquence signal de certaines protéines (l'invertase de levure, l'ApoB100) (Talmud P. *et al.*, 1996 ; Rahman M. *et al.*, 1997) et pourraient intervenir dans la sécrétion protéique. Ils ont été mis en évidence dans des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides (l'ApoAII, l'ApoCIII, ...) (Peelman F. *et al.*, 1997 ; Pérez-Méndez O. *et al.*, 1998 ; Lins L. *et al.*, 2001) et pourraient avoir un rôle dans le transport de lipides ou la lipolyse. Ils ont également été découverts 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.4.3. Hypothèses sur le(s) rôle(s) des peptides obliques au sein des 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  $\beta$  amyloïde (A $\beta$ ), 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 $\beta$  (Pillot T. *et al.*, 1996) et au fragment 118-135 de la protéine PrP (Pillot T. *et al.*, 1997).

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 28). Expérimentalement, les peptides obliques de A $\beta$  et de PrP sont capables d'induire de la fusion de liposomes (Pillot T. *et al.*, 1996 ; Pillot T. *et al.*, 1997). De plus, ceux-ci se retrouvent dans le domaine impliqué dans la transconformation et la pathogénicité de ces deux protéines.

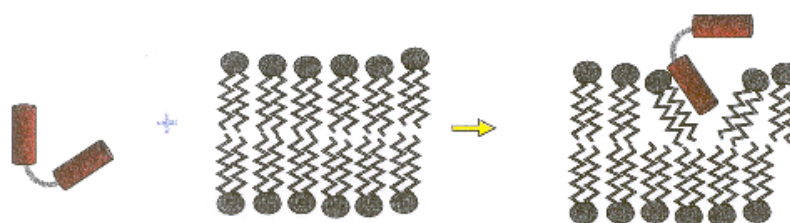


Figure 28 : Interaction entre un peptide oblique (cylindre rouge) et la bicouche lipidique.

D'autre part, les peptides obliques pourraient aussi être impliqués dans le processus de transconformation de ces protéines. Deux hypothèses ont été émises. Le peptide oblique d'une protéine pourrait s'insérer à l'interface d'une autre protéine, c'est-à-dire entre le cœur hydrophobe et l'enveloppe plus hydrophile de cette protéine, et déstabiliser sa conformation native, entraînant l'apparition de structures  $\beta$  (Figure 29). Dans la seconde hypothèse, un peptide oblique pourrait, suite à des modifications de son environnement, passer d'une conformation  $\alpha$  (ou random-coil) à une conformation  $\beta$ . 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.

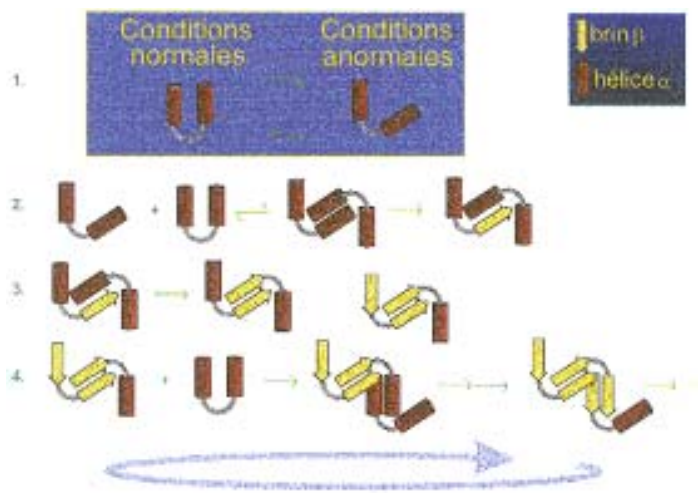


Figure 29 : Schéma représentant la première des deux hypothèses émises au sujet des peptides obliques.



**BUT DU TRAVAIL**



## II. But du travail

Les protéines amyloïdogéniques présentent 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, malgré les nombreuses études réalisées sur le sujet, ces phénomènes ne sont pas encore complètement expliqués tant au niveau énergétique que structural. Cependant, une nouvelle perception de ces phénomènes est apparue lorsqu'un motif structural particulier a été mis en évidence dans le domaine de plusieurs protéines amyloïdogéniques impliquées dans la transconformation et la pathogénicité de ces protéines. Il s'agit des peptides obliques. Ils ont pu être détectés dans la protéine PrP (fragment 118-135) et le peptide  $\beta$  amyloïde (fragment 29-42). La présence de peptides obliques dans ces protéines suggère que ceux-ci pourraient jouer un rôle dans la toxicité associée à ces protéines en affectant directement la membrane cellulaire des neurones grâce à leur propriété déstabilisatrice vis-à-vis des lipides. D'autre part, cette découverte a conduit le groupe du Professeur Brasseur à proposer que les peptides obliques pourraient être impliqués dans le processus de transconformation de ces protéines. Deux hypothèses ont été émises. Dans la première, le peptide oblique d'une protéine pourrait s'insérer à l'interface d'une autre protéine, c'est-à-dire entre le cœur hydrophobe et l'enveloppe plus hydrophile de cette protéine, et déstabiliser sa conformation native entraînant la modification structurale de toute la protéine. Dans la seconde hypothèse, un peptide oblique pourrait, suite à des modifications de son environnement, passer d'une conformation  $\alpha$  (ou random-coil) à une conformation  $\beta$ . Cette transition entraînerait le changement de conformation de toute la protéine. Dans les deux cas de figure, le peptide oblique devrait se trouver dans le domaine de la protéine changeant de conformation.

L'objet de ce travail est de mettre en évidence, par modélisation moléculaire, la présence de peptides obliques dans la séquence des protéines amyloïdogéniques connues et d'étudier expérimentalement les propriétés déstabilisatrices de plusieurs de ces peptides obliques vis-à-vis de liposomes, ainsi que leur structure et leur toxicité. Ce travail devrait permettre de généraliser la présence de fragments obliques dans les protéines amyloïdogéniques et de valider les hypothèses avancées quant au rôle potentiel de ces peptides dans les phénomènes de transconformation et de neurotoxicité associés à ces protéines.





# **MATERIEL ET METHODES**



### III. Matériel et méthodes

#### III.1. *Matériel*

##### III.1.1. *In Silico*

Les analyses ont été effectuées sur un ordinateur doté d'un processeur Pentium IV (2,4GHz) muni du système d'exploitation Windows XP. Les analyses de séquences et les modélisations moléculaires ont été réalisées grâce aux programmes SwingHCA (Hydrophobic Cluster Analysis), ZTammo (Theoretical Analysis of Molecular Membrane Organization), ZProt et ZUltime développés au CBMN, et au logiciel HyperChem 5.0 (Hypercube inc.), utilisé pour la construction et la minimisation des peptides, WinMGM (Windows Molecular Graphics Manipulation, Rahman M. *et al.*, 1994) et YAGME, pour la visualisation des peptides, et SigmaPlot 2000 (SPSS inc.), pour la manipulation des données. Les séquences des protéines amyloïdogéniques sont issues de la banque de données SWISSPROT disponible sur internet : <http://www.expasy.org/sprot/sprot-top.html>.

##### III.1.2. *Partie expérimentale*

- Les solvants :
  - Le Trifluoroéthanol (TFE ; Sigma, St Louis, Montana, USA)
  - Le Diméthylsulfoxyde (DMSO ; Sigma, St Louis, Montana, USA)
  - L'Hexafluoropropanol (HFP ; Sigma, St Louis, Montana, USA)
  - Chloroforme/méthanol (2/1 vol/vol)
- Les marqueurs fluorescents :
  - L'octadecylrhodamine chloride B (R18 ; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)
  - L'acide 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonique (HPTS ; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)
  - Le p-xylylènebis[pyridinium] bromide (DPX ; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)

- Matériel et méthodes -

- Les phospholipides :
  - Egg PhosphatidylCholine (PC ; Sigma, St Louis, Montana, USA)
  - Egg PhosphatidylEthanolamine (PE ; Lipid Product, redhill, Surrey, UK)
  - Egg PhosphatidylInositol (PI ; Lipid Product, redhill, Surrey, UK)
  - Egg PhosphatidylSerine (PS ; Sigma, St Louis, Montana, USA)
  - Sphingomyelin (SM ; Sigma, St Louis, Montana, USA)
  - Cholesterol (CHOL ; Sigma, St Louis, Montana, USA)
- Les tampons :
  - Tampon Tris pH 7,4 (1) : Tris-HCl 10mM (Sigma, St Louis, Montana, USA)  
NaCl 150mM (Merck Eurolab, Leuven, Belgium)  
EDTA 0,01% (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)  
NaN<sub>3</sub> 1mM (Sigma, St Louis, Montana, USA)
  - Tampon Tris pH 7,4 (2) : Tris-HCl 10mM (Sigma, St Louis, Montana, USA)  
NaCl 150mM (Merck Eurolab, Leuven, Belgium)
  - Tampon Tris pH 7,4 (3) : Tris-HCl 1mM (Sigma, St Louis, Montana, USA)

Plusieurs peptides obliques et un mutant ont été synthétisés au cours de cette étude. Le peptide oblique de l' $\alpha$ -synucléine (GGAVVTGVTAVA), ainsi que ceux des protéines Ure2 (SGAILLHLVNKYYK) et Sup35 (GGKDHVSLIFMGHV) ont été synthétisés par V. Stroobant (Ludwig Institute, UCL, Belgique) et sont purs à plus de 80%. Le mutant du peptide oblique de l' $\alpha$ -synucléine (GGAVSAGVASVT ; pur à 91%) a été synthétisé par EUROGENTEC et le peptide oblique de la protéine HET-s (VVTAAALHGGIRIS ; pur à 91%) par GL Biochem Ltd. Tous ces peptides sont acétylés du côté N- terminal et amidés du côté C-terminal. Les peptides obliques de la transthyretine (CPLMVKVLDAV ; pur à 97%) et de la protéine HypF (VQGVGFRPFVWQLAQ ; pur à 89%) ont été synthétisés par GL Biochem Ltd, tandis que le peptide oblique de l'insuline (SHLVEALYLVC ; pure à 92%) a été synthétisé par NeoMPS S.A.

## III.2. Méthodes

### III.2.1. Analyse de la séquence

#### III.2.1.1. La méthode HCA (Hydrophobic Cluster Analysis)

Le graphique HCA représente, en deux dimensions, la séquence protéique en conformation hélice  $\alpha$  (Gaboriaud C. *et al.*, 1987). Ces graphiques sont construits en enroulant la séquence autour d'un cylindre (a) puis en coupant celui-ci parallèlement à son axe et en le déroulant dans un plan (b). Cette dernière opération sépare des acides aminés voisins, le graphique est donc dupliqué pour restaurer l'environnement de chaque acide aminé (c) (Figure 30).

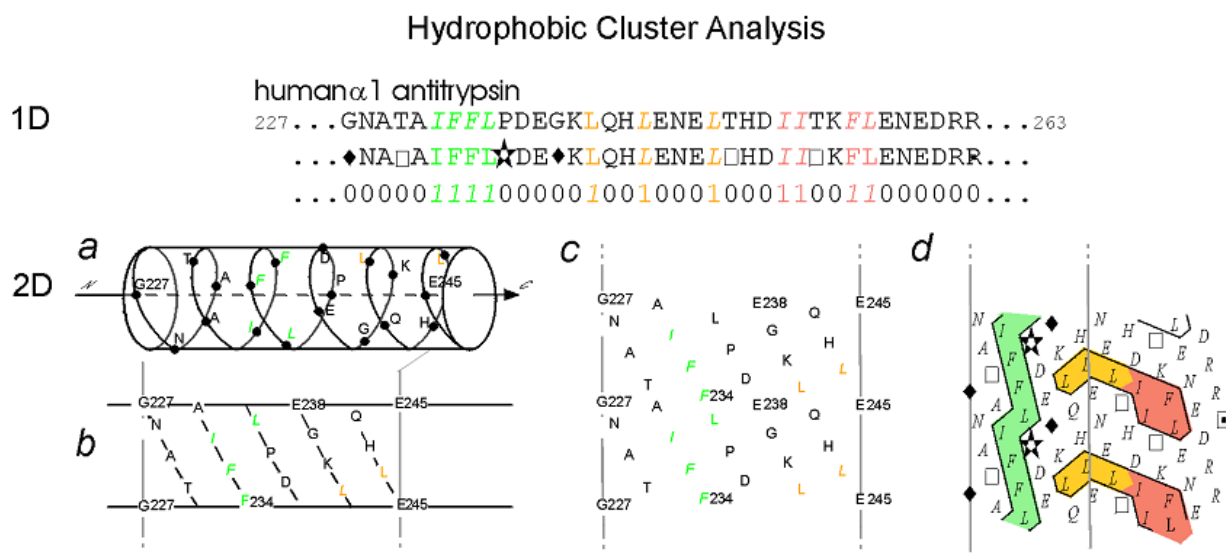


Figure 30 : Schéma explicatif de la méthode HCA (pour les explications, voir le texte). Dans cette représentation, la proline est représentée par une étoile, la glycine par un losange, la thréonine par un carré et la sérine par un carré pointé. Les zones entourées et colorées correspondent aux amas hydrophobes, l'amas vert correspondant à un brin  $\beta$  et les amas orangés correspondant à des hélices  $\alpha$

([http://www.lmcp.jussieu.fr/~callebau/hca\\_method.html](http://www.lmcp.jussieu.fr/~callebau/hca_method.html)).

Les acides aminés hydrophobes (M,I,L,V,F,Y,W), qui sont colorés et entourés, forment des amas (d) dont la taille, la forme et la composition peuvent être analysées. Par défaut, l'alanine est considérée comme hydrophile mais lorsqu'elle est entourée par au moins trois résidus hydrophobes, elle est alors considérée comme hydrophobe. Les amas peuvent être mis

en relation avec des structures secondaires données : des amas verticaux correspondent le plus souvent à des brins  $\beta$  alors que des amas horizontaux correspondent plutôt à des hélices  $\alpha$ . Les peptides obliques sont le plus souvent représentés par des amas de forme triangulaire, comme présenté à la figure 10 dans le cas du SIV. La glycine est représenté par  $\blacklozenge$  et la proline par  $\star$  (Figure 31).

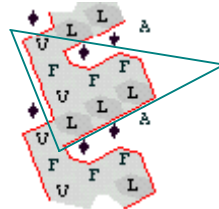


Figure 31 : Profil HCA du peptide oblique du SIV.

### III.2.1.2. La méthode $H\alpha$ de Jähnig

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

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

Cette moyenne donne plus d'importance aux acides aminés proches en terme de structure secondaire qu'en terme de séquence. L'analyse des graphiques obtenus par la méthode de Jähnig permet de détecter des fragments de protéines présentant un caractère amphipathique. Une hélice  $\alpha$  amphipathique prendra la forme d'une oscillation régulière et un peptide oblique, celle d'une oscillation ascendante ou descendante (Figure 32).

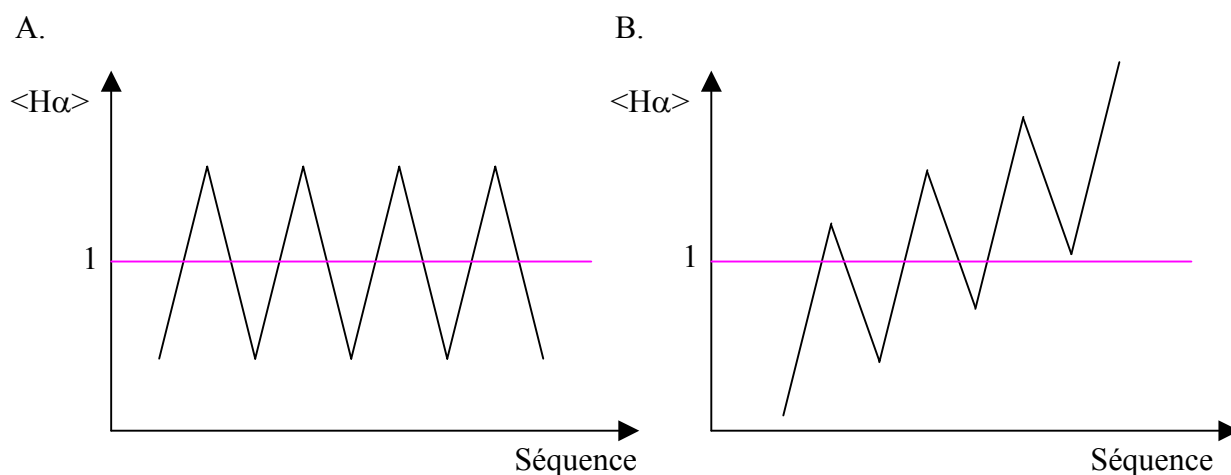


Figure 32 : Graphiques  $H\alpha$  de Jähnig sur lesquels figure une représentation schématique des oscillations correspondant à une hélice amphipathique (A) et à un peptide oblique (B).

### III.2.1.3. Les prédictions de structures secondaires

Les peptides obliques possèdent un gradient d'hydrophobicité uniquement lorsqu'ils sont en conformation hélice  $\alpha$ . Des méthodes de prédiction de structure secondaire devront donc être utilisées lorsque la structure 3D de la protéine ne sera pas connue. La méthode NPS@ (Network Protein Sequence Analysis) est utilisée. Cette méthode établit une prédiction consensus à partir des prédictions de structures secondaires de plusieurs méthodes incluant les méthodes DPM (Deleage G. *et al.*, 1987), HNN (Guermeur Y., 1997), GOR IV (Garnier J. *et al.*, 1996), PHD (Rost B. *et al.*, 1994), Predator (Frishman D. *et al.*, 1996), SIMPA96 (Levin J.M. *et al.*, 1996) et SOPM (Geourjon C. *et al.*, 1994). NPS@ est disponible à partir du site internet : [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_seccons.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_seccons.html).

### III.2.1.4. Détermination de l'hydrophobicité moyenne $\langle H \rangle$

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

### III.2.2. Approche de modélisation moléculaire

#### III.2.2.1. Construction et minimisation des peptides

La construction des structures 3D des peptides obliques potentiels en hélice  $\alpha$  est indispensable pour analyser leurs propriétés d'hydrophobicité et leur comportement aux interfaces. Ces peptides sont construits en hélice  $\alpha$  droite à l'aide du logiciel Hyperchem 5.0 en attribuant aux angles  $\varphi$  et  $\psi$  les valeurs théoriques correspondant à cette conformation. La structure obtenue est soumise à une minimisation d'énergie en utilisant la méthode du gradient conjugué Polak-Ribbiere (Polak E., 1971). Cette minimisation permet d'optimiser la position des chaînes latérales des acides aminés. Les peptides peuvent également être construits à partir du programme Zprot (développé au CBMN) de la même manière.

#### III.2.2.2. Méthode IMPALA

La méthode IMPALA (Integral Membrane Protein And Lipid Association) permet d'étudier l'interaction entre une molécule (dans notre cas, un peptide) et une membrane modélisée (Ducarme P. *et al.*, 1998). Au cours de la simulation, la position de la molécule au sein de la bicouche va être modifiée pour générer un profil énergétique de l'interaction peptide-membrane en fonction de la pénétration du centre de masse du peptide dans la bicouche et de l'angle formé entre l'axe du peptide et la normale de la bicouche. La molécule peut subir une translation selon l'axe Z et une rotation selon les axes X et Y. Pour simuler l'interaction entre un peptide et la bicouche lipidique, deux contraintes ont été mises au point. La première simule l'effet hydrophobe qui pousse les domaines hydrophobes de la molécule à entrer dans la membrane, c'est la contrainte hydrophobe ; et la deuxième est une mesure de la perturbation subie par les lipides lorsque le peptide pénètre dans la bicouche, c'est la contrainte de perturbation lipidique (Ducarme P. *et al.*, 1998). La somme de ces deux contraintes ( $E_{TOT}$ ) est calculée au cours de la simulation.

##### a) Représentation de la bicouche lipidique

La membrane (Figure 33) est modélisée par une fonction mathématique continue  $C(z)$  dont la formule est la suivante :

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



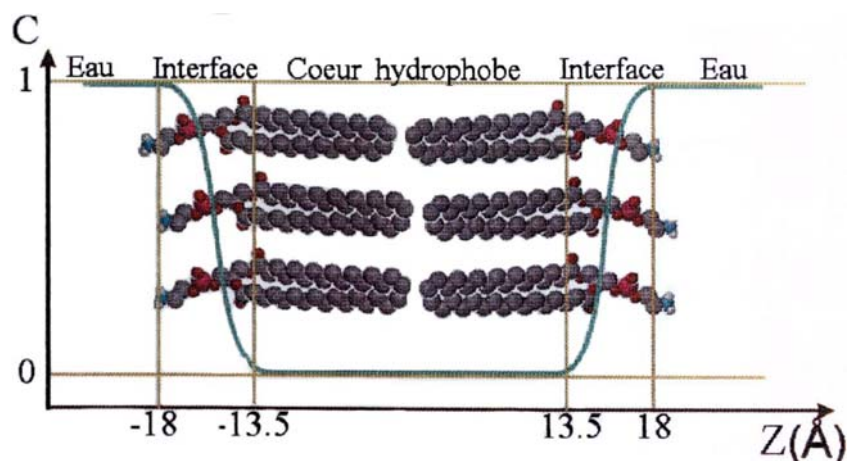


Figure 33 : Schéma de la bicouche modélisée utilisée dans IMPALA. La fonction  $C(z)$  est représentée en bleu, les traits jaunes horizontaux correspondent aux limites inférieure et supérieure de la fonction  $C(z)$  et les traits jaunes verticaux, aux trois zones différenciées dans le modèle ; c'est-à-dire l'eau, l'interface (où se situent les têtes polaires des phospholipides) et le cœur hydrophobe (correspondant aux chaînes acylées). Les molécules de phospholipides sont représentées à titre indicatif.

L'axe  $Z$  est perpendiculaire à la membrane et la fonction  $C_{(z)}$  est constante dans le plan  $XY$ .  $\alpha$  et  $Z_0$  sont des paramètres fixés à des valeurs telles que  $C_{(18\text{Å})} = 1$ ,  $C_{(13,5\text{Å})} = 0$  et que dans les domaines allant de  $-\infty$  à  $-18 \text{ Å}$ , de  $-13,5 \text{ Å}$  à  $13,5 \text{ Å}$  et de  $18 \text{ Å}$  à  $l'\infty$  la fonction  $C_{(z)}$  soit constante. Les domaines allant de  $-18 \text{ Å}$  à  $-13,5 \text{ Å}$  et de  $13,5 \text{ Å}$  à  $18 \text{ Å}$  correspondent aux têtes polaires des phospholipides. Dans ces deux domaines de  $4,5 \text{ Å}$  d'épaisseur, la fonction  $C_{(z)}$  varie de façon continue (Figure 33). Pour les représentations de la bicouche, les plans jaune, violet et rose correspondront respectivement au centre de la bicouche ( $z = 0\text{Å}$ ), à l'interface entre les têtes polaires et les chaînes acylées ( $z = 13,5\text{Å}$ ), et à l'interface lipide/eau ( $z = 18\text{Å}$ ).

#### b) Contrainte de perturbation lipidique

La contrainte de perturbation lipidique provient du fait que les interactions entre lipides sont plus favorables que les interactions lipides/peptides (Rees D.C. *et al.*, 1994). L'équation est la suivante :

$$E_{lip} = 0.018 \sum_{i=1}^N S_{(i)} (1 - C_{(z_i)})$$

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

### c) Contrainte hydrophobe

L'effet hydrophobe correspond au phénomène qui pousse des molécules ou des régions hydrophobes de molécules à s'associer, par exemple pour les chaînes acylées des phospholipides ou les domaines membranaires de protéines dans la membrane. Pour simuler cet effet, on utilise l'équation suivante :

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

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

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

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

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

L'hydrophobicité de la molécule est traduite au niveau atomique par les énergies de transfert atomiques  $E_{\text{tr}(i)}$  et limitée à sa surface par l'intermédiaire de la surface accessible atomique  $S_{(i)}$ . La variable  $C_{(z_i)}$  entraîne que l'énergie  $E_{\text{int}}$  diminue lorsque les atomes hydrophobes accessibles au solvant pénètrent dans la membrane et inversement pour les atomes hydrophiles.

#### III.2.2.3. Nappe des contraintes

Les graphiques montrant les valeurs des contraintes ( $E_{\text{env}}$ ) par rapport à l'angle (entre l'axe de l'hélice et la normale à la bicouche) et par rapport à la pénétration du centre de masse sont obtenus comme suit : pour chaque degré (angle) et pour chaque Å (pénétration), la valeur minimale de contrainte obtenue durant la simulation IMPALA est conservée. Tous les points sont ensuite joints pour générer la carte 3D.

#### III.2.2.4. Optimisation par dynamique angulaire

Dans le but d'analyser les variations structurelles des peptides insérés dans la membrane, une procédure de dynamique angulaire précédemment mise au point pour simuler le repliement des protéines a été utilisée (Lins L. *et al.*, 2006 ; Brasseur R., 1995). Dans les

simulations, l'énergie totale ( $E_{tot}$ ) correspond à la somme de l'énergie intramoléculaire ( $E_{intra}$ ) du peptide et de l'énergie due à l'environnement membranaire ( $E_{env}$ ).

$$E_{tot} = E_{intra} + E_{env} = \sum_k E(k)$$

L'énergie totale associée à chaque axe de torsion ( $E(k)$ ) est par conséquent représentée par la somme :

$$E(k) = \underbrace{E(k)_{tor}}_A + \underbrace{\sum_{i=1}^W \sum_{j=W+1}^N f(E_{vdw}^{ij} + E_{elec}^{ij} + E_{pho\_in}^{ij})}_B + \underbrace{\sum_{i=1}^W \sum_{j=W+1}^N f \frac{E_{env}}{N-1}}_C$$

avec  $f = 1/\text{nombre d'axes entre } i \text{ et } j$ .

(A) l'énergie de torsion de l'axe  $k$  ( $E(k)_{tor}$ ),

(B) l'énergie d'interaction intramoléculaire (correspondant à l'énergie de Van Der Waals  $E_{vdw}$ , l'énergie électrostatique  $E_{elec}$  et l'énergie hydrophobe  $E_{pho\_in}$ ) entre les atomes  $i$  et  $j$ , divisée par le nombre d'axes entre ces atomes,

(C) l'énergie dans la membrane pour les atomes  $i$  et  $j$  est divisée par le nombre d'atomes du système moins 1 ( $N-1$ ) et par le nombre d'axes entre les atomes  $i$  et  $j$ .

L'énergie  $E(k)$  permet le calcul d'une dynamique angulaire qui entraîne une accélération des axes de torsion. Durant la dynamique, la longueur des liaisons atomiques et la valeur des angles de valence sont gardées constantes, seuls les angles de torsion sont modifiés. Tous les calculs d'énergies, d'accélération angulaires et de vitesses de rotations sont décrits en détails par Lins *et al.* (Lins L. *et al.*, 2006).

### III.2.2.5. Procédure stochastique de prédiction de structure

Sur base d'un algorithme stochastique, la conformation d'un peptide dans différents environnements peut être prédite. Dans le cas présent, l'environnement est une bicouche lipidique simulée par IMPALA. La méthode stochastique recherche les minima énergétiques d'un peptide par une procédure stochastique itérative générant des structures de ce peptide *in silico*. Cette méthode est décrite en détails dans la publication de Thomas *et al.* (Thomas A. *et al.*, 2006). A partir de la séquence, Thomas *et al.* génèrent  $100 \times 10^4$  structures en utilisant des

couples  $\phi/\psi$  sélectionnés aléatoirement parmi 64 couples dérivés de l'alphabet structural des structures protéiques proposé par Etchebest *et al.* (Etchebest C. *et al.*, 2005). A chaque itération de  $10^4$  structures, l'énergie de ces structures est calculée et les valeurs sont conservées. Les énergies calculées pour chaque structure générée incluent les énergies intramoléculaires (Van Der Waals, électrostatique, ...) et les contraintes IMPALA. Les 100 conformations de plus haute énergie et de plus basse énergie sont alors comparées. Lorsqu'un couple  $\phi/\psi$  conduit uniquement à des structures énergétiquement défavorables, la probabilité de rencontrer ce couple dans les itérations suivantes diminue et inversement lorsqu'un couple  $\phi/\psi$  conduit uniquement à des structures énergétiquement favorables. Les calculs sont stoppés après 100 itérations. Par l'intermédiaire de cette procédure, les structures de plus basse énergie sont retenues, les 99 meilleurs modèles sont sélectionnés et l'énergie est minimisée en utilisant une méthode simplex (Nelder J.A. *et al.*, 1997). Cet algorithme stochastique est utilisé par le serveur de prédiction de structure peptidique PepLook qui a été développé par Biosiris-Peptides (Gembloux, Belgique).

### III.2.3. Méthodes expérimentales

#### III.2.3.1. Préparation des liposomes

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

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

##### a) Les liposomes multilamellaires (MLV)

Pour réaliser des MLV, un film lipidique doit être formé. Les phospholipides sont dissous dans une solution de chloroforme /méthanol 2/1 (vol/vol). Le ballon est placé au rotavapor (rotavapor ; Van Der Heyden Büchi, Suisse) 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 incubé une heure dans un bain-marie à 37°C avec agitation au vortex toutes les dix minutes. Le tampon utilisé dépend des mesures à effectuer.

##### b) Les liposomes unilamellaires de grande taille (LUV)

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

### c) Les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV)

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

#### III.2.3.2. Détermination de la concentration en phospholipides

Le dosage des phospholipides est effectué par la méthode de Bartlett (Bartlett G.R., 1959). L'échantillon est séché et 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), 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 étalon.

#### III.2.3.3. 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. 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 34).

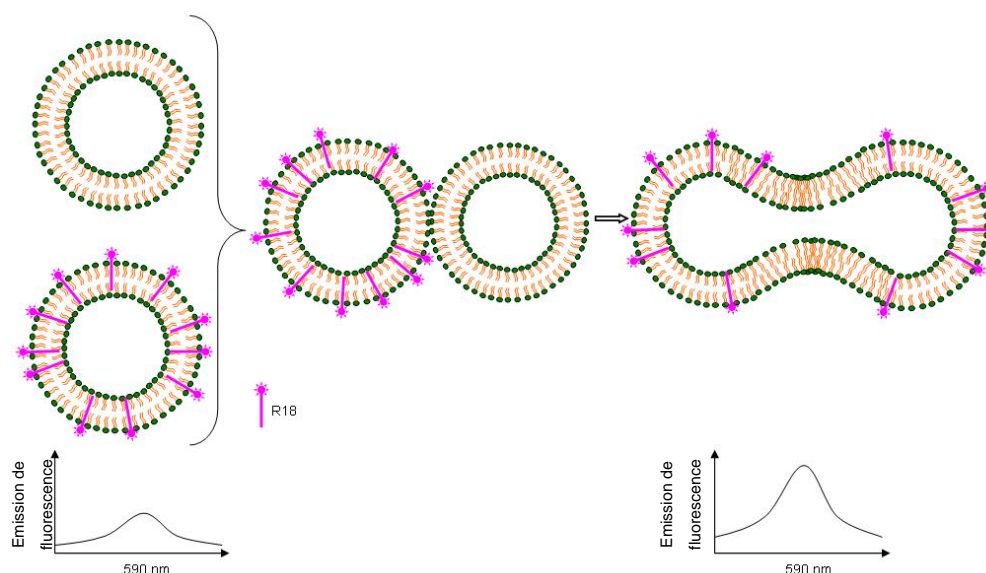


Figure 34 : Schéma explicatif de la fusion de phase lipidique.

25 $\mu$ l de peptide (concentration allant de 60 $\mu$ M à 1200 $\mu$ M) et 300 $\mu$ l de liposomes marqués (50 $\mu$ M) sont ajoutés à 1200 $\mu$ 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. La fluorescence relative du marqueur R18 est mesurée durant 15 minutes. La dernière mesure est utilisée pour les représentations graphiques et la fluorescence observée en l'absence de peptide est soustraite. Pour considérer qu'il y a fusion, cette différence doit être supérieure à 100. Pour ces mesures, les films lipidiques sont réhydratés avec du tampon 1.

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.2.3.4. Mesures de perméabilité lipidique

La capacité d'un peptide à perméabiliser la membrane lipidique est mesurée par l'atténuation de la fluorescence 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 35).

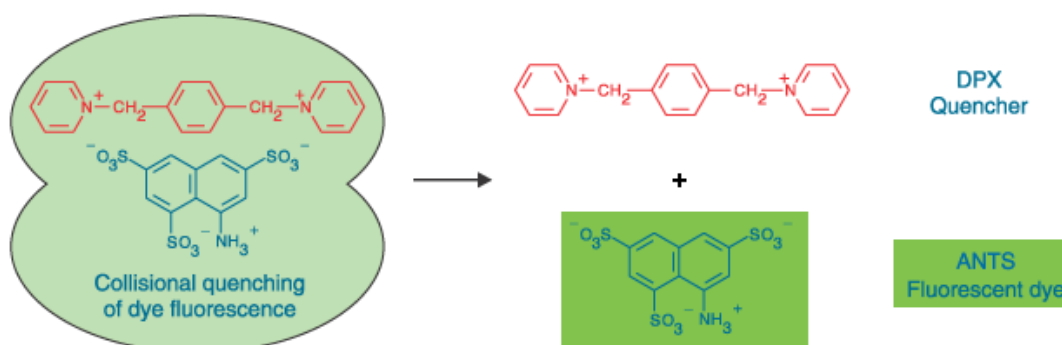


Figure 35 : Schéma explicatif de la perméabilité lipidique.

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.2.3.1.), les films lipidiques étant réhydratés avec 1ml de tampon Tris-HCl pH 7,4 (tampon 2), 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. Les références 0% et 100% sont obtenues en ajoutant respectivement 25µl de tampon et 25µl de Triton X-100. Le Triton X-100 est un détergent qui perméabilise totalement les membranes. Ensuite, les peptides à des concentrations allant de 60µM à 1200µM et les solvants utilisés sont testés. La fluorescence de l'HPTS est mesurée durant 15 minutes. La dernière mesure est utilisée pour les représentations graphiques. La fluorescence observée en l'absence de peptide est soustraite.

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 25µL de tampon

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

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



### III.2.3.5. Mesures de cytotoxicité

#### a) Culture cellulaire

Les cellules humaines de neuroblastome SH-SY5Y, gracieusement fournies par le professeur Nigel M. Hooper, ont été cultivées dans un milieu “Dulbecco’s minimum Eagle medium (DMEM)” (Life Technologies) contenant de la L-alanyl-L-glutamine (862mg/L) et du pyruvate de sodium (110mg/L) auquel a été ajouté 10% de sérum fœtal de bœuf (FBS) (Life Technologies) et 1% de pénicilline/streptomycine (Life Technologies) ; les cellules ont été maintenues à 37°C dans un incubateur humidifié sous 95% d’air et 5% de CO<sub>2</sub>. Pour les expériences, les cellules ont été maintenues dans un médium DMEM sans FBS contenant le supplément de croissance pour neuroblastome N<sub>2</sub> (Life technologies) et 1% de pénicilline/streptomycine.

#### b) Test de viabilité cellulaire

Les peptides lyophilisés ont été dissous dans du tampon PBS (phosphate-buffered saline) stérile à la concentration de 1mM (solution stock) et les aliquots fraîchement préparés ont été stockés à -20°C jusqu’à utilisation. Pour les expériences de toxicité cellulaire, les peptides ont été dissous dans le milieu de culture pour atteindre la concentration désirée (25µM à 400µM), juste avant d’être ajoutés aux cellules.

Les cellules humaines SH-SY5Y ont étéensemencées dans des plaques de culture 96 puits (GREINER) puis incubées à 37°C sous atmosphère humide contenant 95% d’air et 5% de CO<sub>2</sub> afin de permettre l’adhérence des cellules à la surface du puits. Seize heures après, le milieu a été remplacé par un milieu sans sérum contenant 1% de N<sub>2</sub>-supplément et les cellules ont été traitées pendant 24h avec les concentrations indiquées de peptide.

La viabilité cellulaire a été mesurée en utilisant le test d’activité métabolique “cellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” (Promega). Le principe du test est basé sur la réduction du tétrazolium du MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium) en présence d’un coupleur d’électrons (phénazine méthosulfate; PMS) en formazan. Au niveau cellulaire, cette réduction est principalement réalisée par l’action de la déshydrogénase du succinate cytoplasmique et mitochondriale.

A la fin du traitement expérimental, 20 $\mu$ l d'un mélange MTS/PMS ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été incubée pendant 2h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>/95% d'air et à l'abri de la lumière. La quantité de formazan produit a été estimée par mesure de l'absorbance à 490nm (EL 312e microplate Bio-Tek Instruments). Tous les tests MTS ont été reproduits trois fois en triplicata. Les graphiques reprennent les déviations standard obtenues à partir de ces neuf observations.

#### III.2.3.6. Mesures de dichroïsme circulaire

La mesure de la différence entre les coefficients d'extinction de deux lumières polarisées circulairement à droite et à gauche est appelée dichroïsme circulaire. Toute molécule optiquement active possède un dichroïsme circulaire. Pour qu'une molécule soit optiquement active, elle ne doit posséder ni centre, ni plan, ni axe de symétrie. Chaque acide aminé naturel à l'exception de la glycine, possède un carbone  $\alpha$  asymétrique. La présence de ces C $\alpha$  est à l'origine de l'activité optique et donc du spectre de dichroïsme circulaire que possède une séquence peptidique. Quelles que soient leurs structures, tous les peptides possèdent un spectre de dichroïsme circulaire. Cependant, la structure du peptide (angles de torsion différents selon la structure secondaire) exerce une influence sur la position et l'intensité des pics constituant le spectre CD. Celui-ci est donc caractéristique des structures secondaires contenues dans un peptide ou dans une protéine (Greenfield N. *et al.*, 1969 ; Chen Y.H. *et al.*, 1974 ; Yang J.T. *et al.*, 1986).

Une hélice  $\alpha$  est caractérisée par trois pics à 193, 207 et 222 nm. Pour une hélice droite, les deux pics à 207 et 222 nm sont des minima et celui à 193 nm est un maximum, tandis que pour une hélice gauche, les extrema sont inversés. Les feuillets  $\beta$  sont caractérisés par deux bandes dont une est centrée à 215-218 nm et une à 195 nm, respectivement négative et positive. Les coudes  $\beta$  donnent lieu à une grande diversité de spectres rendant difficile leur interprétation. Néanmoins, le spectre d'une molécule structurée en coude  $\beta$  montre généralement deux bandes, une négative autour de 205 nm et une positive centrée autour de 220 nm. La conformation random coil est caractérisée par un minimum vers 198 nm et une bande d'amplitude variable, positive ou négative, vers 220 nm.

Les spectres CD ont été enregistrés sur un spectromètre CD Jasco J-815 avec des cuvettes de quartz de 10 mm de chemin optique. 10 scans ont été enregistrés et automatiquement moyennés pour des longueurs d'ondes comprises entre 190 et 250 nm. La structure secondaire des peptides a été déterminée en utilisant le programme CDpro, qui inclut

- Matériel et méthodes -

les méthodes CDSSTR, SELCON3 et CONTINLL (Sreerama N. *et al.*, 2000). Ces méthodes effectuent des décompositions du spectre suivant les bandes caractéristiques des différentes structures secondaires à partir d'un jeu de protéines globulaires de référence. Les pourcentages de structures secondaires correspondent à la moyenne des pourcentages fournis par ces trois méthodes. Les solutions stock de peptide utilisées pour ces mesures ont été diluées dans du tampon Tris 1mM pH 7,4 (tampon 3) ou dans du TFE pour atteindre la concentration de 10 $\mu$ M. En ce qui concerne les mesures effectuées en présence de liposomes, les concentrations peptidique et lipidique sont respectivement de 5 $\mu$ M et 25 $\mu$ M, ce qui donne un rapport peptide/lipide de 0,2.



# RESULTATS



## IV. Résultats

### IV.1 *Mise au point d'une méthode de détection automatique des peptides obliques*

La procédure utilisée jusqu'à présent pour la détection des peptides obliques au sein de séquences protéiques comprend deux étapes. La première consiste en l'analyse de séquences par différentes méthodes basées sur l'hydrophobicité, telles que HCA et l'algorithme de Jähnig, et vise à isoler des domaines dont les caractéristiques correspondent à celles des peptides obliques. Ensuite, un ou plusieurs peptides sont sélectionnés sur base de leur hydrophobicité moyenne et de leur composition en acides aminés. Ils sont construits en trois dimensions sous forme d'hélice  $\alpha$  et analysés par IMPALA de façon à prédire leur insertion membranaire. Cette méthode ne permet pas de tester un grand nombre de peptides, puisque ceux-ci doivent être construits et testés au cas par cas, et comporte le risque d'omettre certaines séquences. De plus, les méthodes HCA et de Jähnig sont des méthodes efficaces mais qui reposent grandement sur l'expérience de l'utilisateur. La mise au point d'une méthode de détection automatique présente donc plusieurs avantages. Cette méthode a pour objectif de se passer de la première étape de la méthode classique et de se baser uniquement sur les simulations IMPALA et différentes propriétés des peptides, telles que l'hydrophobicité, pour les considérer comme obliques.

Pour ce faire, à partir d'une séquence donnée, tous les peptides de 11 à 19 résidus sont construits en hélice  $\alpha$  et testés dans IMPALA (Figure 36). La conformation  $\alpha$  a été choisie car, par définition, les peptides obliques ne possèdent un gradient d'hydrophobicité que dans cette conformation. En ce qui concerne la taille, les peptides obliques observés jusqu'à présent comprennent de 11 à 19 acides aminés. Une taille de 11 résidus correspond à 3 tours d'hélice, c'est-à-dire la taille minimum pour avoir une hélice stable, et une longueur de 19 résidus correspond approximativement à l'épaisseur d'une membrane. Les peptides seront sélectionnés sur base de critères tels que l'angle d'insertion, la pénétration dans la membrane, l'hydrophobicité, ... L'hydrophobicité moyenne de tous les peptides est calculée par la méthode automatique sur base de l'échelle consensus d'hydrophobicité d'Eisenberg (Eisenberg D. *et al.*, 1982). Cette méthode est exhaustive et fournit des résultats qui seront interprétables au niveau de la protéine entière. Le code source du module de sélection est disponible en annexe 3.

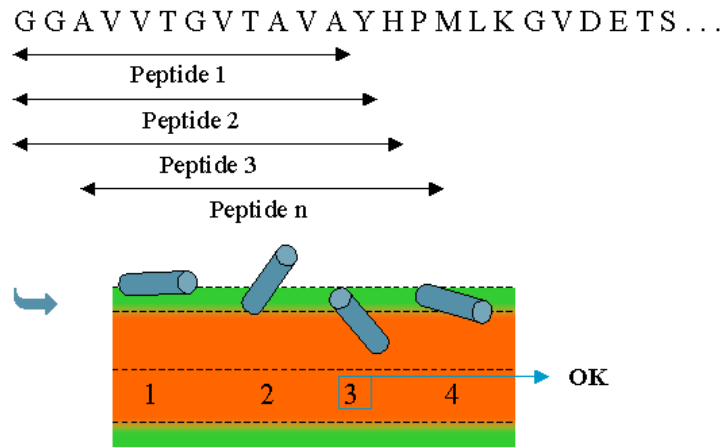


Figure 36 : Schéma explicatif de la méthode de détection automatique des peptides obliques. Les doubles flèches représentent les peptides de 11 à 19 résidus, les cylindres bleus représentent les peptides construits en hélice  $\alpha$  et la membrane modélisée d'IMPALA est représentée par les zones vertes (parties hydrophiles correspondant aux têtes polaires des phospholipides) et orange (partie hydrophobe correspondant aux chaînes acylées).

La première étape dans la mise au point de cette méthode est de déterminer si elle permet de retrouver des peptides obliques connus. Elle a donc été appliquée à dix protéines dans lesquelles un peptide oblique a été préalablement identifié (Brasseur R. *et al.*, 2000 ; Lins L. *et al.*, 2007) (Tableau IV). Les paramètres de sélection utilisés correspondent aux propriétés généralement rencontrées chez les peptides obliques, c'est-à-dire un angle entre l'axe du peptide et la normale à la membrane compris entre  $30^\circ$  et  $60^\circ$ , une pénétration du centre de masse dans la bicouche IMPALA comprise entre 8 et  $15\text{\AA}$ , une longueur comprise entre 11 et 19 résidus, une hydrophobicité moyenne supérieure à 0,2 et une proline maximum par peptide comme facteur supplémentaire, en raison des contraintes structurales qu'imposent cet acide aminé (Lins L. *et al.*, 2001).

Les premiers résultats obtenus avec cette méthode montrent qu'il convient mieux de parler de domaines obliques, lesquels contiennent plusieurs peptides obliques se chevauchant (Tableau IV). Cette constatation est en accord avec ce qui est observé par la méthode classique. En effet, celle-ci fournit généralement plusieurs peptides possédant les propriétés obliques pour une même zone de la séquence (Pillot T. *et al.*, 1996 et 1997). La méthode automatique permet donc de définir plus précisément les contours de ces zones. Bien qu'ils ne correspondent pas toujours à l'acide aminé près, les peptides obliques connus sont détectés par la méthode automatique, ainsi que des domaines supplémentaires (Tableau IV).



Tableau IV : Liste des protéines testées par la méthode de détection automatique

Nom de la protéine	Taille de la séquence	Domaines obliques	Pourcentage de peptides sélectionnés	Peptides obliques connus
<b>Le peptide Aβ</b>	42 a.a.	16-26 (1); 28-40 (3)	4 / 252 ⇨ 1.6 %	11-22 29-40
<b>La protéine PrP</b>	231 a.a.	1-25 (58); 105-140 (95)	153 / 2151 ⇨ 7.1 %	118-135
<b>L'apolipoprotéine AII</b>	77 a.a.	49-60 (1)	1 / 756 ⇨ 0.1 %	53-70
<b>La protéine gp32 du SIV</b>	208 a.a.	1-32 (64); 78-97 (7); 152-196 (83)	154 / 1746 ⇨ 8.8 %	1-12
<b>La protéine gp2 d'Ebola</b>	175 a.a.	22-45 (6); 95-110 (4); 143-174 (32)	42 / 1449 ⇨ 2.9 %	23-39
<b>La protéine CETP</b>	476 a.a.	5-27 (16); 39-67 (22); 89-109 (13); 143-157 (4); 166-193 (44); 211-232 (21); 250-267 (3); 268-278 (1); 288-301 (4); 337-351 (3); 379-396 (8); 405-428 (54); 440-475 (7)	200 / 4158 ⇨ 4.8 %	461-476
<b>La Colicine</b>	552 a.a.	18-28 (1); 434-449 (3); 472-514 (97)	101 / 4572 ⇨ 2.2 %	470-482 492-504
<b>La protéine gp160 du HIV</b>	829 a.a.	1-20 (16); 31-44 (1); 51-63 (3); 88-106 (12); 143-162 (16); 188-200 (4); 221-237 (3); 286-300 (4); 347-358 (1); 459-470 (2); 482-513 (59); 532-547 (9); 562-589 (70); 640-685 (96); 717-730 (2); 745-759 (9); 765-777 (2); 778-805 (13)	322 / 7335 ⇨ 4.4 %	485-496
<b>La chaîne HA2 de l'hémagglutinine de l'influenza</b>	221 a.a.	2-13 (3); 174-211 (40)	43 / 1863 ⇨ 2.3 %	1-20
<b>L'invertase de levure</b>	532 a.a.	1-25 (23); 64-86 (31); 99-111 (3); 127-138 (2); 208-220 (2); 236-248 (2); 294-317 (19); 344-356 (3); 389-404 (3); 407-420 (1); 424-434 (1); 501-514 (2)	92 / 4662 ⇨ 2.0 %	1-19

La colonne 3 indique la localisation des domaines obliques, avec le nombre de peptides sélectionnés par domaine entre parenthèses et la colonne 4, le rapport entre le nombre de peptides sélectionnés par la méthode et le nombre de peptides testés (exprimé en %).

Afin de valider la méthode, la présence de faux positifs a été estimée en comparant les résultats obtenus par cette méthode à ceux de l'équipe du Dr. José Villalaín (Moreno M.R. *et al.*, 2004 ; Guillén J. *et al.*, 2005). Ces derniers ont réalisé une étude systématique sur les séquences des protéines de fusion du HIV et du SRAS visant à identifier les peptides induisant de la perméabilité membranaire. Cette étude leur a permis d'identifier les régions actives des glycoprotéines de fusion du HIV (gp41) et du SRAS (gpE2) vis-à-vis de la membrane. Pour cela, ils ont créé des bibliothèques de peptides de 15 à 18 résidus qui se chevauchent et représentent l'entièreté de la séquence. L'effet de ces peptides sur les membranes a été testé expérimentalement.

La méthode de détection automatique permet de générer le type de graphique présenté à la figure 37. Les courbes correspondent à la propension de chacun des acides aminés de la séquence à se retrouver dans un peptide oblique, c'est-à-dire au nombre de fois où un résidu se retrouve dans un peptide oblique par rapport au nombre total de peptides testés contenant cet acide aminé. Les peptides induisant expérimentalement au moins 10% de perméabilité ont été considérés comme actifs (traits roses), c'est-à-dire 8 et 9 peptides pour les glycoprotéines de fusion du HIV (gp41) et du SRAS (gpE2) respectivement.

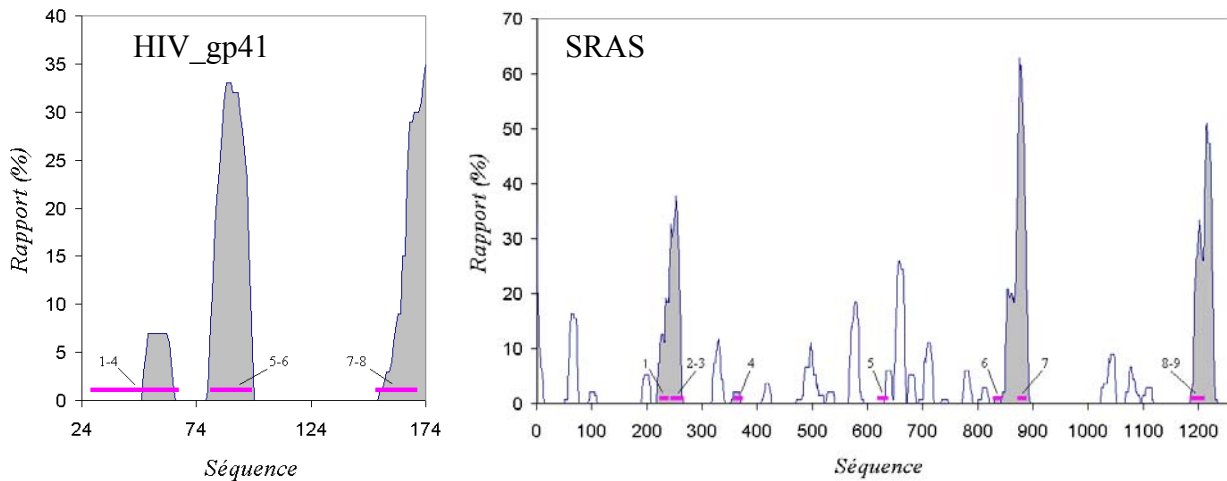


Figure 37 : Résultats de la méthode de détection automatique pour les glycoprotéines de fusion du HIV (gp41) et du SRAS (gpE2). Les graphiques présentent, pour chaque résidu de la séquence, le rapport (en %) avec lequel il se retrouve dans les peptides déterminés comme obliques. Les lignes roses correspondent aux peptides déterminés expérimentalement par Moreno et Guillén comme ayant un effet sur la membrane.

La méthode automatique identifie correctement la plupart des peptides qui déstabilisent la membrane mais détecte d'autres zones non identifiées expérimentalement comme déstabilisantes (Figure 37). En ce qui concerne la glycoprotéine de fusion du SRAS, cinq des domaines obliques qui sont détectés (pics grisés) recouvrent huit des neuf peptides induisant de la perméabilité, ce qui conduit à une sensibilité de 83% (60% pour gp41) et à une spécificité de 20% (100% pour gp41). Ces peptides sont considérés comme faisant partie d'un domaine oblique si au moins 10 résidus font partie de ce domaine. La sensibilité correspond au nombre de domaines positifs comparé au nombre de domaines induisant de la perméabilité, et la spécificité au nombre de domaines positifs sur le nombre de domaines prédits. Ceci montre que la méthode de détection retrouve efficacement des domaines d'activité membranaire mais qu'elle détecte également d'autres zones non identifiées par Moreno *et al.* et Guillén *et al.* Ces résultats semblent indiquer que la méthode détecte des faux positifs. L'influence de la taille des peptides testés (11 à 19), sur le nombre et la taille des domaines obliques détectés, a été étudiée pour ces deux protéines. Cette étude montre que l'on retrouve généralement moins de domaines obliques lorsque la taille des peptides est grande ; par exemple pour le SRAS, ne tester que les peptides de 11 résidus conduit à trouver 25 domaines obliques tandis que pour une taille de 19 résidus, il y a 10 domaines. Elle montre aussi que les domaines sont généralement plus petits lorsqu'une seule taille est considérée. En ce qui

concerne la correspondance avec les résultats obtenus par l'équipe de Villalaín, nos résultats montrent qu'elle est moins bonne lorsque une seule taille est prise en compte. Pour le HIV, lorsque toutes les tailles de peptides sont testées, cinq peptides induisant de la perméabilité sont retrouvés tandis que lorsque l'on ne teste que les peptides de 11 résidus, trois des peptides induisant de la perméabilité sont détectés. Il n'est donc pas possible pour le moment de simplifier l'analyse en étudiant qu'une seule taille.

Au cours d'une étude précédente, notre laboratoire a montré que des peptides obliques potentiels étaient retrouvés dans 60% des protéines et que ce pourcentage montait à 92% pour les protéines interagissant avec la membrane (Rahman M. *et al.* 1997). Ces résultats ont été obtenus à partir d'une méthode reposant sur le calcul de l'hydrophobicité et l'orientation des peptides à l'interface. Rahman *et al.* ont appliqué cette méthode sur des banques non redondantes de 863 et 1419 protéines. Afin de déterminer si les peptides obliques sont couramment trouvés au sein des protéines, 30 protéines de la banque de Liu et Chou ont été étudiées par la méthode automatique. Cette dernière est une banque non redondante de 593 protéines obtenues à partir de la PDB (Protein Data Bank) (Liu W. & Chou K.C., 1999). Cette étude a permis de déterminer que la plupart des protéines (93%) possèdent des domaines obliques. Plusieurs de ces zones obliques devraient donc être testées expérimentalement afin de s'assurer de la validité de la méthode.

Les résultats obtenus avec la méthode automatique suggèrent que la base de données relative aux peptides obliques ne comporte pas suffisamment d'exemples pour obtenir une corrélation nette entre les résultats expérimentaux et théoriques. Si la méthode est capable de détecter les domaines obliques établis expérimentalement avec un taux de réussite proche de 100%, des domaines supplémentaires détectés comme potentiellement obliques sont également prédits par la méthode. Etant donné qu'il était impossible de tous les tester expérimentalement lors de ce travail, il n'est pas possible de décider s'il s'agit de faux positifs ou des peptides obliques non encore mis en évidence expérimentalement. Une analyse totalement automatique n'est donc pas réalisable dans l'état actuel des choses. Cependant, la méthode conserve toute sa valeur au point de vue qualitatif dans la détection préliminaire des peptides obliques et a été appliquée aux protéines amyloïdogéniques étudiées au cours de ce travail. Sur les protéines du tableau IV, 3,8% des peptides testés sont sélectionnés par cette méthode et l'ensemble des domaines obliques recouvre 35,8% des séquences, ce qui réduit largement le domaine d'investigation lors de la recherche de peptides obliques avec la méthode classique.

## **IV.2. Recherche de peptides obliques**

### **IV.2.1. Protéines amyloïdogéniques et analyse de séquence**

Bien que les protéines amyloïdogéniques les plus connues soient le peptide A $\beta$  et la protéine PrP, il en existe beaucoup d'autres dont la plupart sont citées dans l'introduction (Tableaux I et II). La première étape de l'étude a consisté à rechercher des informations sur les protéines capables de former des fibrilles amyloïdes. La recherche bibliographique a permis de retrouver 86 protéines ou fragments de protéines capables de former des fibrilles amyloïdes ou "amyloid-like" *in vitro* et *in vivo* (Tableaux V, VI et VII). Une fois identifiée, la séquence de ces protéines est retrouvée par l'intermédiaire de SRS ("sequence retrieval system") (<http://us.expasy.org/srs5/>). Ce dernier permet d'interroger différentes banques de données sur internet telles que SWISSPROT ou trembl à partir de mots clés. Les protéines ont été réparties en trois tableaux.

Les protéines du tableau V font partie de la liste officielle des protéines reconnues comme amyloïdogéniques par le comité de nomenclature de la société internationale de l'amyloïdose (voir I.1.1). Ces protéines correspondent à des protéines humaines, hormis la caséine  $\alpha$ -S2C, qui est une protéine bovine et l'insuline, qui est une protéine porcine mais qui peut former des dépôts amyloïdes chez des patients souffrant de diabète de type 1 recevant des injections d'insuline. Les chaînes A et B de cette protéine ont été étudiées. Seules les protéines humaines ont été étudiées au cours de cette thèse. Dans le cas des chaînes légères d'immunoglobulines, plusieurs séquences amyloïdogéniques ont été mises en évidence. La protéine étudiée dans le cadre de cette étude correspond à la séquence nommée SMA. En ce qui concerne les fragments amyloïdogéniques issus de la protéine membranaire de type 2B, ceux-ci sont générés suite à une protéolyse et à des mutations au niveau du codon stop. Deux fragments peuvent être générés, ABri, qui est responsable de la démence héréditaire britannique, et ADan, responsable de la démence héréditaire danoise.

Tableau V : Liste des protéines amyloïdogéniques “officielles”

Précurseur de protéines ou peptides amyloïdes	Code SWISSPROT	Séquence	Zone amyloïdogénique	Zone testée
Les chaînes légères d'immunoglobuline	P01625	114 a.a.	1-114 (SMA)	1-114
Les chaînes lourdes d'immunoglobine	(Eluitz M. <i>et al.</i> , 1990)	228 a.a.	1-228	1-228
La $\beta$ -2-microglobuline	P01884	99 a.a.	1-99	1-99
La transthyretine	P02766	127 a.a.	1-127	1-127
La protéine amyloïde A sérique	P02735	104 a.a.	1-76	1-104
L'apolipoprotéine AI	P02647	243 a.a.	1-94	1-243
L'apolipoprotéine AII	P02652	77 a.a.	1-98 (ext)	1-98 (ext)
L'apolipoprotéine AIV	P06727	376 a.a.	1-376	1-376
La gelsoline	P06396	755 a.a.	173-243	173-243
Le lysozyme	P00695	130 a.a.	1-130	1-130
La chaîne A $\alpha$ du fibrinogène	P02671	644 a.a.	499-558	499-558
La cystatine C	P01034	120 a.a.	11-120	1-120
La protéine membranaire de type 2B	Q9Y287	266 a.a.	ABRI (244-277)	244-277
			ADAN (244-277)	244-277
Le peptide A $\beta$	P05067	42 a.a.	1-42	1-42
La protéine PrP (“Prion protein”)	P04156	232 a.a.	1-209	1-209
La calcitonine	P01258	32 a.a.	1-32	1-32
L'amyline (“Islet Amyloid Polypeptide”)	P10997	37 a.a.	1-37	1-37
Le facteur atrial natriurétique	P01160	28 a.a.	1-28	1-28
La prolactine	P01236	199 a.a.	1-34	1-34
L'insuline	P01317	21 a.a. (A)	1-21	1-21
		30 a.a. (B)	1-30	1-30
La lactadherine	Q08431	364 a.a.	268-317	268-317
La kératoépthéline	Q15582	668 a.a.	1-668	1-668
La lactoferrine	P02788	692 a.a.	1-692	1-692
La protéine tbn	ND	ND	ND	Non étudiée
La caséine $\alpha$ -S2C	ND	ND	ND	Non étudiée

La colonne 4 indique les zones de la protéine capable de former des fibrilles amyloïdes sur base de la recherche bibliographique et la colonne 5, les zones testées avec la méthode de détection automatique. (ND = Non Déterminé).

Dans le tableau VI figurent les protéines formant des fibrilles présentant aux moins deux des trois caractéristiques amyloïdes (voir I.1.2). Ces protéines ne sont pas reconnues par le comité de nomenclature et devraient donc être nommées “amyloid-like”. Cependant, ces protéines sont généralement appelées amyloïdes dans la littérature et c'est cette dernière dénomination qui sera retenue au cours de cette étude. Les protéines des tableaux VI et VII se retrouvent dans une grande variété d'organismes allant des plantes et des champignons aux mammifères en passant par les arthropodes et les poissons. En plus des protéines amyloïdogéniques associées ou non à des maladies, le tableau VI contient également des protéines possédant une fonction biologique particulière lorsqu'elles se trouvent dans un état fibrillaire. Par exemple, la forme fibrillaire de la glycoprotéine Pmel17 est impliquée dans la séquestration de la mélanine dans les mélanosomes (Berson J.F. *et al.*, 2003).

Tableau VI : Liste des protéines amyloïdogéniques trouvées dans la littérature

Précurseur de protéines ou peptides amyloïdes	Organisme	Code SWISSPROT	Séquence	Zone amyloïdogénique	Zone testée
L'α-lactalbumine	<i>Bos taurus</i>	P00711	123 a.a.	1-123	1-123
L'α-synucléine	<i>Homo sapiens</i>	P37840	140 a.a.	1-140	1-140
L'acylphosphatase	<i>Homo sapiens</i>	P14621	98 a.a.	1-98	1-98
L'apolipoprotéine CII	<i>Homo sapiens</i>	P02655	79 a.a.	1-79	1-79
L'apolipoprotéine E	<i>Homo sapiens</i>	P02649	299 a.a.	216-299	216-299
La barnase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	P00648	123 a.a.	1-24	1-24
La protéine C du surfactant	<i>Homo sapiens</i>	P11686	35 a.a.	1-35	1-35
La carboxypeptidase A2	<i>Homo sapiens</i>	P48052	401 a.a.	1-81	1-81
Les protéines du chorion	<i>Bombyx mori</i>	P13531	98 a.a.	35-95	35-95
Le facteur de croissance des fibroblastes	<i>Notophthalmus viridescens</i>	Q7SIF8	132 a.a.	1-132	1-132
La protéine CspB	<i>Bacillus subtilis</i>	P32081	67 a.a.	1-22	1-67
Le cytochrome c	<i>Hydrogenobacter Thermophilus</i>	P99999	104 a.a.	1-104	1-104
L'endostatine	<i>Homo sapiens</i>	P39060	182 a.a.	1-182	1-182
La protéine FBP28	<i>Mus musculus</i>	Q8CGF7	1100 a.a.	430-466	430-466
La protéine G	<i>Streptococcus sp.</i>	P06654	384 a.a.	228-282	228-282
La protéine HET-s	<i>Podospira anserina</i>	Q03689	289 a.a.	218-289	218-289
La protéine HMG1 (Amphotérine)	<i>Homo sapiens</i>	P09429	214 a.a.	12-27	12-27
Les hydrophobines	<i>Schizophyllum commune</i>	P16933	112 a.a.	1-112	1-112
La protéine HypF	<i>Escherichia coli</i>	P30131	750 a.a.	2-91	2-91
La méthionine aminopeptidase	<i>Pyrococcus furiosus</i>	P56218	295 a.a.	1-295	1-295
La monelline	<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i>	P02882	50 a.a. (B)	1-50	1-50
La myoglobine	<i>Homo sapiens</i>	P02144	153 a.a.	1-153	1-153
La protéine p53	<i>Homo sapiens</i>	P04637	393 a.a.	1-393	1-393
La phosphatidylinositol-3-kinase	<i>Bos taurus</i>	P23727	724 a.a.	3-79	1-100
La phosphoglycerate kinase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P00560	415 a.a.	1-415	1-415
La protéine Pmel17	<i>Homo sapiens</i>	P40967	637 a.a.	1-445	1-445
La stefin B	<i>Homo sapiens</i>	P04080	98 a.a.	1-98	1-98
La protéine Sup35p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P05453	685 a.a.	1-123	1-685
La protéine Tau	<i>Homo sapiens</i>	P10636	441 a.a.	1-441	1-441
La protéine Ure2p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P23202	354 a.a.	1-90	1-354
L'ataxine-1	<i>Homo sapiens</i>	P54253	816 a.a.	polyglutamine	Non étudiée
L'huntingtine	<i>Homo sapiens</i>	P42858	3144 a.a.	polyglutamine	Non étudiée
Un peptides <i>ata de novo</i>	ND	ND	ND	ND	Non étudiée
L'anticorps de souris F11	<i>Mus musculus</i>	ND	ND	ND	Non étudiée
Les betabellines (15D et 16D)	ND	ND	ND	ND	Non étudiée
La protéine fibre des adénovirus	Adénovirus humain de type 2	ND	ND	ND	Non étudiée
Le facteur GAGA	<i>Drosophila</i>	ND	ND	ND	Non étudiée
Le lysozyme du blanc d'oeuf de poule	<i>Gallus gallus</i>	ND	ND	ND	Non étudiée
La protéine MIF	<i>Homo sapiens</i>	ND	ND	ND	Non étudiée
La protéine OspA	<i>Borrelia burgdorferi</i>	ND	ND	ND	Non étudiée
Des homopolypeptides solubles : poly-L, -E et -T.	ND	ND	ND	ND	Non étudiée

La colonne 5 indique les zones de la protéines capables de former des fibrilles amyloïdes ; et la colonne 6, les zones testées avec la méthode de détection. (ND = Non Déterminé).

Il existe également des protéines nommées amyloïdes dans la littérature mais dont les propriétés amyloïdes n'ont pas entièrement été démontrées. Ces protéines figurent dans le tableau VII et sont souvent désignées comme amyloïdes suite à l'observation de leurs fibrilles en microscopie électronique, de l'augmentation de fluorescence due à la ThT, ou du shift de fluorescence du rouge congo mais sans observer de biréfringence et sans l'observation de la structure  $\beta$  croisée par diffraction aux rayons X.

Tableau VII : Liste des protéines amyloïdogéniques potentielles

<i>Précurseur de protéines ou peptides amyloïdes potentiels</i>	
L' $\alpha$ -1-antitrypsine	La protéine CR1
L'acétylcholine estérase	La protéine CspA
La protéine antigél de type I	La protéine ERF3
La $\beta$ -lactoglobuline	La glycoprotéine B du virus de
Les chaplines	l'Herpes simplex
La protéine CPEB	L'ovalbumine
Les curlis	La prothymosine $\alpha$
La fibronectine	Le récepteur d'androgène
La protéine New1	La spidroïne
La protéine RNQ1	Des protéines de novo d'une librairie
L'atrophine-1	combinatoire

Toutes les protéines de ces trois tableaux n'ont pas été étudiées au cours de ce travail, notamment car plusieurs d'entre elles ont déjà fait l'objet d'une étude de modélisation moléculaire portant sur la recherche de peptides obliques. Il s'agit du peptide  $\beta$  amyloïde (Pillot T. *et al.*, 1996), de la protéine PrP (Pillot T. *et al.*, 1997), de l'Apolipoprotéine A-II (Lambert G. *et al.*, 1998) et des prions de levure Sup35p et Ure2p (Nickmans A., 1999). Ces cinq protéines ont toutefois été testées pour l'analyse automatique. Sur base des données fournies par la littérature, plusieurs protéines vont être éliminées, leurs propriétés intrinsèques n'étant pas compatibles avec la présence de peptides obliques. Ainsi, certaines fibrilles amyloïdes sont formées par de longues chaînes de polyglutamine. La faible hydrophobicité de cet acide aminé n'est pas compatible avec l'apparition d'un gradient d'hydrophobicité en conformation hélicoïdale. L'huntingtine et l'ataxine 1 qui contiennent de tels domaines de polyglutamine sont donc éliminées. De nouvelles protéines ou peptides amyloïdogéniques sont régulièrement découverts. Certaines de ces nouvelles protéines ont été intégrées dans ces tableaux tardivement et n'ont pas été étudiées faute de temps. Les protéines du tableau VII n'ont pas été étudiées en raison du peu d'indices concernant leur amyloïdogénicité.

La recherche de peptides obliques au sein d'un grand nombre de protéines nécessite une méthodologie adéquate. La première étape de l'étude est de définir des domaines potentiellement obliques avec la méthode de détection automatique puis d'analyser ces domaines à partir de la méthodologie décrite dans la littérature (Brasseur R., 2000). Les peptides obliques sont généralement identifiés en utilisant des méthodes basées sur l'hydrophobicité telles que les graphiques de Jähnig et HCA (Brasseur R., 2000). Les résultats obtenus avec ces deux méthodes sur les domaines obliques définis par la méthode de détection automatique se trouvent dans le tableau VIII. Il faut souligner que la méthode automatique ne fournit qu'un faible pourcentage de peptides présentant les propriétés obliques, ce qui permettra de choisir plus facilement le peptide oblique optimum.

Le tableau VIII montre que beaucoup de domaines obliques identifiés par la méthode de détection automatique n'ont pas de correspondance avec les méthodes HCA et de Jähnig. Sur les 40 protéines étudiées conjointement par les trois méthodes, seules treize d'entre elles ont des domaines obliques, HCA et Jähnig correspondants. Ces protéines figurent au tableau IX.



- Résultats -

*Tableau VIII : Liste des protéines étudiées*

<i>Précurseur de protéines ou peptides amyloïdes</i>	<i>Zone testée</i>	<i>Domaines obliques</i>	<i>Domaines HCA</i>	<i>Domaines Jähnig</i>
La protéine Sup35p	1-685	254-289 (37); 390-405 (3); 432-447 (3); 466-479 (3); 490-508 (14); 520-531 (2); 560-570 (1); 577-621 (36); 633-653 (7); 670-685 (11)	ND	ND
La protéine Ure2p	1-354	116-149 (35); 178-195 (13); 214-238 (16); 289-335 (41)	ND	ND
Les chaînes légères d'immunoglobuline	1-114	83-94 (1)		81-95
Les chaînes lourdes d'immunoglobuline	1-228	4-20 (1); 22-40 (4); 41-52 (1); 101-115 (3); 143-163 (32); 202-215 (7)	31-41; 102-113	102-116; 198-211
La $\beta$ -2-microglobuline	1-99	22-32(1); 59-72 (4)	62-72	13-31
La transthyréte	1-127	8-22 (6); 77-93 (9)	11-20	8-17
La protéine amyloïde A sérique	1-104	1-13 (2); 44-62 (12)		8-18
L'apolipoprotéine AI	1-243	14-26 (2); 216-228 (3)	11-22	210-225
L'apolipoprotéine AIV	1-376	7-17 (1)	7-18	8-31
La gelsoline	173-243	179-198 (7)		193-199
Le lysozyme	1-130	21-38 (4)		
La chaîne A $\alpha$ du fibrinogène	499-558	499-529 (11)	510-527	510-531
La cystatine C	1-120	56-66 (1); 94-115 (12)	56-66	90-105
La protéine membranaire de type 2B	244-277 (ABRI)			
	244-277 (ADAN)	8-33 (45)		12-22
La calcitonine	1-32	4-16 (1); 17-31 (3)		
L'amyline ("Islet Amyloid Polypeptide")	1-37			
Le facteur atrial natriurétique	1-28			
La prolactine	1-34	22-32 (1)	15-25; 22-34	
L'insuline	1-21 (A)			
	1-30 (B)	7-29 (28)	11-20	11-22
La lactadherine	268-317			
La kératopithéline	1-668	29-42 (8); 63-74 (2); 84-96 (6); 116-143 (9); 190-205 (4); 238-256 (5); 292-321 (79); 321-343 (6); 340-355 (8); 397-407 (1); 520-534 (1); 550-580 (20); 598-615 (12)	340-355; 547-559; 608-619	79-91; 89-108; 290-304; 527-537; 547-559; 564-580; 591-613; 611-622
La lactoferrine	1-692	57-76 (4); 92-108 (12); 145-162 (15); 189-199 (1); 251-261 (1); 318-331 (3); 376-418 (72); 430-443 (6); 462-479 (13); 540-551 (3); 561-579 (9); 589-602 (3); 662-673 (2)	318-332; 563-577	92-105; 325-337; 402-420; 458-471; 568-585
L' $\alpha$ -lactalbumine	1-123	15-30 (6); 89-113 (114)	92-105	9-27
L' $\alpha$ -synucléine	1-140	3-17 (1); 63-97 (23)	66-78	60-80
L'acylphosphatase	1-98	29-43 (4)		31-44
L'apolipoprotéin CII	1-79			
L'apolipoprotéin E	216-299			
La barnase	1-24	7-17 (1)		9-16
La protéine C du surfactant	1-35	8-32 (25)		
La carboxypeptidase A2	1-81	53-71 (12)		
Les protéines du chorion	35-95	2-51 (83)		
Le facteur de croissance des fibroblastes	1-132	5-22 (2); 114-127 (7)	11-21	14-28
La protéine CspB	1-67	27-37 (1)		
Le cytochrome c	1-104	9-20 (1); 75-87 (6)		73-83
L'endostatine	1-182	9-24 (7); 39-54 (4); 67-92 (5); 149-183 (55)	6-15	7-17; 70-80
La protéine FBP28	430-466			
La protéine G	228-282			
La protéine HET-s	218-289	237-261 (20)	241-251	233-250; 246-267
La protéine HMG1 (Amphoterin)	12-27			
Les hydrophobines	1-112	43-93 (147); 67-117 (147); 118-136 (5)	75-86	61-87
La protéine HypF	2-91	17-32 (6)	23-32	10-28
La méthionine aminopeptidase	1-295	26-40 (7); 49-64 (3); 77-101 (10); 114-132 (6); 143-153 (1); 158-170 (1); 178-201 (43); 203-214 (3); 230-241 (3); 254-277 (18)	26-37	70-90
La monelline	1-50 (B)	1-17 (4)		11-24
La myoglobine	1-153	3-25 (5); 61-76 (2); 107-117 (1)	9-22; 65-76	55-68; 107-121
La protéine p53	1-393	43-54 (1); 104-114 (1)		
La phosphatidylinositol-3-kinase	1-100	36-48 (1)		30-41
La phosphoglycerate kinase	1-415	18-30 (2); 33-53 (12); 56-66 (1); 101-125 (29); 169-185 (2); 202-223 (40); 225-251 (56); 267-297 (98); 320-335 (5); 345-356 (3); 358-371 (6); 392-413 (20)		56-66; 110-122; 272-285
La protéine Pmel17	1-445	58-72 (3); 78-89 (2); 124-139 (13); 139-159 (14); 249-260 (2); 260-280 (12); 354-367 (3); 372-397 (21); 425-444 (20)		
La stefin B	1-98	34-66 (23)		
La protéine Tau	1-441	299-316 (6); 391-401 (1)		291-311

*La colonne 3 indique les domaines obliques trouvés avec la méthode de détection automatique ainsi que le nombre de peptides par domaine ; les colonnes 4 et 5, les domaines présentant respectivement un profil HCA et Jähnig compatible avec la présence d'un peptide oblique. ND = Non Déterminé.*

- Résultats -

Parmi les 18 protéines du tableau IX, plusieurs ont été choisies pour une étude approfondie en raison de leur comportement prion ou de leur implication dans une maladie neurodégénérative majeure (tout comme les protéines PrP et le peptide A $\beta$ ). Il s'agit des peptides obliques détectés au sein des prions de levure Sup35 et Ure2p déjà identifiés au CBMN (Nickmans A., 1999) en 1999 et qui n'avaient pas été testés expérimentalement ; et des peptides obliques des protéines  $\alpha$ -synucléine, impliquée dans la maladie de Parkinson, et HET-s qui est un prion de champignon. Trois autres peptides obliques ont également été testés : il s'agit des peptides obliques de l'insuline, de la transthyretine et de la protéine HypF.

*Tableau IX : Liste des protéines amyloïdogéniques au sein desquelles un peptide oblique a été mis en évidence*

<i>Précurseur de protéines ou peptides amyloïdes</i>	<i>Localisation dans la séquence</i>	<i>Nombre d'acides aminés</i>	<i>Séquence</i>	<i>Hydrophobicité moyenne</i>	<i>Angle d'insertion (°)</i>
Le peptide A $\beta$	11-22	12	EVHHQKLVFFAE	0,14	50
	29-40	12	GAIIGLMVGGVV	0,86	40
La protéine PrP	118-135	18	AGAVVGGVGGYMLGSAMS	0,57	25
	203-216	14	VKMMERVVEQMCIT	0,10	35
L'apolipoprotéine AII	53-70	18	IKKAGTELVNFLSYFVEL	0,29	35
La protéine Sup35p	142-155	14	KTLKLVSSSGIKLA	0,13	44
	256-269	14	GGKDHVSLIFMGHV	0,33	64
La protéine Ure2p	181-194	14	SGAILLHLVNKYYK	0,22	42
	252-264	13	VRRVYGVVEMALA	0,18	50
L'apolipoprotéine AIV	7-17	11	VATVMWDYFSQ	0,34	50
Les chaînes lourdes d'immunoglobine	104-115	12	VAAALLTDWGQG	0,43	36
La transthyretine	10-20	11	CPLMKVLDVAV	0,43	49
La chaîne A $\alpha$ du fibrinogène	516-527	12	PMLGEFAVRLSL	0,34	34
L'insuline	9-19	11	SHLVEALYLVC	0,49	63
La kératoépithéline	550-564	15	LANILKYHIGDEILV	0,38	33
	598-613	16	VAEPDIMATNGVVHVI	0,43	32
La lactoferrine	318-330	13	GLYLGSGYFTAQ	0,48	31
	566-577	12	DLKLADFALLCL	0,41	39
L' $\alpha$ -synucléine	67-78	12	GGAVVTGVTAVA	0,63	31
Le facteur de croissance des fibroblastes	11-21	11	GGYFLRIFPDG	0,30	50
La protéine HET-s	244-257	14	VVTAAALHGGIRIS	0,41	33
Les hydrophobines	72-82	11	SSPVTALLGLL	0,57	48
La protéine HypF	18-28	11	GVGFRPFVWQL	0,39	33
La myoglobine	62-76	15	KKHGATVLTALGGIL	0,33	58

*Les cinq premières protéines correspondent aux protéines ayant déjà été étudiées au CBMN avant la réalisation de cette thèse. La colonne 5 indique l'hydrophobicité moyenne du peptide calculée à partir de l'échelle consensus d'Eisenberg et la colonne 6, l'angle d'insertion du peptide dans une membrane modélisée.*

## IV.2.2. L'α-synucléine

### IV.2.2.1. Analyse de séquence

La méthode de Jähnig alloue à chaque résidu une moyenne d'hydrophobicité donnant plus de poids aux résidus voisins en terme de structure secondaire. Dans les profils Hα de Jähnig, les hélices α amphipathiques apparaissent sous forme d'oscillations ayant une périodicité de trois à quatre acides aminés et les peptides obliques, sous forme d'oscillations ascendantes ou descendantes, en fonction du gradient d'hydrophobicité (Brasseur R., 2000). Le profil Hα de Jähnig de l'α-synucléine montre trois zones, un domaine amphipathique (séquence 1-50) défini par des oscillations régulières, un domaine présentant une hydrophobicité croissante (séquence 51-89) et une zone hydrophile (séquence 90-140) définie par des oscillations irrégulières (Figure 38B).

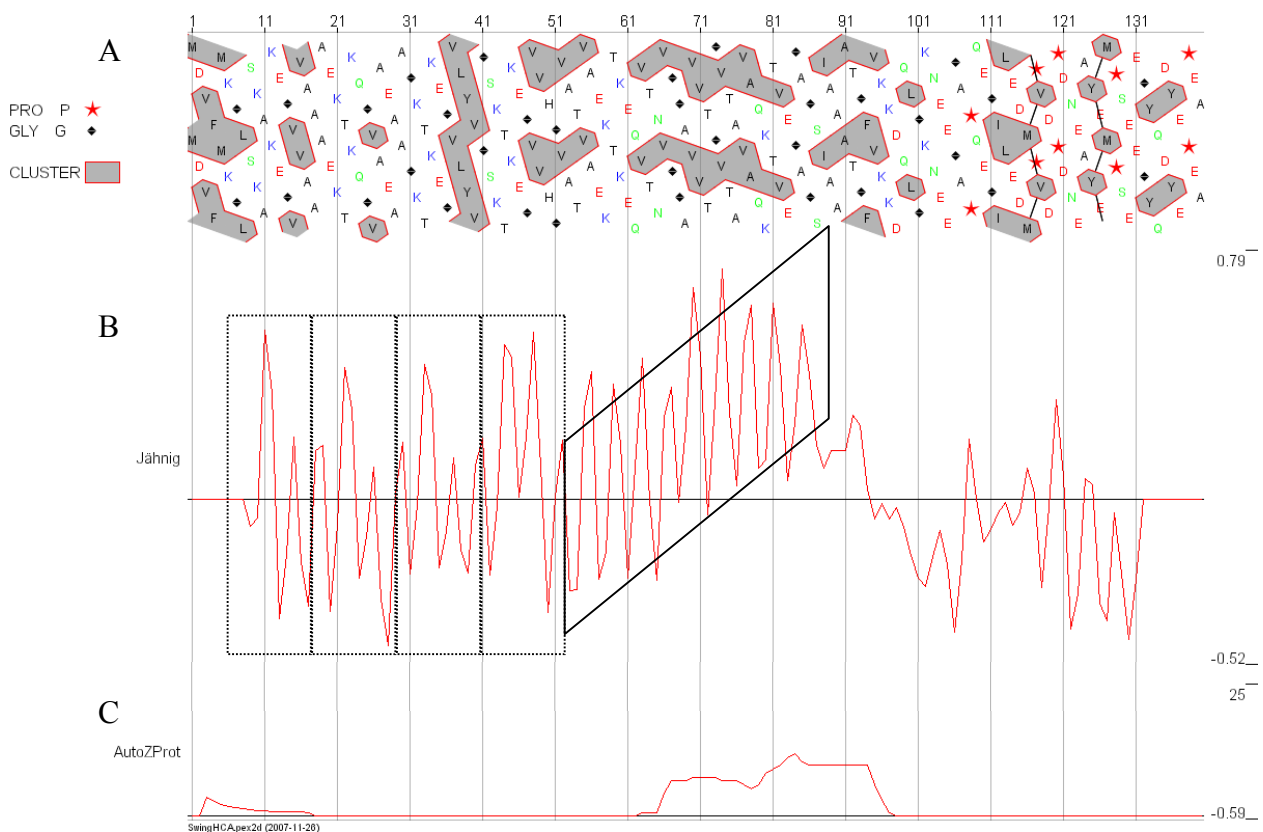


Figure 38 : (A) Graphique HCA et (B) profil Jähnig de l'α-synucléine. Les quatre premières répétitions sont encadrées en lignes pointillées et le domaine présentant un gradient d'hydrophobicité est encadré en lignes continues. (C) Prédiction des domaines obliques avec la méthode de détection automatique. Les valeurs correspondent au rapport (en %) avec lequel chaque résidu se retrouve dans les peptides déterminés comme obliques.

Le premier domaine correspond aux quatre premières répétitions imparfaites de onze résidus décrites dans la littérature et chacune de celles-ci présente des oscillations similaires. Cependant, le domaine 51-89, qui inclut les trois autres répétitions, présente des oscillations régulières ascendantes caractéristiques des peptides obliques. Ce domaine correspond à une des zones détectées comme potentiellement obliques par la méthode automatique (Figure 38C).

En ce qui concerne la représentation HCA, celle-ci permet de visualiser des amas hydrophobes au sein de la séquence dont la taille et la longueur peuvent être associées à des structures secondaires et des propriétés hydrophatiques. Le diagramme HCA de l' $\alpha$ -synucléine est représenté à la figure 38A. Au sein du domaine central, la région 63-82 est enrichie en résidus hydrophobes et en glycine tout en contenant peu de résidus polaires et chargés. Il a précédemment été montré que les peptides obliques présentent cette distribution d'acides aminés (Lins L. *et al.*, 2001).

#### IV.2.2.2. Modélisation moléculaire des peptides

Pour prédire le peptide oblique optimum de la région 63-82 et son comportement dans la membrane, trois étapes ont été suivies. Premièrement, les résultats IMPALA ont été utilisés pour la sélection du peptide oblique possédant les meilleures propriétés obliques parmi plusieurs candidats. Les contraintes ont été calculées pour un grand nombre de positions pour chaque peptide dans la bicouche modèle. Deuxièmement, une optimisation a été réalisée à partir de la structure de plus faible valeur de contraintes (après la première étape) en appliquant une dynamique angulaire à chaque étape d'IMPALA (voir méthodes). Cette étape permet d'évaluer les fluctuations structurales du peptide par rapport au modèle initial en hélice  $\alpha$ . La troisième étape correspond à l'approche stochastique qui permet d'analyser les préférences structurales des peptides dans une membrane modèle.

Le tableau X correspond aux fragments sélectionnés après la première étape de calcul. Ces fragments présentent des propriétés des peptides obliques, telles qu'une hydrophobicité élevée, une position du centre de masse proche de l'interface tête polaire/chaînes acylées des phospholipides et un angle d'insertion membranaire compris entre 30° et 60°. Le peptide 67-78 a été choisi parce qu'il a une longueur de 12 acides aminés, ce qui correspond à la longueur minimale pour une structure en hélice  $\alpha$  stable, et qu'il répond aux autres critères des peptides obliques.

Tableau X : Moyenne d'hydrophobicité et position des peptides dans la membrane IMPALA pour les fragments de la région de l' $\alpha$ -synucléine présentant des propriétés obliques

	Hydrophobicité moyenne	Position du centre de masse (Å)	Angle d'insertion (°)	Séquence peptidique
Sequence 63-78	0.56	-8.5	43	VTNVGGAVVTGVTAVA
Sequence 66-78	0.67	-9.3	31	VGGAVVTGVTAVA
<b>Sequence 67-78</b>	<b>0.63</b>	<b>-10</b>	<b>31</b>	<b>GGAVVTGVTAVA</b>
Sequence 68-78	0.65	-10.8	33	GAVVTGVTAVA

La moyenne d'hydrophobicité est calculée en utilisant l'échelle consensus d'Eisenberg. La position du centre de masse est calculée par rapport au centre de la bicouche et l'angle est calculé entre l'axe de l'hélice et la normale à la bicouche.

La figure 39A montre la nappe des contraintes correspondant aux simulations IMPALA du peptide 67-78 WT. Ce peptide est capable d'adopter quatre positions métastables au sein de la membrane, deux de chaque côté de la membrane. Si l'on considère une seule couche, les positions les plus stables correspondent à un angle compris entre 20° et 40° et une pénétration de 10 Å (Figure 39A). L'existence de positions métastables a déjà été observée pour d'autres peptides obliques et l'on pense qu'elles contribuent à leur activité destabilisatrice (Lins L. *et al.*, 2001).

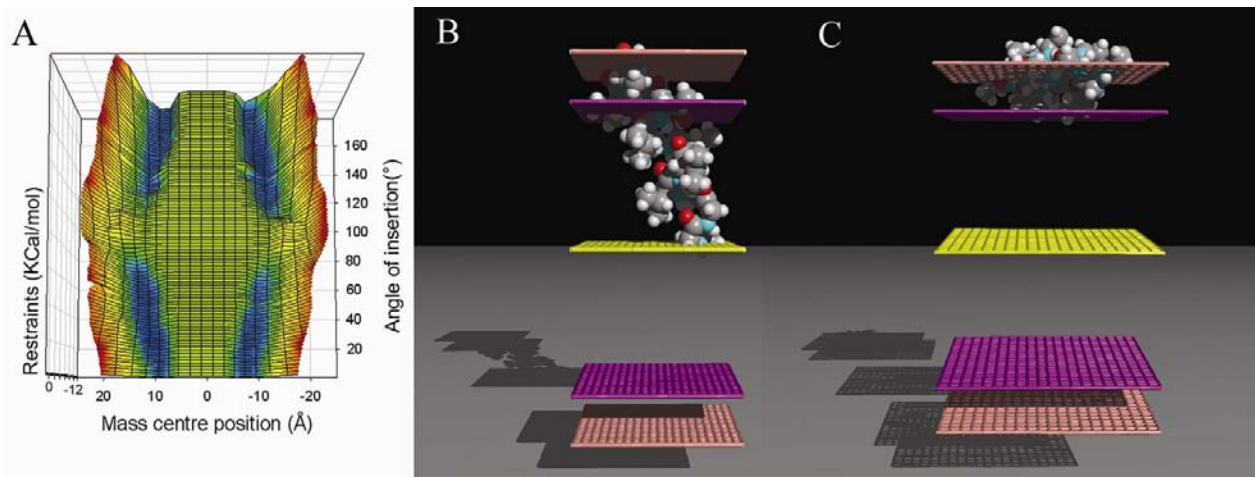


Figure 39 : Graphique 3D représentant la valeur de la contrainte totale pour le peptide 67-78 en fonction de l'angle et de la pénétration du centre de masse comme décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes". Les contraintes augmentent du bleu vers le rouge. (B, C) Vue de l'insertion du peptide WT et du mutant SynuM53 dans leur position optimale dans la bicouche après la procédure stochastique.

Afin de prédire plus précisément la stabilité structurale de la conformation hélicoïdale du peptide de l' $\alpha$ -synucléine dans un environnement lipidique et d'améliorer la modélisation de l'interaction peptide-membrane, deux approches différentes ont été menées. D'une part, la stabilité structurale a été testée en dynamique angulaire (Lins L. *et al.*, 2006). Lors de cette étape, le peptide est initialement en hélice  $\alpha$  et les variations structurelles sont calculées au cours du temps. Le peptide demeure en hélice  $\alpha$  durant la procédure et la déviation du RMS entre les structures avant et après dynamique est de 1,48 Å.

D'autre part, une procédure "*ab initio*" (Stochastique) a été utilisée. Avec celle-ci, la structure d'énergie minimale est obtenue par itérations (Thomas A. *et al.*, 2006). Après 100 itérations, les résultats montrent que les trois premiers résidus du peptide adoptent une conformation random coil tandis que les autres résidus demeurent hélicoïdaux. La déviation de RMS entre la structure de plus basse énergie et les 98 autres modèles sélectionnés est inférieure à 1 Å. Les deux approches suggèrent une faible labilité structurale lorsque la molécule est isolée et dans la membrane (Figure 39B).

Afin de démontrer l'importance du gradient d'hydrophobicité pour l'activité déstabilisatrice des peptides obliques, des mutants "non obliques" ont été définis par modélisation moléculaire, comme réalisé précédemment pour d'autres peptides obliques (Pérez-Méndez O. *et al.*, 1998 ; Horth M. *et al.*, 1991 ; Martin I. *et al.*, 1994). Pour générer ces mutants, des permutations d'acides aminés sont préférées, afin de conserver l'hydrophobicité moyenne. Cependant, si cela s'avère nécessaire, des substitutions d'acides aminés peuvent être envisagées. Afin de caractériser le mutant choisi, le peptide est construit en hélice  $\alpha$  et testé dans IMPALA. 65 mutants ont été définis (substitutions et/ou permutations d'acides aminés). Quatre parmi ceux-ci se positionnent de façon parallèle à la membrane (Tableau XI). Le mutant SynuM53 (2 permutations et 2 substitutions), qui s'oriente de façon parallèle à la membrane, possède une moyenne d'hydrophobicité proche de celle du peptide sauvage (WT) et a donc été sélectionné.

Tableau XI : Mutants dépourvus du gradient d'hydrophobicité

	Hydrophobicité moyenne	Angle d'insertion (°)	Séquence peptidique
<b>SynuM40</b>	0.31	86	GGAQVTGVTQA
<b>SynuM44</b>	0.47	89	GGAVQAGVATVT
<i>SynuM53</i>	0.52	91.5	GGAVSAGVASVT
<b>SynuM65</b>	0.46	89.5	GGSVTAGVASVT

L'hydrophobicité et les angles sont définis comme pour le tableau X.

#### IV.2.2.3. Mesures de fusion de phase lipidique et perméabilité

Les peptides obliques induisent de la fusion de phase lipidique *in vitro* en raison de leur activité déstabilisatrice vis-à-vis des membranes (Pillot T. *et al.*, 1996 ; Pillot T. *et al.*, 1997 ; Brasseur R., 2000 ; Pérez-Méndez O. *et al.*, 1998 ; Horth M. *et al.*, 1991 ; Martin I. *et al.*, 1994) ; le peptide oblique de l' $\alpha$ -synucléine a donc été étudié en fusion de phase lipidique et perméabilité. Le peptide, dissous dans du TFE, de l'HFP/TFE ou du DMSO, a été ajouté à un mélange de liposomes non marqués et de liposomes marqués au R18, un marqueur fluorescent lipophile. Lorsque la fusion se produit entre vésicules, une augmentation de la fluorescence du R18 est observée en raison de la dilution du marqueur. Différentes conditions expérimentales ont été testées. Des liposomes de petite (SUV) et de grande taille (LUV) composés de lipides portant une charge globale neutre (PC, PE, SM, CHOL) ou comportant des lipides acides (PC, PE, PI, PS, SM, CHOL) ont été utilisés. Pour considérer qu'il y a fusion, la fluorescence relative doit être supérieure à 100. La figure 40 montre que le peptide induit de la fusion de phase lipidique quel que soit le type de liposome (LUV ou SUV, avec des phospholipides acides ou pas) d'une façon dépendante de la concentration.

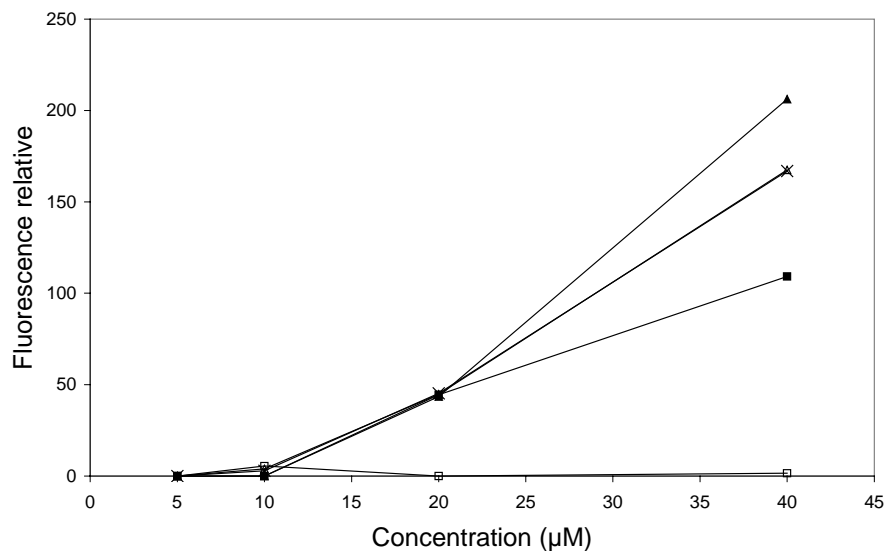


Figure 40 : Fluorescence induite par le peptide de l' $\alpha$ -synucléine et le mutant SynuM53 en fonction de la concentration peptidique. Peptide de l' $\alpha$ -synucléine WT en présence de SUV neutres (▲), SUV chargés (■), LUV neutres (Δ), LUV chargés (×) et du mutant SynuM53 en présence de SUV neutres (□).

Lorsque le peptide en solution est remplacé par du TFE, aucun effet significatif sur la fluorescence du R18 n'a été observé. Cela suggère qu'il n'y a pas de fusion de vésicule spontanée significative. Pour les concentrations testées, l'effet maximal observé se situe à 40 $\mu$ M, ce qui correspond à un rapport molaire peptide/lipide de 1,6 (Figure 40). Le peptide mutant a été testé dans les mêmes conditions. Les expériences de fusion de phase lipidique montrent clairement que le mutant SynuM53 n'induit pas de fusion significative des liposomes (Figure 40).

Pour éliminer la possibilité d'une diffusion du R18 sans vraie fusion (due par exemple à l'agrégation des vésicules), des expériences de perméabilité ont été réalisées. Pour cela, de l'HPTS et du DPX ont été encapsulés dans les mêmes liposomes. Lorsque des liposomes contenant l'HPTS-DPX sont destabilisés, les deux molécules sont relâchées dans le milieu, et il y a une augmentation de fluorescence. Comme la fusion de phase lipidique est optimale pour des SUV non chargés, seuls ces liposomes ont été testés. Les expériences montrent que le peptide oblique de l' $\alpha$ -synucléine induit un relargage significatif d'HPTS (Figure 41). Ces expériences montrent également une diminution de 50% de perméabilité pour le mutant (Figure 41), ce qui confirme une diminution de la capacité destabilisatrice, en accord avec les approches de modélisation.

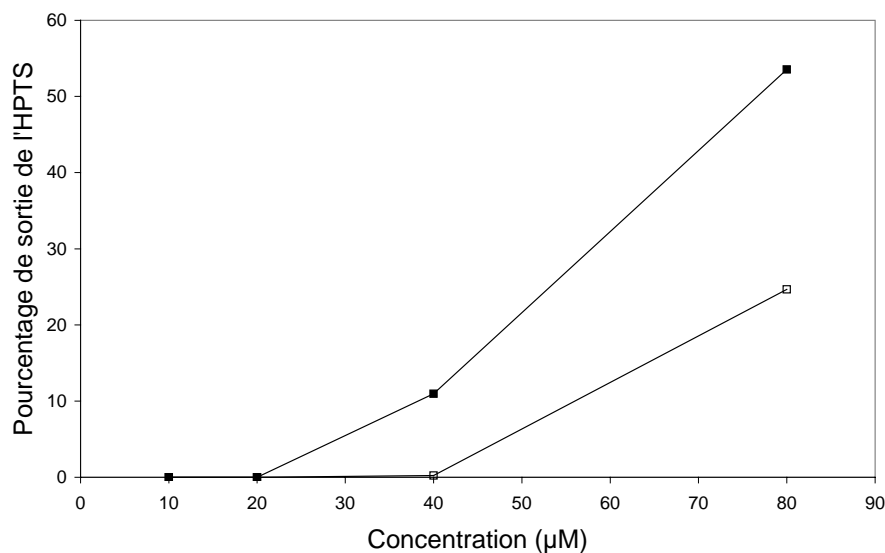


Figure 41 : Perméabilité de SUV neutres induite par le peptide de l' $\alpha$ -synucléine WT (■) et le mutant SynuM53 (□) en fonction de la concentration peptidique.



#### IV.2.2.4. Mesures de cytotoxicité *in vitro*

La cytotoxicité neuronale induite par le peptide 67-78 a été étudiée en mesurant la réduction de l'activité mitochondriale par le test MTS. Le MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium) est converti en formazan par des déshydrogénases. La mesure de la production de formazan est un indicateur du métabolisme cellulaire et donc de la viabilité. Comme montré sur la figure 42, le traitement de neurones avec le peptide 67-78 de l' $\alpha$ -synucléine induit une diminution du nombre de cellules actives dépendant de la concentration, alors que le traitement avec le mutant SynuM53 ne montre pas d'effet significatif. En effet, la réduction du MTS (viabilité cellulaire) est significativement affectée par le peptide 67-78 à des concentrations variant entre 100 $\mu$ M et 400 $\mu$ M sur une période de 24h (environ 25% de viabilité pour 400 $\mu$ M).

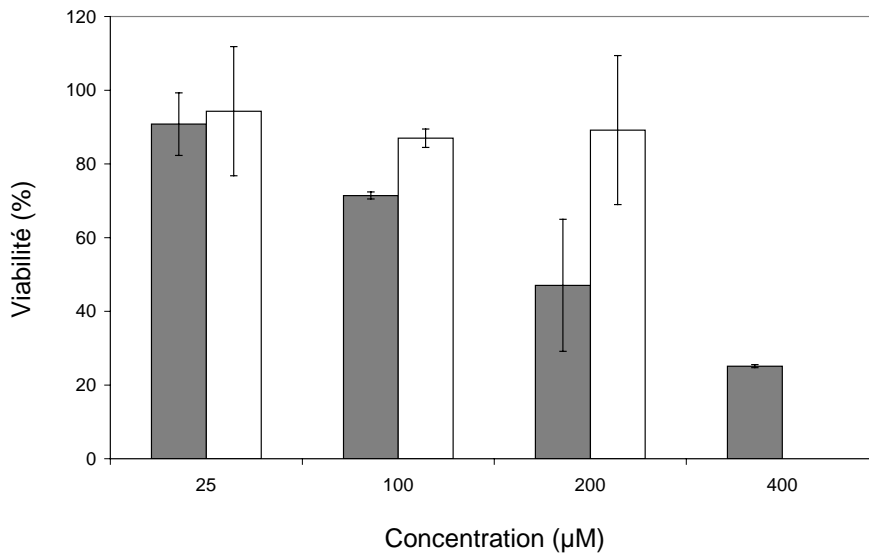


Figure 42 : Cytotoxicité du peptide WT de l' $\alpha$ -synucléine (barres pleines) et du mutant SynuM53 (barres vides) sur la lignée cellulaire SH-SY5Y. La cytotoxicité de ce dernier n'a pas été mesurée à 400 $\mu$ M.

#### IV.2.2.5. Détermination de la structure secondaire

La structure secondaire des peptides de l' $\alpha$ -synucléine a été évaluée à partir de mesures de spectres CD à des concentrations croissantes en TFE. Il a été montré que des quantités croissantes de TFE permettent de mettre en évidence la labilité structurale (Hofmann M.W. *et al.*, 2004). Le peptide 67-78 et le mutant SynuM53 subissent des modifications structurales

- Résultats -

significatives (de 5% à 40% d'hélice), en présence de quantités croissantes de TFE (Tableau XII). Cela suggère une plasticité structurale pour ces peptides en fonction de l'environnement. La labilité structurale est une propriété observée chez pratiquement tous les peptides obliques étudiés jusqu'à présent (Martin I. *et al.*, 1994 ; Charlotaux B. *et al.*, 2006 ; Lorin A. *et al.*, 2006). Lorsque ces peptides sont mis en présence de liposomes, aucune différence structurale n'est observée par rapport aux mesures réalisées dans le tampon. Les concentrations peptidique et lipidique sont respectivement de 5 $\mu$ M et 25 $\mu$ M, ce qui donne un rapport peptide/lipide de 0,2. Les spectres correspondent, dans ces deux conditions et pour ces deux peptides, à une conformation majoritairement désordonnée (Tableau XII).

*Tableau XII : Structure secondaire (%) du peptide de l' $\alpha$ -synucléine WT et mutant déterminée par dichroïsme circulaire*

Echantillon		Hélice $\alpha$	Feuillet $\beta$	Coude	Désordonné
100% TFE	WT	41	16	18	27
	Mutant	39	18	18	25
50% TFE	WT	19	23	22	33
	Mutant	18	27	22	33
0% TFE	WT	5	27	23	43
	Mutant	6	29	23	40
Liposome	WT	6	26	24	43
	Mutant	6	29	22	39

### IV.2.3. La protéine Sup35

La protéine Sup35 a été étudiée en 1999 par Nickmans au cours de son travail de fin d'étude au CBMN (Nickmans A., 1999). Celui-ci comportait une analyse de séquence avec les méthodes HCA, Jähnig et le calcul de l'hydrophobicité moyenne, suivi de la construction en hélice  $\alpha$  de plusieurs peptides appartenant à différentes régions de la protéine et la simulation de l'insertion membranaire de 19 d'entre eux. Cette étude l'a conduit à proposer deux peptides obliques potentiels pour cette protéine. Il s'agit des peptides 142-155 et 256-269 (Figure 43C). Notre méthode de détection automatique fournit plusieurs domaines, dont un contenant le peptide 256-269. Par contre, le peptide 142-155 n'est pas retrouvé. Ce peptide possède une hydrophobicité moyenne de 0,13. Au cours de cette thèse, le peptide 256-269 a donc été caractérisé expérimentalement.

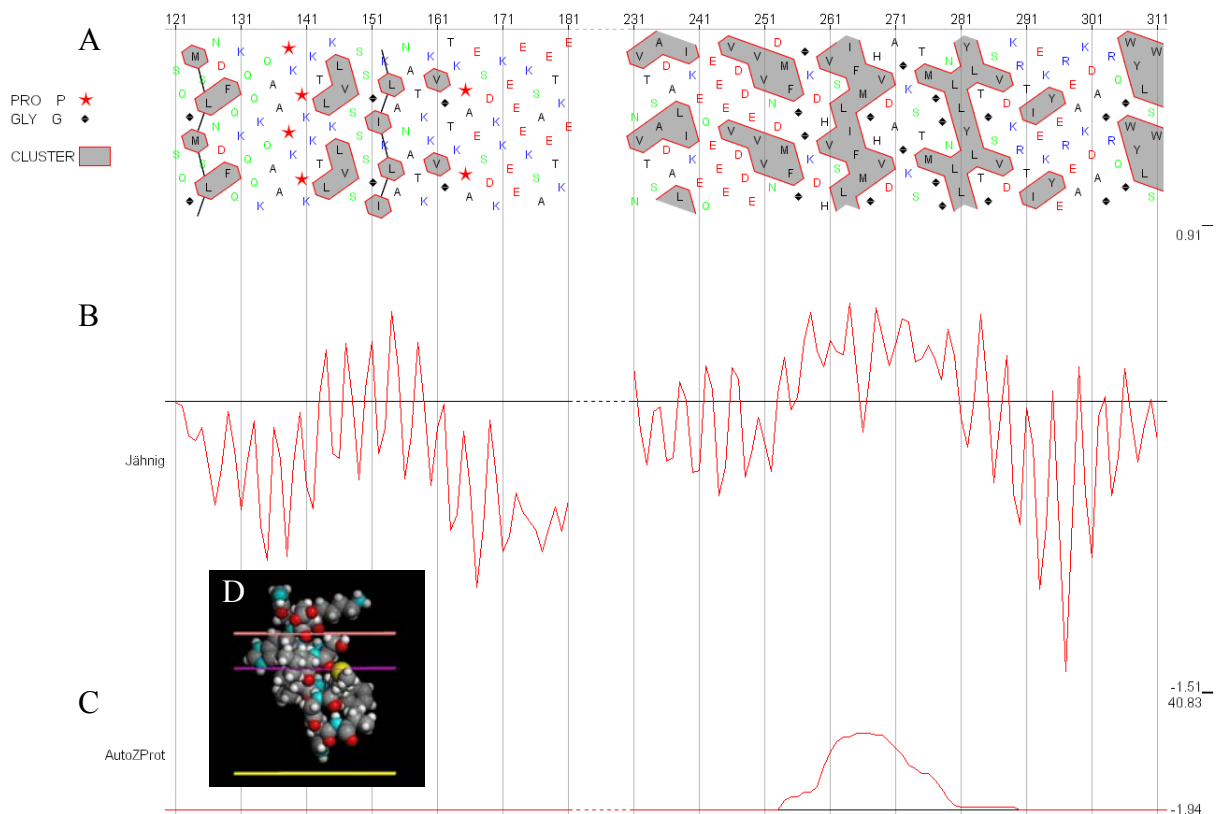


Figure 43 : (A) Graphique HCA de la séquence de la protéine Sup35. (B) Profil Jähnig de la protéine Sup35. (C) Prédiction des domaines obliques avec la méthode de détection automatique. (D) Position optimale du peptide oblique 256-269 dans la membrane IMPALA.

#### IV.2.3.1. Mesures de fusion de phase lipidique et perméabilité

Au cours de ces mesures, les différentes conditions expérimentales testées sont les mêmes que celles utilisées pour le peptide oblique de l' $\alpha$ -synucléine. La figure 44 montre que le peptide provoque la fusion des phases lipidiques quel que soit le type de liposome d'une façon dépendante de la concentration. Pour les concentrations testées, l'effet maximal observé se situe à 20 $\mu$ M, ce qui correspond à un rapport molaire peptide/lipide de 0,8 (Figure 44). Aucun effet significatif du TFE sur la fluorescence du R18 n'a été observé.

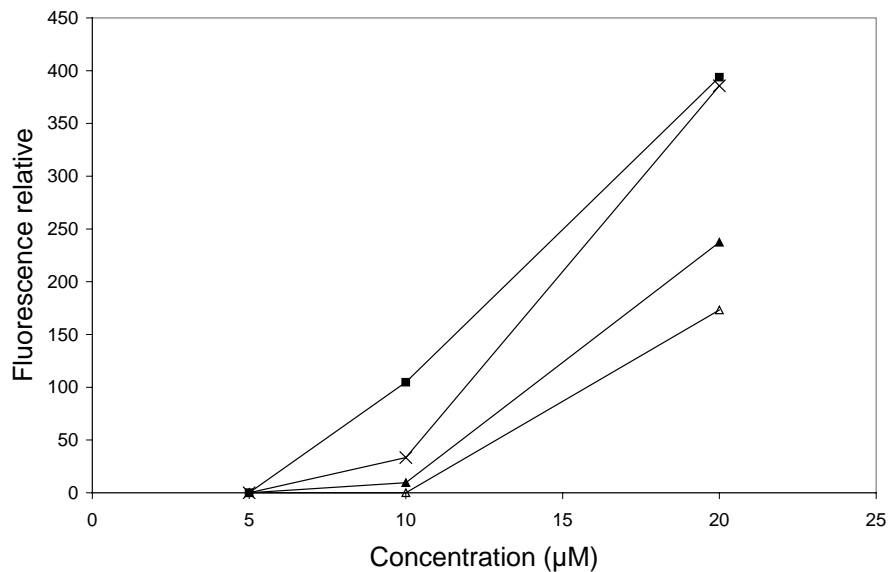


Figure 44 : Fluorescence induite par le peptide de la protéine Sup35 en fonction de la concentration peptidique. Peptide en présence de SUV neutres ( $\blacktriangle$ ), SUV chargés ( $\blacksquare$ ), LUV neutres ( $\Delta$ ), LUV chargés ( $\times$ ).

En ce qui concerne la perméabilité membranaire, les expériences ont été réalisées avec des SUV chargés et montrent que le peptide oblique de la protéine Sup35 induit un relargage significatif d'HPTS (Figure 45). Pour les concentrations testées, l'effet maximal observé correspond à une concentration de 40 $\mu$ M lorsque le peptide est dissous dans du TFE, de l'HFP/TFE ou du DMSO.

- Résultats -

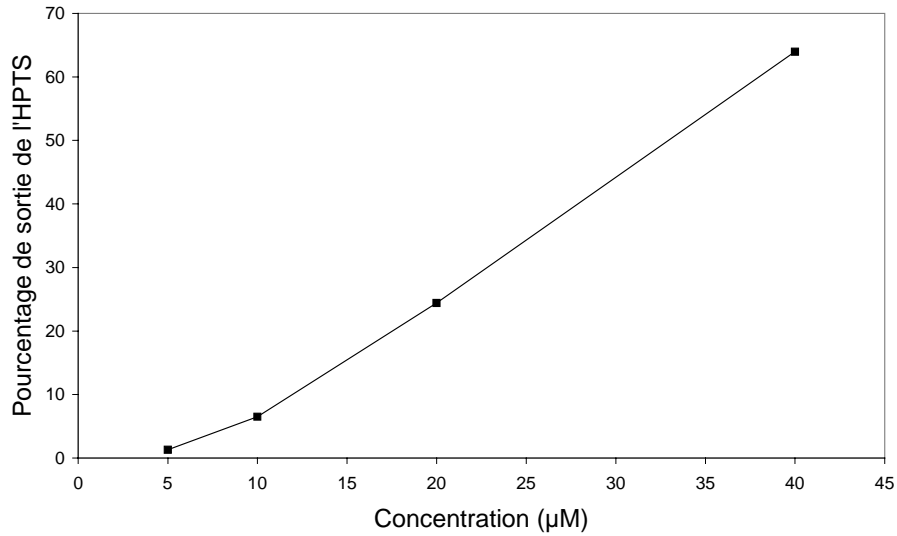


Figure 45 : Perméabilité de SUV neutres induite par le peptide de la protéine Sup35 (■) en fonction de la concentration peptidique.

IV.2.3.2. Mesures de cytotoxicité *in vitro*

La cytotoxicité neuronale induite par le peptide 256-269 a été étudiée en mesurant la réduction de l'activité mitochondriale par le test MTS. Comme montré sur la figure 46, ce peptide n'induit pas de diminution significative du nombre de cellules actives pour les concentrations testées (entre 10 et 200 $\mu\text{M}$ ).

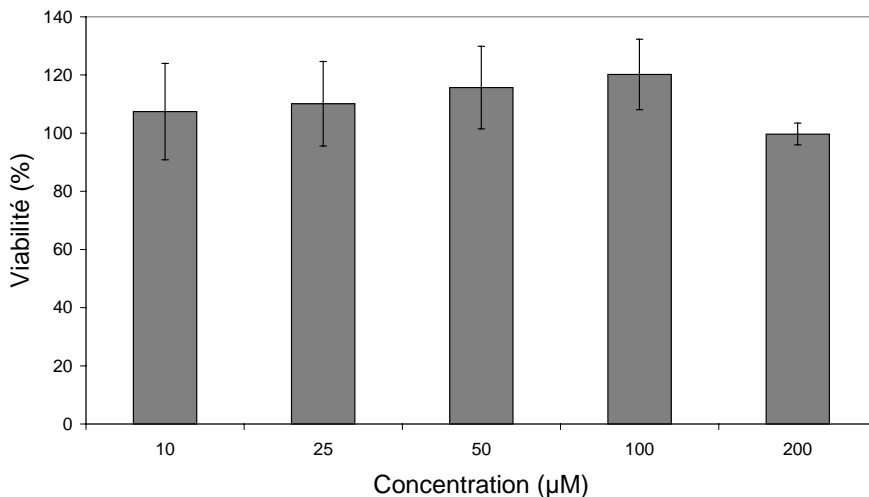


Figure 46 : Cytotoxicité du peptide de la protéine Sup35 sur la lignée cellulaire SH-SY5Y.

#### IV.2.3.3. Détermination de la structure secondaire

Les spectres CD obtenus avec le peptide 256-269 de la protéine Sup35 montrent que ce peptide subit des modifications structurelles significatives (de 5% à 42% d'hélice) lorsqu'il est mis en présence de quantités croissantes de TFE (Tableau XIII). En présence de liposomes, le spectre correspond à une conformation majoritairement en feuillet bêta.

*Tableau XIII : Structure secondaire (%) du peptide de la protéine Sup35 déterminée par dichroïsme circulaire*

Echantillon	Hélice $\alpha$	Feuillet $\beta$	Coude	Désordonné
100% TFE	42	16	16	26
50% TFE	38	13	24	25
0% TFE	5	37	24	34
Liposome	19	45	18	19

#### IV.2.4. La protéine Ure2

La protéine Ure2 a également été étudiée par Nickmans avec la même méthodologie que celle utilisée pour la protéine Sup35 (Nickmans A., 1999). Au cours de cette étude, l'insertion membranaire de 22 peptides construits en hélice  $\alpha$  et appartenant à différentes régions de la protéine a été étudiée avec IMPALA, et les peptides 181-194 et 252-264 ont été proposés comme peptides obliques potentiels pour cette protéine (Figure 47). Le peptide 181-194 est retrouvé par notre méthode de détection automatique qui fournit les zones 116-149, 178-195, 214-238 et 289-335. Le peptide 181-194 a donc été caractérisé expérimentalement au cours de cette thèse.

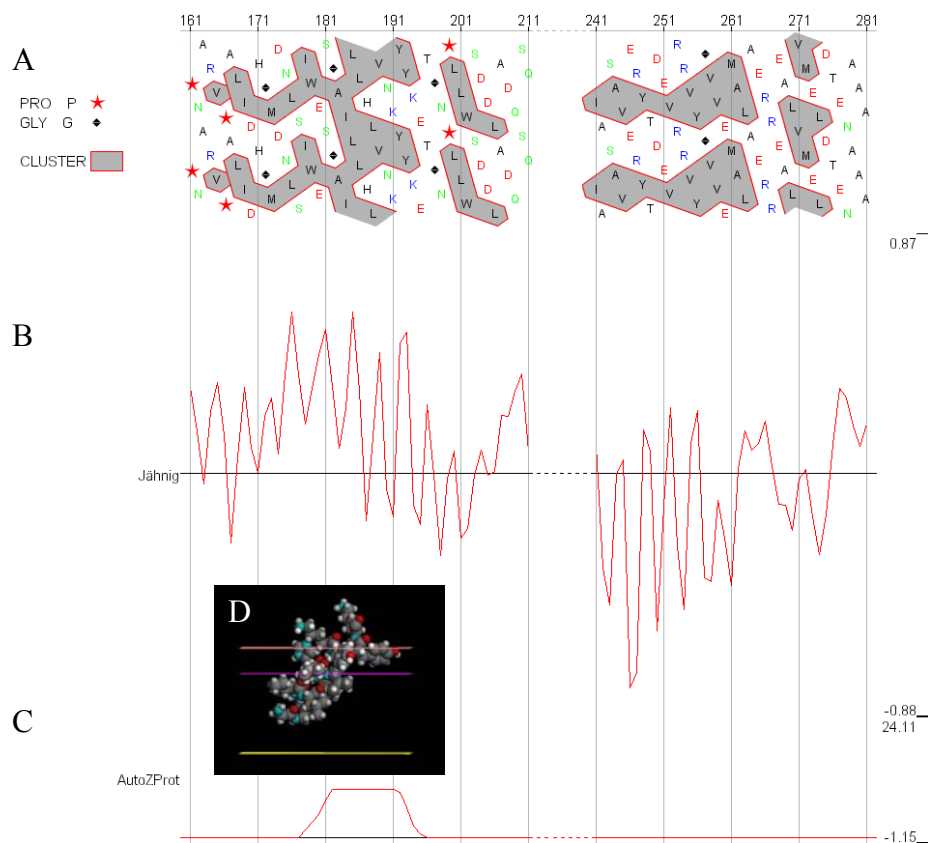


Figure 47 : (A) Graphique HCA de la séquence de la protéine Ure2. (B) Profil Jähmig de la protéine Ure2. (C) Prédiction des domaines obliques avec la méthode de détection automatique. (D) Position optimale du peptide oblique 181-194 dans la membrane IMPALA.

#### IV.2.4.1. Mesures de fusion de phase lipidique et perméabilité

La figure 48 montre que, pour les différentes conditions expérimentales testées, identiques à celles testées pour l' $\alpha$ -synucléine, le peptide induit de la fusion de phase lipidique quel que soit le type de liposome et d'une façon dépendante de la concentration. Pour les concentrations testées, l'effet observé est maximal à 20 $\mu$ M, ce qui correspond à un rapport molaire peptide/lipide de 0,8 (Figure 48). Aucun effet significatif du TFE sur la fluorescence du R18 n'a été observé.

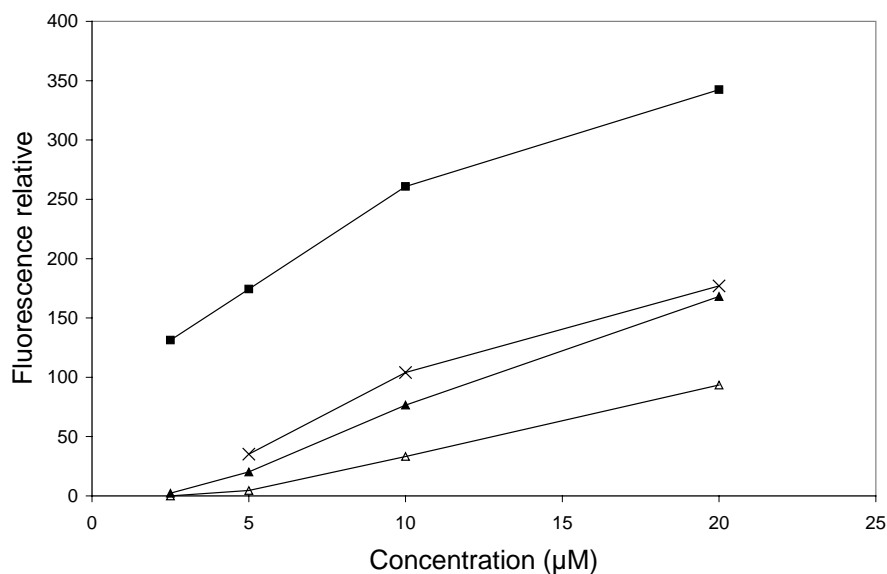


Figure 48 : Fluorescence induite par le peptide de la protéine Ure2 en fonction de la concentration peptidique. Peptide Ure2 en présence de SUV neutres ( $\blacktriangle$ ), SUV chargés ( $\blacksquare$ ), LUV neutres ( $\Delta$ ), LUV chargés ( $\times$ ).

Les expériences de perméabilité membranaire ont été réalisées avec des SUV chargés et le peptide 181-194 dissous dans du TFE, de l'HFP/TFE ou du DMSO. Celles-ci montrent que le peptide oblique de la protéine Ure2 induit un relargage significatif d'HPTS (Figure 49). Pour les concentrations testées, l'effet maximal observé correspond à une concentration de 40 $\mu$ M.



- Résultats -

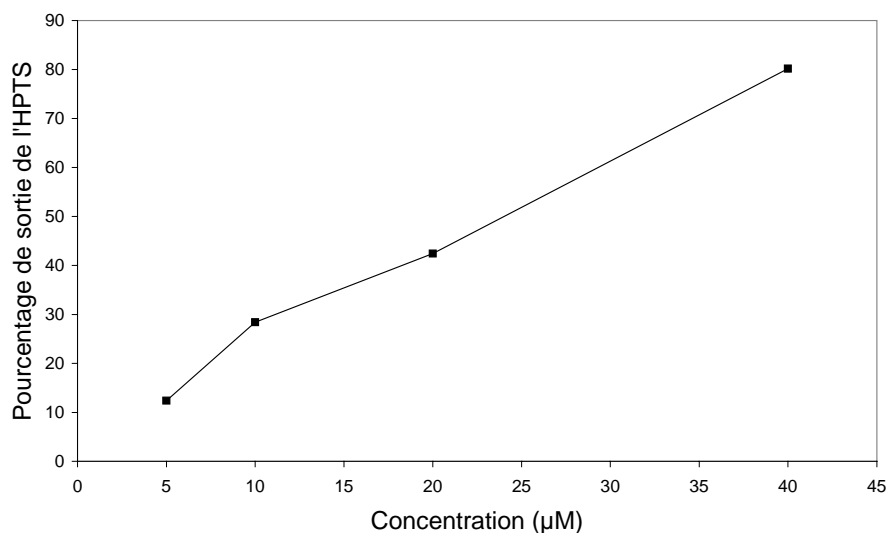


Figure 49 : Perméabilité de SUV neutres induite par le peptide de la protéine Ure2 (■) en fonction de la concentration peptidique.

IV.2.4.2. Mesures de cytotoxicité *in vitro*

Pour des concentrations peptidiques variant entre 10 et 200µM, aucune diminution significative du nombre de cellules actives n'a été détecté avec le peptide 181-194 au cours des mesures de cytotoxicité neuronale (Figure 50).

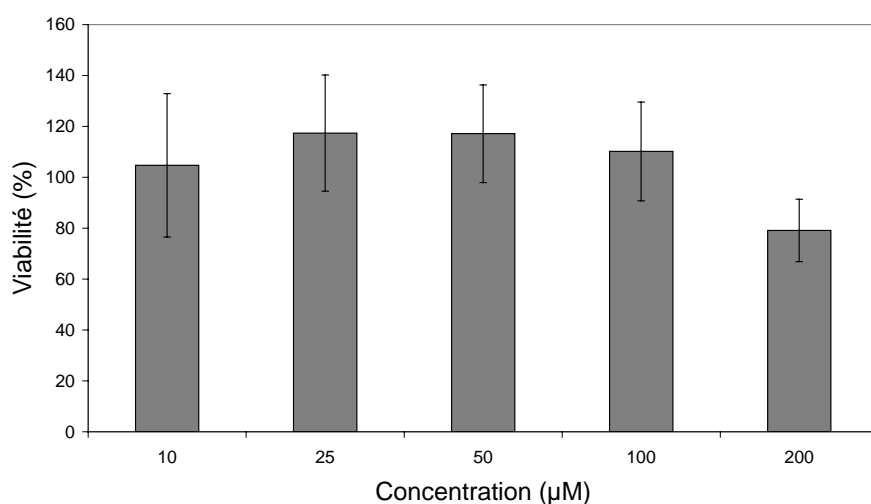


Figure 50 : Cytotoxicité du peptide WT de la protéine Ure2 sur la lignée cellulaire SH-SY5Y.

#### IV.2.4.3. Détermination de la structure secondaire

La structure secondaire du peptide 181-194 de la protéine Ure2 a été évaluée à partir de spectres CD. Ceux-ci montrent que ce peptide subit des modifications structurales significatives (de 7% à 54% d'hélice), lorsqu'il est mis en présence de quantités croissantes de TFE (Tableau XIV). Avec des liposomes, le spectre correspond à une conformation majoritairement en hélice alpha.

*Tableau XIV : Structure secondaire (%) du peptide de la protéine Ure2 déterminée par dichroïsme circulaire*

Echantillon	Hélice $\alpha$	Feuillet $\beta$	Coude	Désordonné
100% TFE	52	13	13	23
50% TFE	54	12	13	22
0% TFE	7	31	23	38
Liposome	42	16	15	27

## IV.2.5. La protéine HET-s

### IV.2.5.1. Analyse de séquence

Le domaine prion de la protéine HET-s correspond au domaine 218-289 ; seule la séquence de ce domaine a été étudiée au cours de cette thèse. La méthode de détection automatique permet de mettre en évidence le domaine oblique 20-44. Le profil de Jähnig fait apparaître deux oscillations différentes pouvant potentiellement correspondre à un peptide oblique, l'une ascendante (20-32) et l'autre descendante (30-44). Avec le graphique HCA, ce domaine apparaît riche en glycines, alanines et résidus hydrophobes (Figure 51).

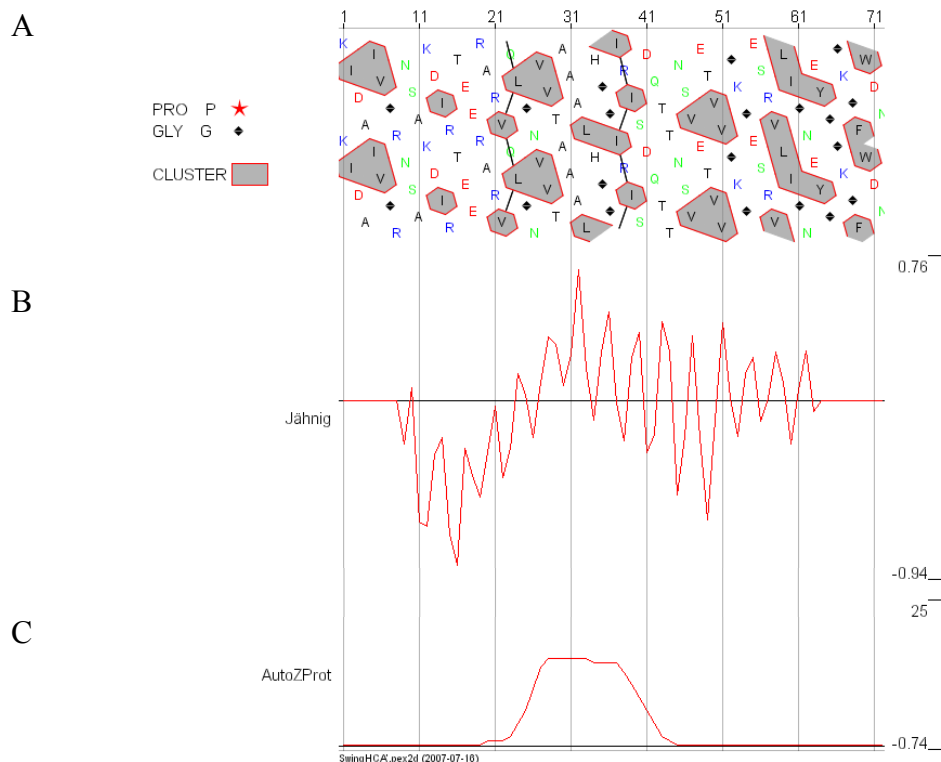


Figure 51 : (A) Graphique HCA de la séquence de l'HET-s. (B) Profil Jähnig de l'HET-s. (C) Prédiction des domaines obliques avec la méthode de détection automatique.

### IV.2.5.2. Modélisation moléculaire des peptides

Les résultats de la méthode de détection automatique figurent au tableau XV. Ces fragments présentent des propriétés des peptides obliques, telles qu'une hydrophobicité élevée, une position du centre de masse proche de l'interface tête polaire/chaînes acylées des

phospholipides et un angle d'insertion membranaire compris entre 30° et 60°. Le peptide 27-40 (244-257) a été choisi parce qu'il combine une hydrophobicité élevée, une taille réduite et qu'il répond aux autres critères des peptides obliques.

Tableau XV : Moyenne d'hydrophobicité et positions des peptides de HET-s issus de la méthode automatique

Localisation dans la séquence	Hydrophobicité moyenne	Pénétration du centre de masse (Å)	Angle d'insertion(°)	Séquence
20-37	0.35	14	51	ARVQLGNVVTTAAALHGGI
23-33	0.46	-14	57	QLGNVVTTAAAL
24-38	0.36	-13	59	LGNVVTTAAALHGGIR
24-39	0.42	11	59	LGNVVTTAAALHGGIRI
24-42	0.25	13	51	LGNVVTTAAALHGGIRISDQ
25-38	0.31	14	56	GNVVTTAAALHGGIR
25-39	0.38	12	56	GNVVTTAAALHGGIRI
25-42	0.21	-14	45	GNVVTTAAALHGGIRISDQ
26-37	0.52	-13	45	NVVTTAAALHGGI
26-38	0.29	14	55	NVVTTAAALHGGIR
26-39	0.37	12	58	NVVTTAAALHGGIRI
26-40	0.33	-13	54	NVVTTAAALHGGIRIS
26-41	0.26	-14	55	NVVTTAAALHGGIRISD
27-40	0.41	13	57	VVTTAAALHGGIRIS
27-41	0.33	14	57	VVTTAAALHGGIRISD
27-42	0.25	-15	53	VVTTAAALHGGIRISDQ
27-43	0.23	15	52	VVTTAAALHGGIRISDQT
27-44	0.22	-15	54	VVTTAAALHGGIRISDQTT
28-40	0.36	-14	53	VTTAAALHGGIRIS
28-41	0.27	15	53	VTTAAALHGGIRISD

La moyenne d'hydrophobicité est calculée en utilisant l'échelle consensus d'Eisenberg. La position du centre de masse est calculée par rapport au centre de la bicouche et l'angle est calculé entre l'axe de l'hélice et la normale à la bicouche.

Les données fournies par la méthode IMPALA permettent de construire deux types de graphiques. Ceux-ci présentent la contrainte ( $E_{TOT}$ ) en fonction de la pénétration du centre de masse (Figures 52A) et la contrainte ( $E_{TOT}$ ) en fonction de l'angle adopté par le peptide (Figures 52B). Ces deux graphiques permettent de visualiser les positions les plus stables du peptide dans la membrane. L'angle d'insertion optimum du peptide 27-40 (57°) montre que celui-ci présente effectivement une orientation oblique par rapport à la bicouche modélisée et la position optimum du centre de masse à 13Å indique que celui-ci pénètre suffisamment dans la membrane pour la déstabiliser (Figures 52). La figure 53 permet de visualiser cette position optimale dans la membrane.

- Résultats -

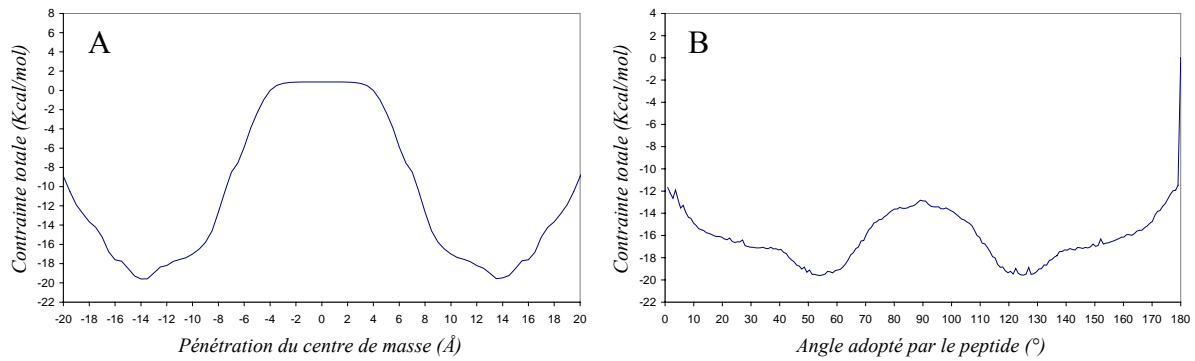
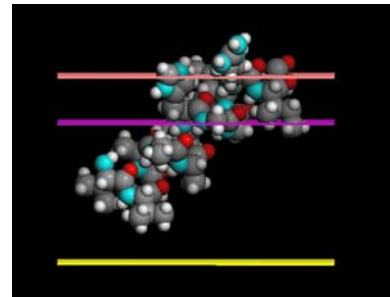


Figure 52 : Graphiques représentant la valeur de la contrainte pour le peptide 244-257 en fonction de la pénétration du centre de masse (A) et de l'angle (B).

Figure 53 : Position optimale du peptide oblique de l'HET-s dans la membrane IMPALA.



#### IV.2.5.3. Mesures de fusion de phase lipidique et perméabilité

Différentes conditions expérimentales ont été testées au cours des mesures de fusion de phase lipidique. Ces conditions sont identiques à celles testées pour l' $\alpha$ -synucléine. La figure 54 montre que le peptide provoque la fusion des phases lipidiques avec des LUV et SUV chargés et avec des SUV neutres d'une façon dépendante de la concentration. Pour les concentrations testées, l'effet observé est maximal à 20 $\mu$ M, ce qui correspond à un rapport molaire peptide/lipide de 0,8 (Figure 54). Cet effet n'est observé que lorsque le peptide est dissous dans du DMSO. Lorsque le peptide en solution est remplacé par du DMSO, aucun effet significatif sur la fluorescence du R18 n'a été observé.

- Résultats -

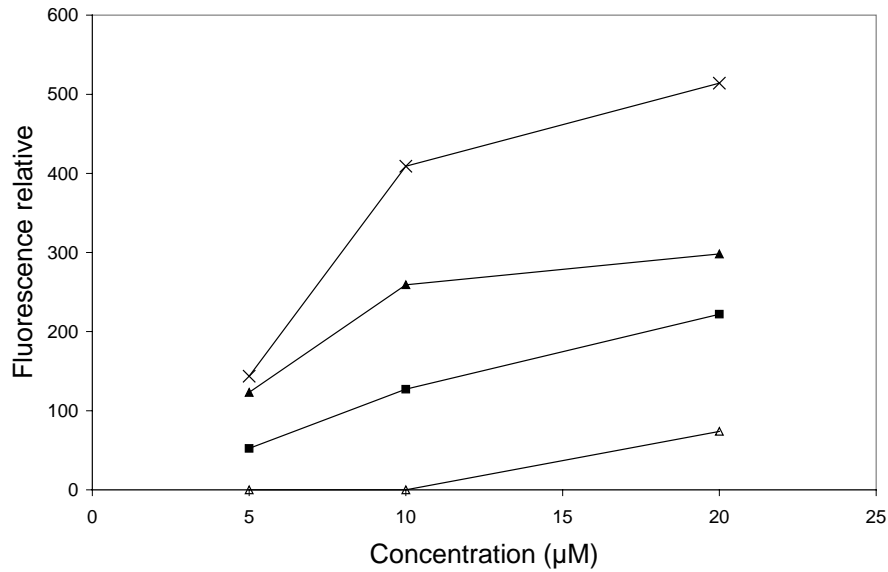


Figure 54 : Fluorescence induite par le peptide oblique de l'HET-s en fonction de la concentration peptidique. Peptide oblique de l'HET-s en présence de SUV neutres (▲), SUV chargés (■), LUV neutres (Δ), LUV chargés (x).

En ce qui concerne la perméabilité membranaire, nos résultats montrent que le peptide oblique de la protéine HET-s induit un relargage significatif d'HPTS lorsqu'il est en présence de SUV chargés (Figure 55). Pour les concentrations testées, l'effet maximal observé correspond à une concentration de 20µM lorsque le peptide est dissous dans du DMSO.

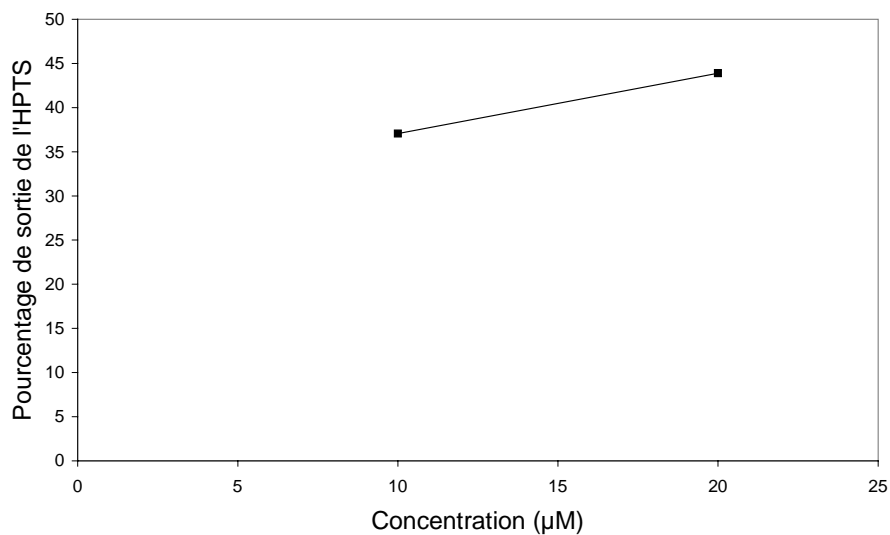


Figure 55 : Perméabilité de SUV neutres induite par le peptide oblique de l'HET-s en fonction de la concentration peptidique.

#### IV.2.5.4. Mesures de cytotoxicité *in vitro*

Les mesures de cytotoxicité neuronale réalisées avec le peptide 244-257 montrent que ce peptide induit une diminution significative du nombre de cellules actives à la concentration testée la plus élevée (200 $\mu$ M) (Figure 56).

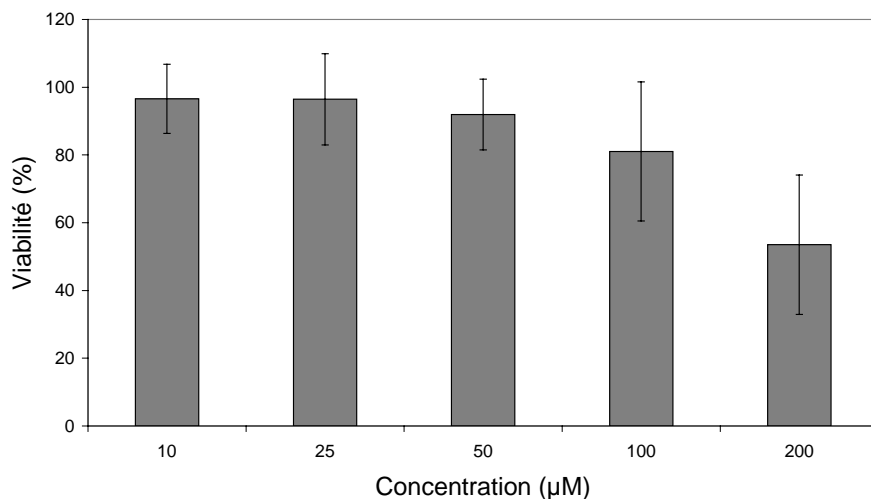


Figure 56 : Cytotoxicité du peptide oblique de l'HET-s sur la lignée cellulaire SH-SY5Y.

#### IV.2.5.5. Détermination de la structure secondaire

Lorsqu'il est mis en présence de quantités croissantes de TFE, les mesures de CD du peptide 244-257 de la protéine HET-s montrent que celui-ci subit des modifications structurelles significatives (de 6% à 43% d'hélice) (Tableau XVI). Lorsque ces peptides sont mis en présence de liposomes, le spectre ne correspond pas à une conformation donnée. Le traitement de ces spectres avec le programme CDPro suggère qu'il serait majoritairement en conformation désordonnée.

Tableau XVI : Structure secondaire (%) du peptide oblique de l'HET-s déterminée par dichroïsme circulaire

Echantillon	Hélice $\alpha$	Feuillet $\beta$	Coude	Désordonné
100% TFE	43	16	17	25
50% TFE	23	23	22	32
0% TFE	6	31	24	40
Liposome	16	27	22	35

## IV.2.6. L'insuline

### IV.2.6.1. Analyse de séquence

Des dépôts amyloïdes contenant des molécules d'insuline intactes ont été rencontrés chez un patient souffrant d'un diabète de type 1 et recevant des injections d'insuline porcine (Jiménez J.L. *et al.*, 2002). Les chaînes A et B de l'insuline porcine ont donc été étudiées. La méthode de détection automatique permet de mettre en évidence le domaine oblique 7-29 dans la chaîne B. Du fait de la petite taille de la chaîne B, le profil de Jähnig ne permet pas de distinguer d'oscillations ascendantes ou descendantes. Cependant, le graphique HCA fait apparaître un amas de forme triangulaire. Ce domaine apparaît riche en résidus hydrophobes (Figure 57).

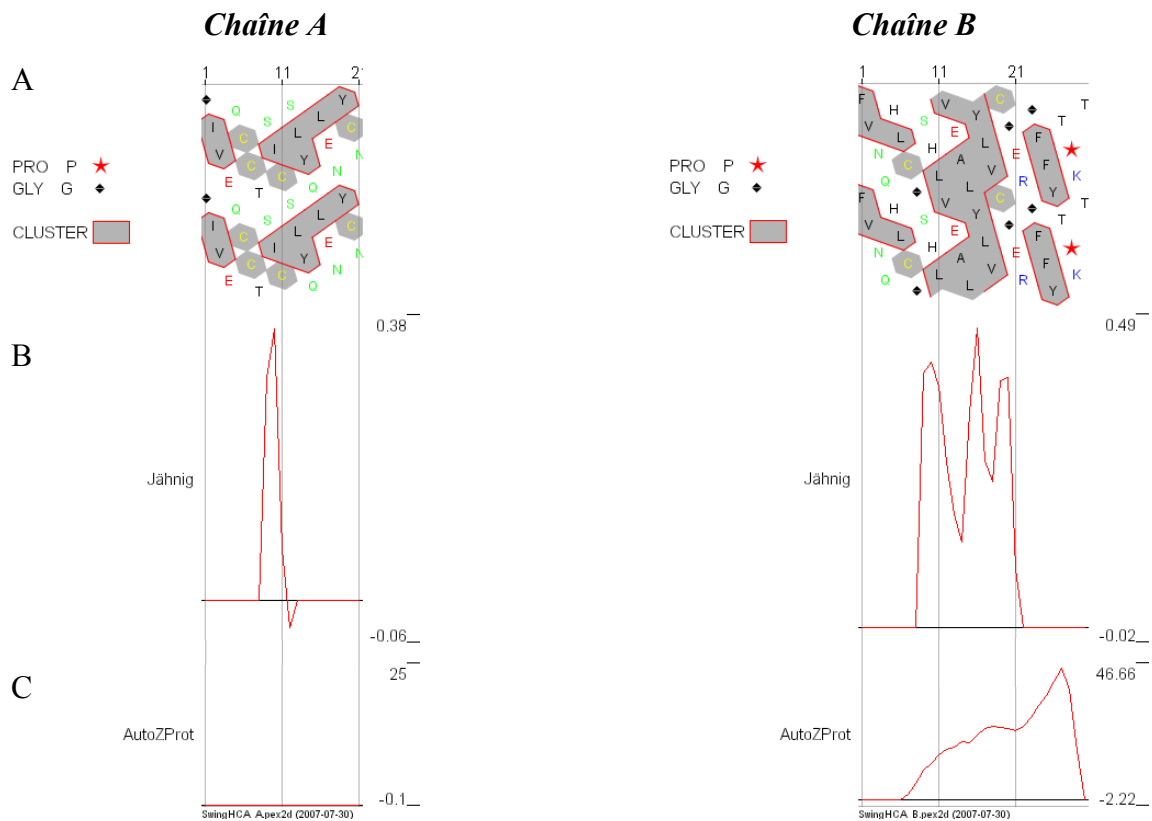


Figure 57 : (A) Graphique HCA de la séquence de l'insuline. (B) Profil Jähnig de l'insuline. (C) Prédiction des domaines obliques avec la méthode de détection automatique. Les graphiques correspondant aux chaînes A et B de l'insuline se trouvent respectivement à gauche et à droite.



IV.2.6.2. Modélisation moléculaire des peptides

Le tableau XVII présente les fragments de l'insuline qui possèdent les propriétés des peptides obliques. Ces fragments ont été sélectionnés par la méthode de détection automatique car ils présentent une hydrophobicité supérieure à 0,2, une position du centre de masse comprise entre 8 et 15Å et un angle d'insertion dans la membrane compris entre 30° et 60°. Le peptide 9-19 a été choisi pour une étude plus approfondie parce qu'il combine une hydrophobicité élevée, une taille réduite et qu'il répond aux autres critères des peptides obliques.

Tableau XVII : Moyenne d'hydrophobicité et positions des peptides issus de la méthode automatique pour les fragments de l'insuline

<i>Localisation dans la séquence</i>	<i>Hydrophobicité moyenne</i>	<i>Pénétration du centre de masse (Å)</i>	<i>Angle d'insertion(°)</i>	<i>Séquence</i>
7-18	0.49	-13	55	CGSHLVEALYLV
8-18	0.50	-13	50	GSHLVEALYLV
8-19	0.49	-13	37	GSHLVEALYLVC
8-20	0.49	-12	37	GSHLVEALYLVCG
9-19	0.49	-13	37	SHLVEALYLVC
9-20	0.49	-12	37	SHLVEALYLVCG
9-25	0.32	-9	43	SHLVEALYLVCGERGF
9-26	0.32	-8	42	SHLVEALYLVCGERGFY
10-20	0.55	-11	32	HLVEALYLVCG
10-27	0.33	-10	54	HLVEALYLVCGERGFY
10-28	0.31	-10	54	HLVEALYLVCGERGFYTP
11-21	0.52	-15	57	LVEALYLVCGE
11-27	0.37	-11	55	LVEALYLVCGERGFY
11-28	0.35	-11	56	LVEALYLVCGERGFYTP
11-29	0.26	-11	57	LVEALYLVCGERGFYTPK
12-27	0.32	-11	57	VEALYLVCGERGFY
12-28	0.31	-11	58	VEALYLVCGERGFYTP
12-29	0.21	-12	59	VEALYLVCGERGFYTPK
13-24	0.22	-13	59	EALYLVCGERGF
13-28	0.26	-12	55	EALYLVCGERGFYTP
14-27	0.34	-12	48	ALYLVCGERGFY
14-28	0.33	-12	56	ALYLVCGERGFYTP
14-29	0.21	-13	55	ALYLVCGERGFYTPK
16-26	0.28	-12	60	YLVCGERGFY
16-27	0.26	-12	57	YLVCGERGFY
16-28	0.25	-12	59	YLVCGERGFYTP
17-27	0.26	-13	42	LVCGERGFY
17-28	0.25	-13	56	LVCGERGFYTP

Comme présenté aux figures 58A et B, la position la plus stable du peptide 9-19 dans la membrane correspond à un angle d'insertion de 37° et une position du centre de masse de - 13Å. Ces valeurs montrent que celui-ci présente effectivement une orientation oblique par rapport à la bicouche modélisée et qu'il pénètre suffisamment dans la membrane pour la

déstabiliser (Figures 58). La figure 59 permet de visualiser la position optimale du peptide 9-19 dans la membrane.

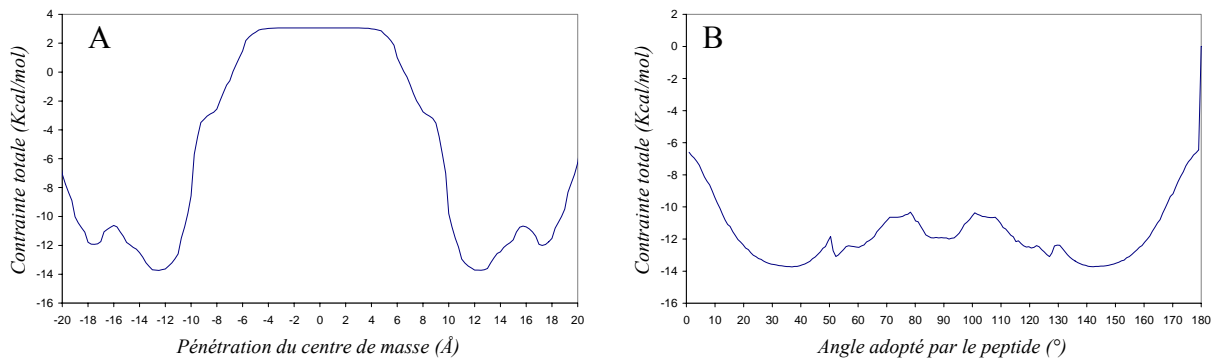
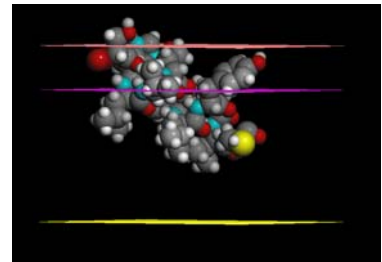


Figure 58 : Graphiques représentant la valeur de la contrainte pour le peptide 9-19 en fonction de la pénétration du centre de masse (A) et de l'angle (B).

Figure 59 : Position optimale du peptide 9-19 de l'insuline dans la membrane IMPALA.



#### IV.2.6.3. Mesures de fusion de phase lipidique

En ce qui concerne les mesures de fusion de phase lipidique, la figure 60 montre que le peptide n'induit pas de fusion de phase lipidique quel que soit le type de liposome (Figure 60). Les différentes conditions expérimentales ayant été testées restent identiques à celles utilisées pour l' $\alpha$ -synucléine.

- Résultats -

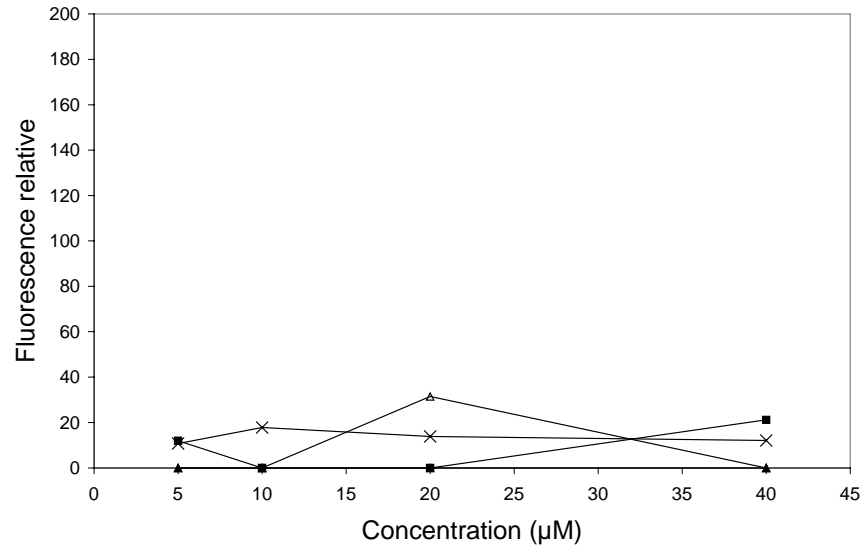


Figure 60 : Fluorescence induite par le peptide de l'insuline dissous dans du TFE en fonction de la concentration peptidique. Peptide de l'insuline en présence de SUV neutres (▲), SUV chargés (■), LUV neutres (Δ), LUV chargés (×).

## IV.2.7. La transthyretine

### IV.2.7.1. Analyse de séquence

La transthyretine est responsable de plusieurs amyloïdoses systémiques et forme des fibrilles amyloïdes à partir de la protéine entière, mutée ou non. La méthode de détection automatique permet de mettre en évidence les domaines obliques 8-22 et 77-93. Le profil de Jähnig et le graphique HCA de la deuxième zone ne permettent pas de considérer qu'elle contient un peptide oblique. En ce qui concerne la première zone, le graphique HCA fait apparaître un amas hydrophobe de forme triangulaire et le profil de Jähnig montre deux oscillations, l'une descendante et l'autre ascendante. Ces informations indiquent la présence d'un peptide oblique potentiel (Figure 61).

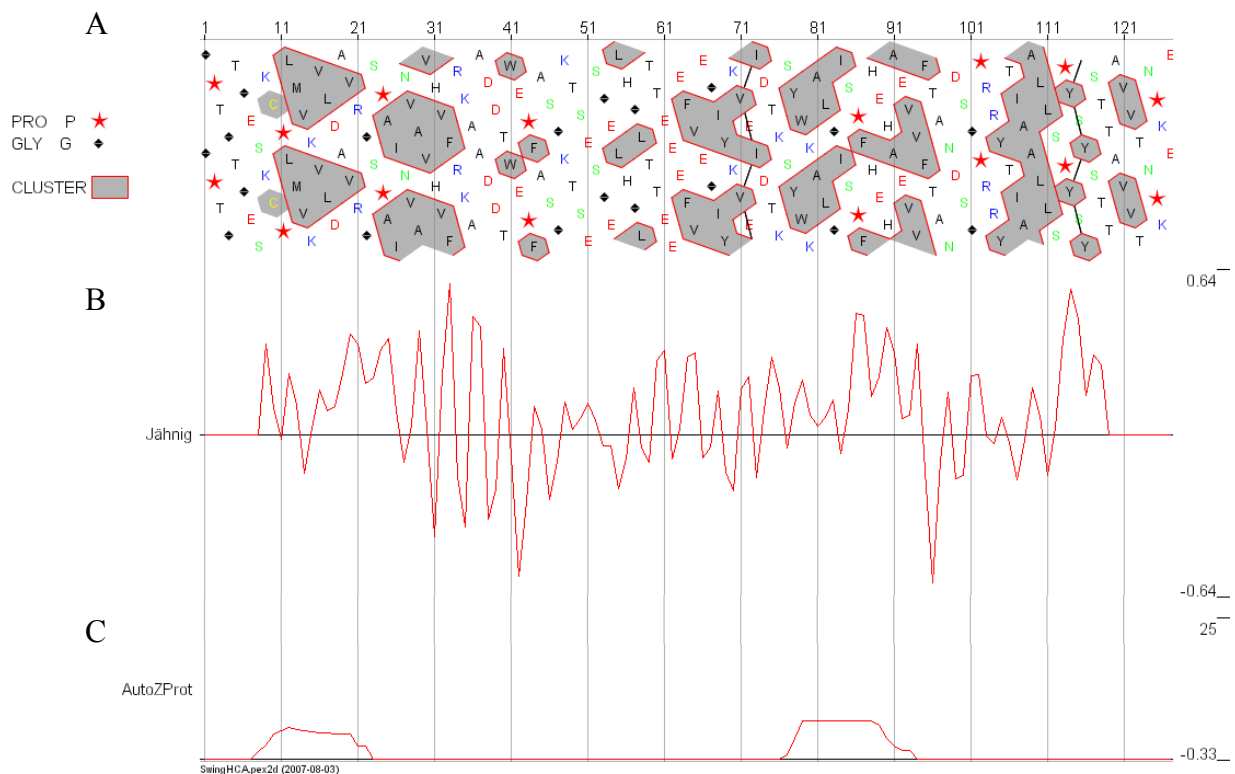


Figure 61 : (A) Graphique HCA de la séquence de la transthyretine. (B) Profil Jähnig de la transthyretine. (C) Prédiction des domaines obliques avec la méthode de détection automatique.

#### IV.2.7.2. Modélisation moléculaire des peptides

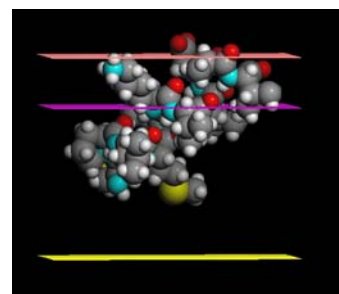
La méthode de détection automatique a sélectionné les fragments de la transthyretine qui figurent au tableau XVIII parce qu'ils présentent les propriétés des peptides obliques. Parmi ceux-ci, le peptide 10-20 a été choisi comme peptide oblique optimum car il possède une hydrophobicité moyenne de 0,43, une taille de 11 résidus, un angle d'insertion de 49° et une position du centre de masse à 12Å.

*Tableau XVIII : Moyenne d'hydrophobicité et position des peptides issus de la méthode automatique pour les fragments de la transthyretine présentant des propriétés obliques*

<i>Localisation dans la séquence</i>	<i>Hydrophobicité moyenne</i>	<i>Pénétration du centre de masse (Å)</i>	<i>Angle d'insertion(°)</i>	<i>Séquence</i>
8-20	0.24	-11	37	SKCPLMVKVLDAV
9-20	0.27	-12	50	KCPLMVKVLDAV
10-20	0.43	-12	49	CPLMVKVLDAV
10-22	0.21	-14	44	CPLMVKVLDAVRG
11-22	0.21	-14	42	PLMVKVLDAVRG
12-22	0.21	-14	44	LMVKVLDAVRG
77-89	0.23	-14	31	SYWKALGISPFHE
78-88	0.36	-12	31	YWKALGISPFH
78-89	0.26	-13	35	YWKALGISPFHE
78-90	0.21	-13	51	YWKALGISPFHEH
78-93	0.23	-14	51	YWKALGISPFHEHAEV
79-89	0.26	-14	50	WKALGISPFHE
79-90	0.21	-13	55	WKALGISPFHEH
79-91	0.24	-14	53	WKALGISPFHEHA
79-93	0.23	-15	54	WKALGISPFHEHAEV

Les graphiques 63A et B permettent de visualiser les positions préférées du peptide 10-20 dans la membrane. L'angle d'insertion optimum du peptide à 49° montre que celui-ci présente effectivement une orientation oblique par rapport à la bicouche modélisée et la position optimum du centre de masse à -12Å indique que celui-ci pénètre suffisamment dans la membrane pour la déstabiliser (Figures 63). La figure 62 permet de visualiser cette position optimale dans la membrane.

*Figure 62 : Position optimale du peptide de la transthyretine dans la membrane IMPALA.*



- Résultats -

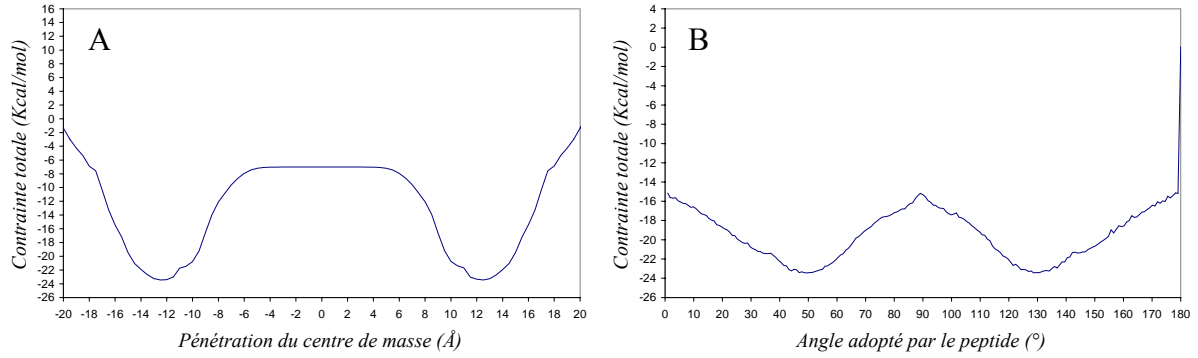


Figure 63 : Graphiques représentant la valeur de la contrainte pour le peptide 10-20 de la transthyretine en fonction de la pénétration du centre de masse (A) et de l'angle (B).

#### IV.2.7.3. Mesures de fusion de phase lipidique

La figure 64 montre que le peptide n'induit pas de fusion de phase lipidique quel que soit le type de liposome testé (Figure 64). Différentes conditions expérimentales ont été testées au cours des mesures de fusion de phase lipidique. Le peptide a été dissous dans du TFE, de l'HFP/TFE ou du DMSO, et des liposomes de petite (SUV) et de grande taille (LUV) composés de lipides portant une charge globale neutre (PC, PE, SM, CHOL) ou comportant des lipides acides (PC, PE, PI, PS, SM, CHOL) ont été utilisés, comme pour le peptide de l' $\alpha$ -synucléine.

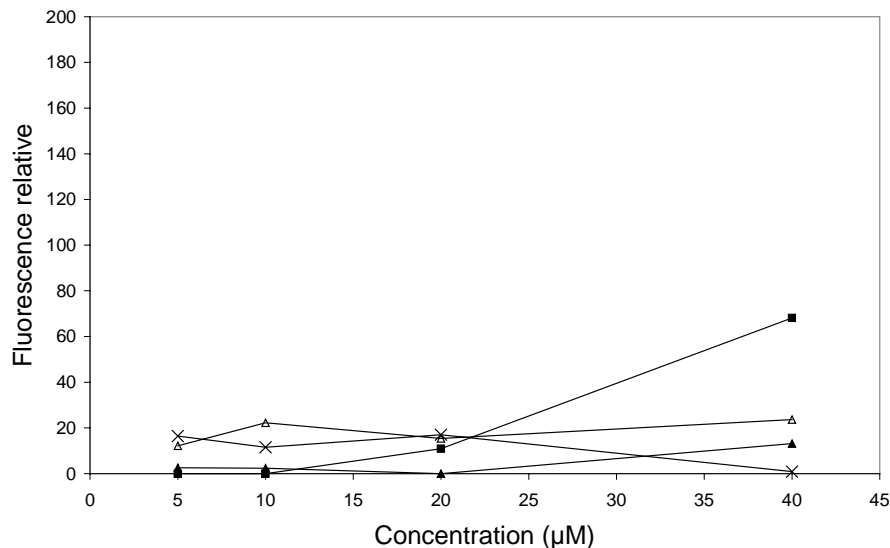


Figure 64 : Fluorescence induite par le peptide de la transthyretine dissous dans du TFE comme une fonction de la concentration peptidique. Peptide de la transthyretine en présence de SUV neutres (▲), SUV chargés (■), LUV neutres (Δ), LUV chargés (×).

## IV.2.8. La protéine HypF

### IV.2.8.1. Analyse de séquence

Le domaine N-terminal de l'HypF (1-91) est capable de former des fibrilles amyloïdes *in vitro*. La méthode de détection automatique met en évidence le domaine oblique 16-31. Le profil de Jähnig fait apparaître une oscillation ascendante pouvant potentiellement correspondre à un peptide oblique et le graphique HCA, un amas hydrophobe de forme triangulaire (Figure 65).

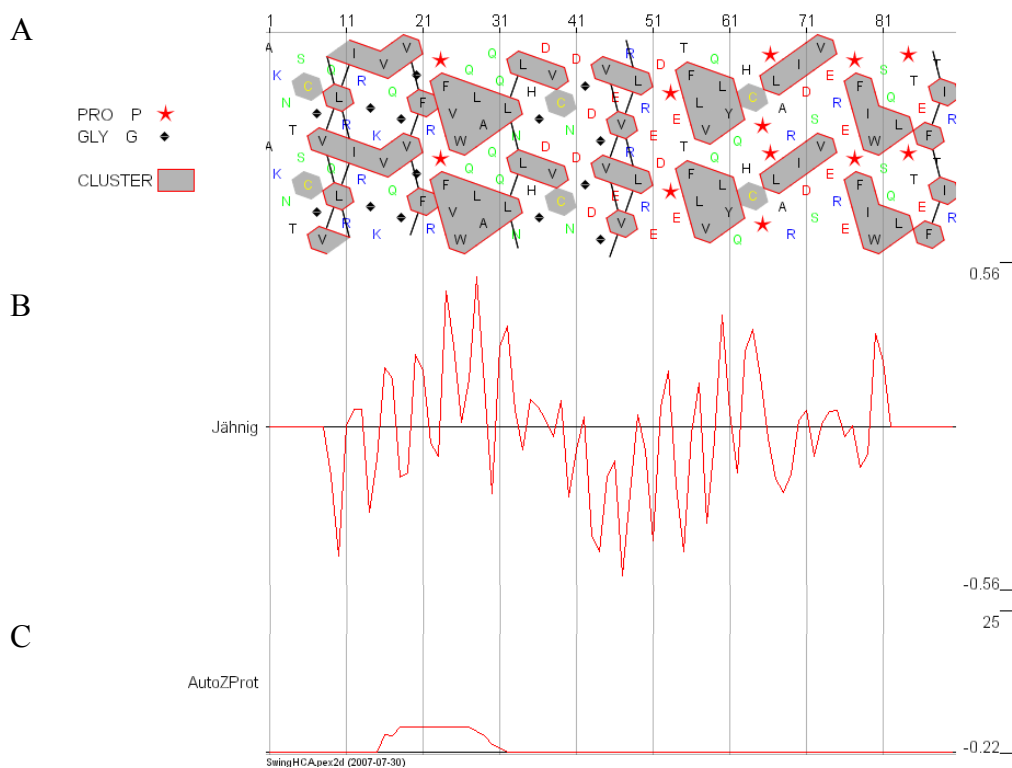


Figure 65 : (A) Graphique HCA de la séquence de la protéine HypF. (B) Profil Jähnig de la protéine HypF. (C) Prédiction des domaines obliques avec la méthode de détection automatique.

### IV.2.8.2. Modélisation moléculaire des peptides

Les résultats de la méthode de détection automatique montrent les fragments de la protéine HypF qui présentent les propriétés des peptides obliques (Tableau XIX). Le peptide 18-28 a été choisi parce qu'il combine une hydrophobicité élevée, une taille réduite et qu'il

répond aux autres critères des peptides obliques (angle d'insertion de 57° et position du centre de masse à 15Å).

Tableau XIX : Moyenne d'hydrophobicité et positions des peptides issues de la méthode automatique pour les fragments de la région de la protéine HypF présentant des propriétés obliques

Localisation dans la séquence	Hydrophobicité moyenne	Pénétration du centre de masse (Å)	Angle d'insertion(°)	Séquence
16-27	0.28	-14	42	VQGVGFRPFVWQ
16-29	0.37	14	60	VQGVGFRPFVWQLA
16-30	0.28	-14	54	VQGVGFRPFVWQLAQ
16-31	0.21	15	55	VQGVGFRPFVWQLAQQ
18-28	0.39	15	57	GVGFRPFVWQL
18-29	0.41	-15	59	GVGFRPFVWQLA

Comme présenté aux figures 66A et B, la position optimale du peptide 18-28 dans la membrane correspond à un angle d'insertion de 57° et une position du centre de masse de 15Å. Ces valeurs montrent que celui-ci présente effectivement une orientation oblique par rapport à la bicouche modélisée et qu'il pénètre suffisamment dans la membrane pour la déstabiliser (Figures 66). La figure 67 permet de visualiser la position optimale du peptide 18-28 dans la membrane.

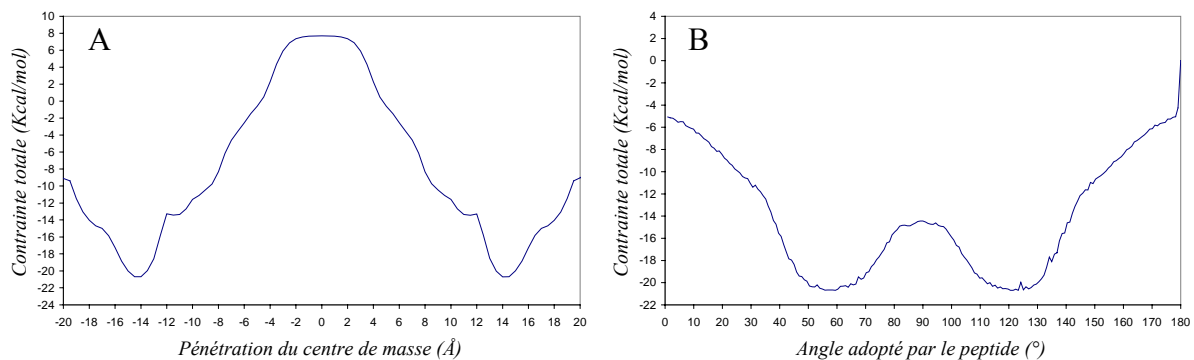
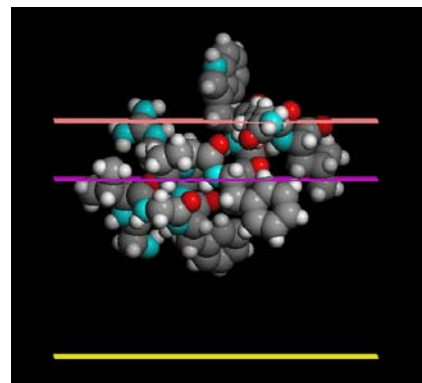


Figure 66 : Graphiques représentant la valeur de la contrainte pour le peptide 18-28 de la protéine HypF en fonction de la pénétration du centre de masse (A) et de l'angle (B).



Figure 67 : Position optimale du peptide de la protéine HypF dans la bicouche IMPALA.



#### IV.2.8.3. Mesures de fusion de phase lipidique

Les mesures de fusion montrent que le peptide ne cause pas de fusion de phase lipidique quel que soit le type de liposome testé (Figure 68). Les différentes conditions expérimentales testées sont les mêmes que celles testées pour l' $\alpha$ -synucléine.

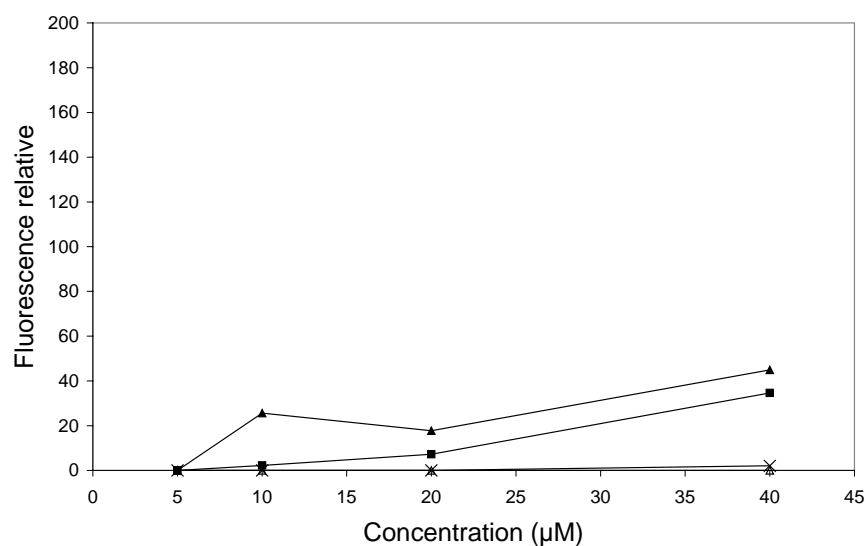


Figure 68 : Fluorescence induite par le peptide de la protéine HypF dissous dans du DMSO comme une fonction de la concentration peptidique. Peptide de la protéine HypF en présence de SUV neutres (▲), SUV chargés (■), LUV neutres (Δ), LUV chargés (×).



# **DISCUSSION**



## V. Discussion

L'existence des peptides obliques a initialement été prédite par des approches de modélisation moléculaire (Horth M. *et al.*, 1991 ; Brasseur R. *et al.*, 1988 ; Vonèche V. *et al.*, 1992) puis confirmée ultérieurement par diverses techniques expérimentales telles que la spectroscopie ATR-FTIR, la RMN, l'EPR ou la diffraction de neutrons (Martin I. *et al.*, 1994 ; Bradshaw J.P. *et al.*, 2000 ; Han X. *et al.*, 2001). En conformation hélicoïdale, les propriétés de ces peptides leur permet d'adopter une orientation oblique aux interfaces hydrophile/hydrophobe. Cette orientation particulière leur confère des propriétés déstabilisatrices vis-à-vis des bicouches lipidiques, qui sont reliées à la fonction de diverses protéines telles que des lipases (Pérez-Méndez O. *et al.*, 1998), des apolipoprotéines (Lambert G. *et al.*, 1998) ou des glycoprotéines d'enveloppe de virus (Horth M. *et al.*, 1991). Depuis que ce type de structure a été détecté par modélisation moléculaire au sein du peptide A $\beta$  et de la protéine PrP (Pillot T *et al.*, 1996 ; Pillot T. *et al.*, 1997), deux protéines impliquées dans des maladies neurodégénératives, la question se pose quant à la généralisation de la présence de tels fragments au sein des protéines amyloïdogéniques et de leur(s) rôle(s). L'équipe du Professeur Brasseur a émis l'hypothèse selon laquelle les peptides obliques pourraient être impliqués dans l'effet cytotoxique et/ou dans les processus de transconformation des protéines amyloïdogéniques. Pour ce dernier point, le peptide oblique d'une protéine pourrait soit s'insérer à l'interface cœur hydrophobe/enveloppe hydrophile d'une autre protéine et déstabiliser sa conformation native, induisant ainsi des phénomènes de transconformation caractéristiques de ces protéines ; soit passer d'une conformation  $\alpha$  (ou random-coil) à une conformation  $\beta$ , suite à des modifications de son environnement, de par sa labilité structurale propre. Cette transconformation entraînerait le changement de conformation de toute la protéine.

### V.1. *La méthode de détection automatique des peptides obliques*

Le but de ce travail était de mettre en évidence, par des méthodes de modélisation moléculaire, des peptides obliques dans d'autres protéines amyloïdogéniques que le peptide A $\beta$  ou la protéine PrP. A cette fin, une méthodologie particulière a été mise en place pour étudier la séquence d'un grand nombre de protéines, incluant l'élaboration d'une méthode de

détection automatique des peptides obliques. Celle-ci repose sur la méthode IMPALA et les propriétés intrinsèques des peptides obliques telles que l'hydrophobicité moyenne ou le nombre de prolines. Cette approche constitue une étape importante pour la reconnaissance des peptides obliques et leur recherche. Une méthode automatique avait déjà permis de déterminer l'occurrence des peptides obliques dans les protéines en général et les protéines interagissant avec la membrane en particulier (Rahman M. *et al.*, 1997). La méthode mise au point durant la présente thèse permet d'analyser un plus grand nombre de protéines que la méthode généralement utilisée, et les propriétés membranaires des peptides sont étudiées de manière plus fine. En effet, IMPALA prédit le comportement membranaire vis-à-vis d'une bicouche tandis que la première approche ne fournissait que l'orientation à une interface pho/phi simple. Notre méthode est exhaustive et fournit des résultats qui seront interprétables au niveau de la protéine entière. Elle présente également d'autres avantages, au point de vue du temps gagné par l'utilisateur et de la facilité d'analyse. En effet, HCA et Jähnig sont des méthodes efficaces mais qui reposent grandement sur l'expérience de l'utilisateur. Les résultats obtenus suggèrent cependant que la base de données relative aux peptides obliques n'est pas suffisamment étoffée pour obtenir une corrélation nette entre les résultats expérimentaux et les prédictions. La méthode retrouve les peptides obliques connus avec un taux de réussite proche de 100% mais des domaines supplémentaires sont également détectés. Ces domaines sont soit de faux positifs, soit des peptides obliques non encore mis en évidence expérimentalement. Une analyse totalement automatique n'est donc pas réalisable dans l'état actuel des choses. La méthode conserve néanmoins toute sa valeur au point de vue qualitatif dans la détection préliminaire des peptides obliques.

## **V.2. Analyse des protéines amyloïdogéniques**

Les protéines amyloïdogéniques constituent une famille de protéines dont l'étude est essentielle à la compréhension des phénomènes de transconformation. Ces protéines ont cette caractéristique commune de subir une modification de leur conformation native conduisant à la formation de fibrilles structurées essentiellement en  $\beta$ . De plus, nombre de ces protéines sont associées à des maladies et présentent une cytotoxicité sous forme fibrillaire ou préfibrillaire. Récemment, notre laboratoire a mis en évidence des peptides obliques dans des protéines de ce type. Il s'agit de la protéine PrP, du peptide  $\beta$  amyloïde, des prions de levure Ure2p et Sup35p (Pillot T. *et al.*, 1996 ; Pillot T. *et al.*, 1997 ; Nickmans A., 1999) et de

l'apolipoprotéine AII (Lambert G. *et al.*, 1998). A l'issue du présent travail, 22 peptides obliques, appartenant à 18 protéines différentes, ont été mis en évidence parmi l'ensemble de 53 protéines amyloïdogéniques étudiées et 7 de ceux-ci ont été testés expérimentalement. Ce travail porte à un tiers le nombre de protéines amyloïdogéniques contenant un peptide oblique. Ce constat suggère que des peptides obliques joueraient un rôle au sein de certaines protéines amyloïdogéniques.

La structure secondaire adoptée ou prédite pour les domaines obliques n'a pas été prise en considération dans la méthode de détection automatique. Nous postulons que les peptides obliques doivent être en conformation hélicoïdale pour être actifs (Brasseur R., 2000). Cependant, certains de ces peptides obliques pourraient se retrouver à l'état latent, c'est-à-dire non actifs, dans les protéines. Dans le cas particulier des protéines amyloïdogéniques, les domaines amyloïdes de ces protéines se déplient généralement pour passer par un ou plusieurs états conformationnels intermédiaires avant d'adopter la structure  $\beta$  définitive. Il a été montré dans plusieurs cas qu'un intermédiaire  $\alpha$  était formé au cours de l'amyloïdogénèse (Kirkitaдзе M.D. *et al.*, 2001 ; Olofsson A. *et al.*, 2007), ce qui permettrait au peptide oblique d'exprimer son activité déstabilisatrice vis-à-vis des membranes. Les mesures de dichroïsme circulaire réalisées sur les différents peptides obliques suggèrent une labilité structurale en fonction de l'environnement pour ces fragments. En solution, les peptides étudiés adoptent plutôt une structure désordonnée et en présence de TFE, une structure en hélice  $\alpha$ . En ce qui concerne les mesures réalisées en présence de liposomes, les résultats obtenus montrent que les peptides ont tendance à adopter leurs structures secondaires natives. La structure  $\alpha$  qu'adopteraient les peptides obliques au sein des membranes correspondrait donc à un état transitoire du peptide.

### V.3. *L' $\alpha$ -synucléine*

En ce qui concerne l' $\alpha$ -synucléine, la protéine principalement impliquée dans la maladie de Parkinson, El-Agnaf *et al.* ont montré que la région centrale de l' $\alpha$ -synucléine présente une similarité de séquence avec des régions cruciales pour l'agrégation et la toxicité d'autres protéines amyloïdogéniques telles que la protéine PrP, le peptide  $\beta$  amyloïde et l'IAPP (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  $\beta$  amyloïde, aux peptides obliques mis en évidence (Pillot T. *et al.*, 1996 ; Pillot T. *et al.*, 1997).

L'analyse de séquence révèle que le domaine 1-89 de l' $\alpha$ -synucléine correspond à un domaine amphipathique, ce qui est à mettre en relation avec la structure de l' $\alpha$ -synucléine en présence de micelles, résolue par RMN et qui montre que l' $\alpha$ -synucléine forme deux hélices  $\alpha$  antiparallèles (helice-N 3-37; helice-C 45-92) (Ulmer T.S. *et al.*, 2005). Sur le graphique de Jähnig, une augmentation de l'hydrophobicité dans la région 51-89 de l' $\alpha$ -synucléine a également été observée, avec des oscillations restant régulières. Au sein de ce domaine, la région 63-82, riche en glycine, alanine et valine, possède la composition en acides aminés caractéristique des peptides obliques (Lins L. *et al.*, 2001), ce qui est en accord avec l'étude de Du *et al.*, soulignant l'importance de la composition en acides aminés de cette région (Du H.N. *et al.*, 2003). Les simulations IMPALA prédisent que le peptide 67-78 est capable de s'insérer obliquement au sein d'une membrane modèle. Elles montrent également que le peptide peut adopter plusieurs positions métastables et avoir accès à un large espace au sein de la membrane. Les calculs de stochastique et de dynamique montrent que lorsque le peptide est considéré comme une molécule isolée dans un environnement hydrophobe, la conformation hélicoïdale apparaît stable.

Expérimentalement, le peptide 67-78 WT de l' $\alpha$ -synucléine induit de la fusion lipidique et altère la perméabilité des liposomes comme prédit par l'approche *in silico*. La fusion a été observée pour différents types de liposomes et est plus importante pour des SUV non chargés. C'est en apparence contradiction avec les résultats de Davidson *et al.* qui montrent que l' $\alpha$ -synucléine entière interagit préférentiellement avec de petites vésicules chargées (Davidson W.S. *et al.*, 1998). Cette différence pourrait être due au fait que le domaine N-terminal de l' $\alpha$ -synucléine contient des résidus chargés positivement qui ne sont pas présents au sein du peptide 67-78. Ce peptide est toutefois moins fusogène que le peptide oblique du SIV puisque pour un taux de fusion similaire, le peptide du SIV se trouve à un rapport peptide/lipide de 0,05. Cette différence a déjà été observée pour d'autres peptides obliques (Ebola (Adam B., 2002), Apo C-III (Lins L. *et al.*, 2002)) et pourrait résulter de l'hydrophobicité moyenne moindre du peptide de l' $\alpha$ -synucléine (0,6 comparé à 0,9), et donc d'une affinité pour les lipides moins marquée. D'autre part, cela pourrait provenir de la tendance du peptide de l' $\alpha$ -synucléine à s'agréger.

Il a précédemment été montré pour d'autres peptides obliques, tels le domaine N-terminal de la protéine gp32 de SIV, que le gradient d'hydrophobicité est responsable de la déstabilisation lipidique (Martin I. *et al.*, 1994). Pour tester l'importance de la distribution des résidus hydrophobes, des mutants ont été définis par modélisation moléculaire, dont un a été étudié expérimentalement. Les résultats obtenus avec le peptide mutant SynuM53 suggèrent



que la déstabilisation lipidique est liée au gradient d'hydrophobicité, puisque ce dernier n'induit pas de déstabilisation lipidique significative. La distribution d'hydrophobicité apparaît également avoir un rôle dans la toxicité cellulaire. En effet, le fragment peptidique de l' $\alpha$ -synucléine est neurotoxique, il induit la mort de cellules de neuroblastomes, alors que le mutant non oblique ne l'est pas.

Comment les propriétés obliques du fragment 67-78 de l' $\alpha$ -synucléine pourraient être reliées à la toxicité de l' $\alpha$ -synucléine ? Premièrement, lorsque cette zone de la protéine entière interagit avec la membrane cellulaire neuronale, elle pourrait conduire à la mort cellulaire aussi bien par perturbation directe de l'organisation de la membrane, qu'en facilitant la formation d'un pore. En effet, nous avons très récemment suggéré que les peptides obliques pourraient aider la formation de pores (Lins L. *et al.*, 2007). Plusieurs études ont proposé que des oligomères solubles pourraient être l'espèce pathogène plutôt que les fibrilles matures (Conway K.A. *et al.*, 2000 ; Goldberg M.S. *et al.*, 2000). En effet, il a été montré que deux mutations de l' $\alpha$ -synucléine causant des formes précoces de la maladie de Parkinson accélèrent l'oligomérisation plutôt que la fibrillation (Conway K.A. *et al.*, 2000). Plusieurs études ont montré que des protofibrilles pourraient former des pores et induire une perméabilisation des vésicules (Lashuel H.A. *et al.*, 2002 ; Volles M.J. *et al.*, 2002 ; Pountney D.L. *et al.*, 2004). Cela a également été suggéré pour la protéine PrP et le peptide A $\beta$  qui contiennent également un peptide oblique (Lashuel H.A. *et al.*, 2002 ; Lins L. *et al.*, 2001 ; Quist A. *et al.*, 2005 ; Lin H. *et al.*, 2001). Bien que les protofibrilles soient principalement structurées en  $\beta$ , on observe un certain taux d'hélicité (Volles M.J. *et al.*, 2002 ; Apetri M.M. *et al.*, 2006). Le peptide oblique de l' $\alpha$ -synucléine pourrait initier la déstabilisation de la membrane sous une conformation hélicoïdale transitoire, permettant l'insertion et la formation du pore, de la même façon qu'un intermédiaire hélicoïdal est formé durant la fibrillogénèse du peptide  $\beta$  amyloïde (Kirkitadze M.D. *et al.*, 2001).

D'autre part, la prédisposition à former des fibrilles peut être liée à la position du fragment 67-78 dans l' $\alpha$ -synucléine. Il se trouve dans la région de la protéine qui initierait la transconformation. En effet, la région centrale de l' $\alpha$ -synucléine apparaît importante pour la transconformation et la neurotoxicité, en formant le corps des fibrilles (Miake H. *et al.*, 2002 ; Del Mar C. *et al.*, 2005). Des troncations dans le domaine C-terminal de l' $\alpha$ -synucléine induisent une agrégation plus rapide de la protéine (Crowther R.A. *et al.*, 1998). El-Agnaf *et al.* ont déterminé, à partir d'une recherche systématique des propriétés d'agrégation et de toxicité des fragments de l' $\alpha$ -synucléine, que le peptide 68-78 est le plus court fragment conservant les propriétés d'agrégation et de toxicité (El-Agnaf O.M.A. *et al.*, 2002). De plus,

Giasson B.I. *et al.* ont proposé qu'un motif de douze acides aminés (71-82) du domaine hydrophobe de l' $\alpha$ -synucléine serait nécessaire et suffisant pour sa fibrillation. En effet, la  $\beta$ -synucléine, qui est très homologue à l' $\alpha$ -synucléine, ne possède pas ce motif et ne forme pas de fibrilles. L'introduction d'un résidu chargé dans ce motif diminue le taux de polymérisation et une délétion empêche la formation de polymères (Giasson B.I. *et al.*, 2001). Ce polypeptide peut polymériser seul et accentue la fibrillation de l' $\alpha$ -synucléine (Giasson B.I. *et al.*, 2001). Enfin, Lee *et al.* ont également montré que, sous sa forme hélicoïdale, l' $\alpha$ -synucléine a une propension plus grande à s'agrèger que la forme cytosolique non structurée (Lee H.J. *et al.*, 2002). Toutes ces informations contribuent à montrer l'importance de cette région de l' $\alpha$ -synucléine dans le phénomène de transconformation. Etant donné la présence d'un peptide oblique dans ce domaine, cela renforce l'idée que les peptides obliques pourraient être impliqués dans le processus de transconformation. Il est important de noter que les peptides obliques sont structurellement labiles (Martin I. *et al.*, 1994 ; Charlotiaux B. *et al.*, 2006 ; Lorin L. *et al.*, 2006). L' $\alpha$ -synucléine montre cette labilité, étant désordonnée en solution ; son domaine N-terminal est hélicoïdal en présence de lipides et, en fonction des conditions, forme des fibrilles amyloïdes (Weinreb P.H. *et al.*, 1996 ; Ulmer T.S. *et al.*, 2005 ; Del Mar C. *et al.*, 2005). Les expériences de CD ont montré qu'une augmentation en TFE augmente la conformation hélicoïdale du fragment 67-78 de 5 à 40%, soulignant la plasticité du peptide oblique. Les protéines amyloïdogéniques pourraient nécessiter des régions structurellement labiles pour initier la transconformation globale. L'initiation de la transconformation pourrait ainsi être assumée par les peptides obliques, comme proposé pour la protéine PrP et le peptide A $\beta$  (Pillot T. *et al.*, 1997 ; Brasseur R., 2000).

En conclusion, le peptide 67-78 de l' $\alpha$ -synucléine est capable d'induire la déstabilisation des liposomes et d'être neurotoxique, comme prédit par modélisation moléculaire. Bien que l'insertion oblique n'ait pas été directement prouvée expérimentalement, nous assumons le fait que le peptide de l' $\alpha$ -synucléine présente toutes les propriétés de la famille des peptides obliques. Le design d'un mutant montre clairement qu'il y a une corrélation entre l'insertion dans les lipides et l'activité déstabilisatrice du peptide, sur les liposomes aussi bien que sur cellules. Ces propriétés obliques pourraient être impliquées dans la neurotoxicité de l' $\alpha$ -synucléine, aussi bien par une perturbation directe de la membrane cellulaire qu'en participant à la formation d'un pore, ou dans le processus de transconformation.

#### V.4. *Les prions*

Des peptides obliques ont été mis en évidence au sein de quatre protéines prions sur cinq étudiées, ce qui suggère que les peptides obliques pourraient avoir un rôle commun dans les mécanismes associés aux prions. Cependant, les protéines prions ne présentent pas de similarité de séquences ou de domaines entre elles, et peuvent être associées à une maladie, à un trait phénotypique ou même à une fonction biologique. Deux des peptides obliques détectés se trouvent dans les domaines de PrP et HET-s qui fibrillent tandis que les deux autres se trouvent dans les domaines globulaires fonctionnels de Ure2p et Sup35p. Il est donc peu probable qu'il existe des fonctions communes aux peptides obliques dans les protéines prions. Il apparaît plus judicieux de les considérer de façon isolée et leurs fonctions potentielles doivent être recherchées au sein de leur protéine hôte particulière. Concernant le peptide oblique de la protéine PrP, son cas a déjà été traité largement (Pillot T. *et al.*, 1997) et son rôle potentiel dans la cytotoxicité et la transconformation de PrP reste d'actualité. En ce qui concerne le peptide oblique de la protéine HET-s, il se situe dans le domaine pouvant fibriller et il a été montré que le rôle biologique joué par les fibrilles interviendrait par l'intermédiaire de leurs propriétés toxiques. Dans ce cas, le peptide oblique pourrait jouer un rôle dans la cytotoxicité et /ou la transconformation, comme proposé pour la protéine PrP. Pour les protéines Ure2 et Sup35, les peptides obliques ne semblent pas liés à la formation des fibrilles puisqu'ils ne se trouvent pas dans le domaine subissant une transconformation. Ces peptides pourraient jouer un rôle dans la fonction normale de ces protéines ou se trouver à l'état latent dans la structure de la protéine. Ce pourrait être le cas du peptide oblique de la protéine Sup35 car celui-ci se trouve sous forme de brin  $\beta$  enfoui dans la structure. Par contre, pour la protéine Ure2, le peptide oblique se trouve sous forme d'hélice  $\alpha$  et en surface, ce qui suggère que ce peptide pourrait intervenir dans la fonction de la protéine. Ces hypothèses devraient être testées pour chacune de ces protéines par mutagenèse et tests fonctionnels. Etant donné que les peptides obliques de PrP et HET-s sont actifs sur des liposomes et cytotoxiques, contrairement à ceux de Sup35p et Ure2p, une corrélation pourrait être établie entre la localisation et l'activité du peptide au sein de la protéine.

### V.5. *Les autres protéines*

La séquence 9-19 de l'insuline porcine correspond à un peptide oblique. L'insuline est une hormone, synthétisée dans les cellules  $\beta$  du pancréas, dont la fonction est de diminuer la concentration en glucose du sang. Les monomères d'insuline adoptent essentiellement une conformation en hélice  $\alpha$  et contiennent 51 acides aminés répartis en deux chaînes (la chaîne A de 21 résidus et la chaîne B de 30 résidus) liées ensemble par deux ponts disulfure. Un troisième pont disulfure établit une liaison entre deux résidus de la chaîne A. Le peptide 9-19 correspond à l'hélice de la chaîne B (résidus 9-19) et est entouré par les deux cystéines (résidus 7 et 19) formant les ponts disulfure. Des dépôts amyloïdes contenant des molécules d'insuline intactes, incluant les ponts disulfure, ont été rencontrés chez un patient souffrant d'un diabète insulino-dépendant qui subissait un traitement d'injection d'insuline porcine (Dische F.E. *et al.*, 1988). L'insuline peut également former des fibrilles amyloïdes *in vitro*. Dans ce cas, le processus d'agrégation est plus rapide à hautes températures (60-70°C), à bas pH (1,5-2,0) et à de relativement hautes concentrations (mM) (Brange J. *et al.*, 1997). Le domaine transconformationnel n'est pas connu avec précision. Nos résultats montrent que le peptide 9-19 n'induit pas de fusion de phase lipidique. Ce résultat pourrait être dû à la présence d'une cystéine dans la séquence de ce peptide. En effet, celle-ci pourrait induire une polymérisation qui diminuerait la fusogénicité. Dans notre cas, une protection des cystéines avant les tests de fusion devrait être envisagée.

Un fragment oblique a également été détecté au sein de la transthyretine et de la protéine HypF. La transthyretine est une protéine humaine qui participe au transport des hormones thyroïdiennes. Elle forme un homotétramère, pour lequel chaque monomère est constitué d'une hélice  $\alpha$  et de 8 brins  $\beta$  formant 2 feuillets connectés par une boucle. Le peptide oblique correspond à un brin  $\beta$  ; quant aux prédictions de structure secondaire, elles alternent entre une hélice  $\alpha$  et un brin  $\beta$ , ce qui tend à montrer que le peptide pourrait adopter différentes conformations. La transthyretine est capable de former des fibrilles se déposant dans de nombreux tissus et est responsable de plusieurs amyloses, telles que la polyneuropathie amyloïdotique familiale (FAP) et la cardiomyopathie amyloïdotique familiale (FAC). Beaucoup de mutants ont été identifiés dans les fibrilles de patients ayant la FAP mais des dépôts amyloïdes se forment également avec la protéine non mutée. Les mutations observées se retrouvent tout le long de la séquence et l'on pense qu'elles sont responsables d'une déstabilisation du tétramère, ce qui conduirait à la formation des fibrilles. Il est donc difficile d'émettre une hypothèse quant au rôle potentiel du peptide oblique, étant donné que la

fibrillogenèse peut être due à la déstabilisation de la conformation du monomère ou du tétramère.

La protéine HypF d'*Escherichia coli* participe à la maturation de l'hydrogénase procaryotique [NiFe] qui est impliquée dans le métabolisme de l'hydrogène. Le domaine N-terminal est capable de former des fibrilles *in vitro* lorsqu'il est incubé à pH acide ou en présence de concentrations modérées en TFE (Chiti F. *et al.*, 2001). La structure de ce domaine est connue (Rosano C. *et al.*, 2002) et le peptide oblique déterminé (résidus 18-28) correspond à une hélice  $\alpha$ . Les prédictions de structure secondaire correspondent également à une hélice  $\alpha$ , ce qui tend à montrer que le peptide est dans une conformation active. Cependant, cette protéine n'a fait l'objet que de peu d'études concernant ses propriétés amyloïdes. Il a été montré que cette protéine forme des agrégats cytotoxiques capables de perméabiliser des liposomes (Relini A. *et al.*, 2004 ; Cecchi C. *et al.*, 2006) mais aucun sous-domaine n'a été mis en évidence jusqu'à maintenant. Le fait que les peptides obliques des protéines HypF et TTR contiennent une proline pourrait expliquer pourquoi ils n'induisent pas de fusion dans les conditions testées. En effet, la proline est un casseur d'hélice et pourrait empêcher ces fragments d'adopter une structure hélicoïdale suffisamment stable, même transitoirement.



# **CONCLUSION GENERALE**





## VI. Conclusion générale

Les protéines amyloïdogéniques font actuellement l'objet d'une attention particulière de la part de la communauté scientifique. D'une part, parce que certaines maladies associées à l'apparition de structures amyloïdes représentent un problème de santé publique de plus en plus important pour nos sociétés, avec l'augmentation de l'espérance de vie. Il s'agit par exemple de la maladie d'Alzheimer qui touche plus de 20 millions de personnes à travers le monde. Et d'autre part, parce que l'étude de ces protéines est très importante en biophysique. En effet, la transconformation et l'agrégation qu'elles subissent, ainsi que les structures amyloïdes et leur toxicité ne sont pas encore complètement élucidées.

Au sein de notre laboratoire, les analyses du peptide A $\beta$  et de la protéine PrP ont montré que ces deux protéines amyloïdogéniques possèdent des peptides obliques. Ces fragments, sous forme d'hélice, présentent un gradient d'hydrophobicité qui leur permet de déstabiliser des interfaces hydrophile/hydrophobe, telles que des bicouches lipidiques. La présence de ces fragments a conduit l'équipe du professeur Brasseur à proposer plusieurs hypothèses sur le(s) rôle(s) des peptides obliques au sein de ces protéines. Le but de notre travail, dans ce contexte, est de généraliser la présence des peptides obliques dans les protéines amyloïdogéniques et d'étudier leurs propriétés expérimentalement.

Cette étude nous a tout d'abord conduit à mettre au point une méthode de détection plus facile et rapide des peptides obliques, bien qu'elle ne soit pas encore entièrement automatisée. Cette méthode permet de cibler des domaines obliques potentiels dans la séquence et fournit des informations sur les peptides composant ces domaines. Avec cette méthodologie, 53 protéines ont été étudiées et 15 nouveaux peptides obliques ont été mis en évidence au sein de 13 protéines amyloïdogéniques. Les formes amyloïdes de ces 13 protéines peuvent être liées à une maladie, une fonction biologique ou apparaissent *in vitro*. La partie expérimentale de ce travail a conduit à l'étude de sept peptides obliques par plusieurs approches dont des mesures de fusion de phase lipidique, de perméabilité lipidique, de cytotoxicité et de dichroïsme circulaire. Les résultats sont résumés dans le tableau XX. Ceux-ci montrent que 4 peptides obliques peuvent induire de la fusion et de la perméabilité membranaire. Ces derniers sont donc capables de déstabiliser les membranes. Pour les trois autres, des études complémentaires devraient être réalisées. Deux peptides sont également cytotoxiques, ce qui pourrait être relié à la toxicité induite par ces protéines au cours de l'amyloïdogénèse. En ce qui concerne les mesures de dichroïsme circulaire, une conformation  $\alpha$  n'a été observée que

- Conclusion générale -

pour un seul peptide en présence de liposomes. Les peptides obliques n'adopteraient que transitoirement une structure hélicoïdale dans les membranes.

*Tableau XX : Résultats expérimentaux obtenus pour les peptides obliques testés*

<b>Protéines amyloïdogéniques</b>	<b>Peptide oblique</b>	<b>Fusion de phase lipidique</b>	<b>Perméabilité lipidique</b>	<b>Cytotoxicité</b>	<b>Dichroïsme circulaire</b>
α-synucléine	67-78	✓	✓	✓	désordonné
Sup35p	256-269	✓	✓	✗	feuillet β
Ure2p	181-194	✓	✓	✗	hélice α
HET-s	27-40	✓	✓	✓	désordonné
Insuline	9-19	✗	ND	ND	ND
Transthyretine	10-20	✗	ND	ND	ND
HypF	18-28	✗	ND	ND	ND

*Les sigles ✓ et ✗ identifient respectivement des résultats positifs et négatifs. Les résultats de dichroïsme circulaire correspondent aux structures obtenues en présence de liposomes. ND = Non Déterminé.*

La conclusion que nous pouvons retirer de notre étude est que toutes les protéines amyloïdes ne possèdent pas de peptides obliques, puisque seul un tiers des protéines en possède. Cette constatation amène à l'hypothèse que l'effet déstabilisant de ces fragments particuliers n'est pas le seul mécanisme potentiel induisant la transconformation et/ou la cytotoxicité de la protéine entière. Pour les peptides obliques mis en évidence au cours de cette étude, deux voies semblent se dégager. Soit ils se situent dans les régions cruciales pour l'agrégation et/ou la toxicité et ces propriétés ont pu être reproduites au moins partiellement *in vitro*. Soit ils se retrouvent dans des domaines globulaires fonctionnels de la protéine et ne semblent pas avoir d'effet cytotoxique. On pourrait cependant envisager une implication de ces peptides dans la fonction normale de la protéine.

# **PERSPECTIVES**



## VII. Perspectives

Actuellement, la méthode de détection automatique développée au cours de ce travail permet de mettre en évidence des domaines obliques correspondant généralement aux régions d'activité membranaire d'une protéine et peut être utilisée en conjonction avec les méthodes HCA et de Jähnig pour proposer des candidats peptides obliques optimaux ; elle permet aussi de faciliter grandement l'analyse des séquences. L'automatisation plus globale de la méthode devra se faire en augmentant la base de données des peptides obliques. Les peptides identifiés par la méthode dans les protéines contenant déjà un peptide oblique devront être testés expérimentalement et d'autres études de même type que celles menées par l'équipe de Villalaín (décrites au chapitre IV.I) devront enrichir cette même banque. Cette méthode permettra, dans ces conditions, d'obtenir un outil de prédiction efficace, rapide et facile d'utilisation.

Les résultats de cette étude montrent que les peptides obliques sont des structures fréquemment rencontrées au sein des protéines amyloïdogéniques dont certains pourraient jouer un rôle dans les processus de cytotoxicité et/ou de transconformation. Ce travail sera poursuivi par l'étude expérimentale des huit autres peptides obliques détectés et par l'analyse des autres protéines amyloïdogéniques non encore testées. De façon générale, le(s) rôle(s) de chacun des peptides obliques mis en évidence au cours de cette étude devrai(en)t être étudié(s) en détail dans le cadre de la protéine entière et de leurs propriétés amyloïdes. En ce qui concerne la cytotoxicité, des mutants non obliques des peptides mis en évidence devraient être proposés et testés par mutagenèse. Pour la transconformation, une des hypothèses propose que ces peptides puissent également agir sur une interface protéique et modifier la conformation de cette protéine. Nous tenterons de mettre au point une nouvelle technique expérimentale qui permettrait de mettre en évidence une telle activité. 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. 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 contribuer à de nouvelles approches pharmacologiques dans la lutte contre les maladies neurodégénératives ou amyloïdes. Les peptides obliques pourraient être la cible de molécules diminuant ou annulant leur activité déstabilisatrice. Cela a par exemple été montré pour le peptide oblique du peptide A $\beta$ , dont les capacités fusogènes sont significativement diminuées par des interactions hydrophobes spécifiques avec des hélices amphipathiques de l'apolipoprotéine E (Lins L. *et al.*, 1999 ; Pillot T. *et al.*, 1999). Des dérivés de ces hélices ont été définis par modélisation moléculaire et sont plus efficaces en terme d'effet inhibiteur (Decaffmeyer M. *et al.*, 2006).

# **BIBLIOGRAPHIE**





## VIII. Bibliographie

Adam B., Lins L., Stroobant V., Thomas A., Brasseur R. (2004). Distribution of hydrophobic residues is crucial for the fusogenic properties of the Ebola virus GP2 fusion peptide. *J. Virol.* 78, 2131-2136.

Aguzzi A. (2006). Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis. *J. Neurochem.* 97, 1726-1739.

Alper T., Cramp W.A., Haig D.A., Clarke M.C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid ? *Nature* 214, 764-766.

Apetri M.M., Maiti N.C., Zagorski M.G., Carey P.R., Anderson V.E. (2006). Secondary structure of alpha-synuclein oligomers: characterization by raman and atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* 355, 63-71.

Bartlett G.R. (1959). Phosphorus Assay in Column Chromatography. *J. Biol. Chem.* 234, 466-468.

Baxa U., Cheng N., Winkler D.C., Chiu T.K., Davies D.R., Sharma D., Inouye H., Kirschner D.A., Wickner R.B., Steven A.C. (2005). Filaments of the Ure2p prion protein have a cross-beta core structure. *J. Struct. Biol.* 150, 170-179.

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. *J. Cell Biol.* 161, 521-533.

Bessen R.A., Marsh R.F. (1993). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J. Virol.* 66, 2096-2101.

Blake C., Serpell L. (1996). Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix. *Structure* 4, 989-998.

Blennow K., de Leon M.J., Zetterberg H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* 368, 387-403.

Bonar L., Cohen A.S., Skinner M.M. (1969). Characterization of the amyloid fibril as a cross-beta protein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131, 1373-1375.

Brachmann A., Baxa U., Wickner R.B. (2005). Prion generation *in vitro*: amyloid of Ure2p is infectious. *EMBO J.* 24, 3082-3092.

Bradley M.E., Edskes H.K., Hong J.Y., Wickner R.B., Liebman S.W. (2002). Interactions among prions and prion "strains" in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16392-16399.

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.

- Brange J., Andersen L., Laursen E.D., Meyn G., Rasmussen E. (1997). Toward understanding insulin fibrillation. *J. Pharm. Sci.* 86, 517-525.
- 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.
- Brasseur R., Vandenbranden M., Coret B., Burny A., Ruyschaert J.M. (1990). Orientation into the lipid bilayer of an asymmetric amphipathic helical peptide located at the N-terminus of viral fusion proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1092, 267-273.
- Brasseur R. (1991). Differentiation of lipid-associating helices by use of three-dimensional molecular hydrophobicity potential calculations. *J. Biol. Chem.* 266, 16120-16127.
- Brasseur R. (1995). Simulating the folding of small proteins by use of the local minimum energy and the free solvation energy yields native-like structures. *J. Mol. Graph.* 13, 312-322.
- Brasseur R., Pillot T., Lins L., Vandekerckhove J., Rosseneu M. (1997). Peptides in membranes: tipping the balance of membrane stability. *Trends Biochem. Sci.* 22, 167-171.
- Brasseur R. (2000). Tilted peptides : a motif for membrane destabilization (Hypothesis). *Mol. Membr. Biol.* 17, 31-40.
- Bruce M.E., McConnell I., Fraser H., Dickinson A.G. (1992). The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J. Gen. Virol.* 72, 595-603.
- 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.
- Bussell R., Eliezer D. (2001). Residual structure and dynamics in Parkinson's disease-associated mutants of alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 276, 45996-46003.
- Bussell R. Jr., Eliezer D. (2003). A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. *J. Mol. Biol.* 329, 763-778.
- Canevari L., Abramov A.Y., Duchon M.R. (2004). Toxicity of amyloid beta peptide: tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress. *Neurochem. Res.* 29, 637-650.
- Caughey B., Raymond G.J., Bessen R.A. (1998). Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J. Biol. Chem.* 273, 32230-32235.
- Cecchi C., Pensalfini A., Baglioni S., Fiorillo C., Caporale R., Formigli L., Liguri G., Stefani M. (2006). Differing molecular mechanisms appear to underlie early toxicity of prefibrillar HypF-N aggregates to different cell types. *FEBS J.* 273, 2206-2222.
- Chan J.C., Oyler N.A., Yau W.M., Tycko R. (2005). Parallel beta-sheets and polar zippers in amyloid fibrils formed by residues 10-39 of the yeast prion protein Ure2p. *Biochemistry* 44, 10669-10680.

Chandra S., Chen X., Rizo J., Jahn R., Sudhof T.C. (2003). A broken alpha-helix in folded alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 278, 15313-15318.

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.

Charloteaux B., Lorin A., Crowet J.M., Stroobant V., Lins L., Thomas A., Brasseur R. (2006). The N-terminal 12 residue long peptide of HIV gp41 is the minimal peptide sufficient to induce significant T-cell-like membrane destabilization *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 359, 597-609.

Chartier-Harlin M.C., Araria-Goumidi L., Lambert J.C. (2002). Les formes tardives de la maladie d'Alzheimer : de la génétique à la biologie. *Med. Sci. (Paris)* 18, 709-716.

Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., Levecque C., Larvor L., Andrieux J., Hulihan M., Waucquier N., Defebvre L., Amouyel P., Farrer M., Destee A. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364, 1167-1169.

Chernoff Y.O., Lindquist S.L., Ono B., Inge-Vechtomov S.G., Liebman S.W. (1995). Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi<sup>+</sup>]. *Science* 268, 880-884.

Chernoff Y.O., Galkin A.P., Lewitin E., Chernova T.A., Newnam G.P., Belenkiy S.M. (2000). Evolutionary conservation of prion-forming abilities of the yeast Sup35 protein. *Mol. Microbiol.* 35, 865-876.

Chen Y.H., Yang J.T., Chau K.H. (1974). Determination of the helix and bêta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* 13, 3350-3359.

Chiti F., Bucciantini M., Capanni C., Taddei N., Dobson C.M., Stefani M. (2001). Solution conditions can promote formation of either amyloid protofilaments or mature fibrils from the HypF N-terminal domain. *Protein Sci.* 10, 2541-2547.

Citron M., Oltersdorf T., Haass C., McConlogue L., Hung A.Y., Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Lieberburg I., Selkoe D.J. (1992). Mutation of the bêta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases bêta-protein production. *Nature* 360, 672-674.

Citron M., Westaway D., Xia W., Carlson G., Diehl T., Levesque G., Johnson-Wood K., Lee M., Seubert P., Davis A., Kholodenko D., Motter R., Sherrington R., Perry B., Yao H., Strome R., Lieberburg I., Rommens J., Kim S., Schenk D., Fraser P., St George Hyslop P., Selkoe D.J. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid bêta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* 3, 67-72.

Clippingdale A.B., Wade J.D., Barrow C.J. (2001). The Amyloid- $\beta$  Peptide and its Role in Alzheimer's Disease. *J. Pept. Sci.* 7, 227-249.

Cohen A.S., Calkins E. (1959). Electron microscopic observation on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* 183, 1202-1203.

Coles M., Bicknell W., Watson A.A., Fairlie D.P., Craik D.J. (1998). Solution structure of amyloid  $\beta$ -peptide (1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is? *Biochemistry* 37, 11064-11077.

Collinge J. (1999). Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 354, 317-323.

Colon W., Kelly J.W. (1991). Transthyretin acid induced denaturation is required for amyloid fibril formation. In Kelly J.W., Baldwin T.O. (eds). *Applications of Enzyme Biotechnology*. New York Plenum, p.99-108.

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

Conway K.A., Rochet J.C., Bieganski R.M., Lansbury P.T. Jr. (2001). Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294, 1346-1349.

Corti O., Brice A. (2003). Parkinson's disease: what have we learned from the genes responsible for familial forms? *Med. Sci. (Paris)* 19, 613-619.

Coulthart M.B., Cashman N.R. (2001). Variant Creutzfeldt-Jakob disease : a summary of current scientific knowledge in relation to public health. *CMAJ* 165, 51-58.

Cox B.S. (1965). PSI, a cytoplasmic suppressor of super suppressor in yeast. *Heredity* 20, 505-521.

Crescenzi O., Tomaselli S., Guerrini R., Salvadori S., D'Ursi A.M., Temussi P.A., Picone D. (2002). Solution structure of the Alzheimer amyloid  $\beta$ -peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain. *Eur. J. Biochem.* 269, 5642-5648.

Crowther R.A., Jakes R., Spillantini M.G., Goedert M. (1998). Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated alpha-synuclein. *FEBS Lett.* 436, 309-312.

Cuille J., Chelle P.L. (1936). Pathologie animale. La maladie dite de la tremblante du mouton est-elle inoculable? *C. R. Acad. Sci.* 26, 1552-1554.

Dalstra H.J., van der Zee R., Swart K., Hoekstra R.F., Saupe S.J., Debets A.J. (2005). Non-mendelian inheritance of the HET-s prion or HET-s prion domains determines the het-S spore killing system in *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* 42, 836-847.

Davidson W.S., Jonas A., Clayton D.F., George J.M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* 273, 9443-9449.

Decaffmeyer M., Lins L., Charlotiaux B., VanEyck M.H., Thomas A., Brasseur R. (2006). Rational design of complementary peptides to the  $\beta$ amyloid 29-42 fusion peptide: an application of PepDesign. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 320-327.

- Deleage G., Roux B. (1987). An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng.* 1, 289-294.
- Del Mar C., Greenbaum E.A., Mayne L., Englander S.W., Woods V.L.Jr. (2005). Structure and properties of alpha-synuclein and other amyloids determined at the amino acid level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15477-15482.
- DeMarco M.L., Dagget V. (2004). From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2293-2298.
- Derkatch I.L., Bradley M.E., Hong J.Y., Liebman S.W. (2001). Prions affect the appearance of other prions: the story of [PIN(+)]. *Cell* 106, 171-182.
- Derkatch I.L., Uptain S.M., Outeiro T.F., Krishnan R., Lindquist S.L., Liebman S.W. (2004). Effects of Q/N-rich, polyQ, and non-polyQ amyloids on the de novo formation of the [PSI<sup>+</sup>] prion in yeast and aggregation of Sup35 *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 12934-12939.
- Dima R.I., Thirumalai D. (2002). Exploring the propensities of helices in PrP<sup>C</sup> to form  $\beta$  sheet using NMR structures and sequence alignments. *Biophys. J.* 83, 1268-1280.
- Ding T.T., Lee S.J., Rochet J.C., Lansbury P.T.Jr. (2002). Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. *Biochemistry* 41, 10209-10217.
- Dische F.E., Wernstedt C., Westermark G.T., Westermark P., Pepys M.B., Rennie J.A., Gilbey S.G., Watkins P.J. (1988). Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. *Diabetologia* 31, 158-161.
- Divry P., Florkin M. (1927). Sur les propriétés optiques de l'amyloïde. *C. R. Soc. Biol.* 97, 1808-1810.
- Dobson C.M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24, 329-332.
- Donne D.G., Viles J.H., Groth D., Mehlhorn I., James T.L., Cohen F.E., Prusiner S.B., Wright P.E., Dyson H.J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein. PrP(29-231): the N-terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13452-13457.
- Dos Reis S., Couлары-Salin B., Forge V., Lascu I., Begueret J., Saupe S.J. (2002). The HET-s prion protein of the filamentous fungus *Podospora anserina* aggregates *in vitro* into amyloid-like fibrils. *J. Biol. Chem.* 277, 5703-5706.
- Du H.N., Tang L., Luo X.Y., Li H.T., Hu J., Zhou J.W., Hu H.Y. (2003). A peptide motif consisting of glycine, alanine, and valine is required for the fibrillization and cytotoxicity of human alpha-synuclein. *Biochemistry* 42, 8870-8878.
- Ducarme P., Rahman M., Bresseur R. (1998). Impala : a simple restraint field to simulate the biological membrane in molecular structure studies. *Proteins* 30, 357-371.

- Bibliographie -

- Eanes E.D., Glenner G.G. (1968). X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J. Histochem. Cytochem.* 16, 673-677.
- Eisenberg D., Weiss R., Terwilliger T. (1982). The helical hydrophobic moment : a measure of the amphiphilicity of the  $\alpha$ -helix. *Nature* 299, 371-374.
- El-Agnaf O.M.A., Bodles A., Guthrie D.J.S., Harriott P., Irvine G.B. (1998). The N-terminal region of non-A $\beta$  component of Alzheimer's Disease amyloid is responsible for its tendency to assume  $\beta$ -sheet and aggregate to form fibrils. *Eur. J. Biochem.* 258, 157-163.
- El-Agnaf O.M.A., Irvine G.B. (2002). Aggregation and neurotoxicity of  $\alpha$ -synuclein and related peptides. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 559-565.
- 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.
- Esteras-Chopo A., Serrano L., Lopez De La Paz. (2005). The amyloid stretch hypothesis: recruiting proteins toward the dark side. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 16672-16677.
- Etchebest C., Benros C., Hazout S., de Brevern A.G. (2005). A structural alphabet for local protein structure: improved prediction methods. *Proteins* 59, 810-827.
- Fändrich M., Fletcher M.A., Dobson C.M. (2001). Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* 410, 165-166.
- Fändrich M., Dobson C.M. (2002). The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J.* 21, 5682-5690.
- Festy F., Lins L., Péranzi G., Octave J.N., Brasseur R., Thomas A. (2001). Is aggregation of  $\beta$ -amyloid peptides a mis-functioning of a current interaction process ? *Biochim. Biophys. Acta* 1546, 356-364.
- Fowler D.M., Koulov A.V., Balch W.E., Kelly J.W. (2007). Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* 32, 217-224.
- Frishman D., Argos P. (1996). Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng.* 9, 133-142.
- Gaboriaud C., Bissery V., Benehetrit T., Momon J.P. (1987). Hydrophobic cluster analysis an efficient new way to compare and analyse amino acid sequence. *FEBS J.* 224, 149-155.
- Gajdusek D.C., Zigas V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N. Engl. J. Med.* 257, 974-978.
- Gajdusek D.C., Gibbs C.J., Alpers M. (1966). Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209, 794-796.
- Galzitskaya O.V., Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y. (2006). Prediction of amyloidogenic and disordered regions in protein chains. *PLoS Comput. Biol.* 2, 1639-1648.

- Bibliographie -

Garnier J., Gibrat J.F., Robson B. (1996). GOR secondary structure prediction method version IV. *Meth. Enzymol.* 266, 540-553.

George J.M. (2001). The synucleins. *Genome Biol.* 3, 3002.1-3002.6.

Geourjon C., Deleage G. (1994). SOPM : a self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng.* 7, 157-164.

Giasson B.I., Murray I.V., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* 276, 2380-2386.

Gibbs C.J. Jr., Gajdusek D.C., Latarjet R. (1978). Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 6268-6270.

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

Glenner G.G., Harbaugh J., Ohms J.I., Harada M., Cuatrecasas P. (1970). An amyloid protein: the amino-terminal variable fragment of an immunoglobulin light chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1287-1289.

Glover J.R., Lindquist S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94, 73-82.

Goedert M., Spillantini M.G. (2006). A century of Alzheimer's disease. *Science* 314, 777-781.

Goldberg M.S., Lansbury P.T. Jr. (2000). Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat. Cell Biol.* 2, E115-119.

Govaerts C., Wille H., Prusiner S.B., Cohen F.E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed  $\beta$ -helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8342-8347.

Grateau G. (2000). Physiopathologie des amyloses. *Rev. Rhum.* 67, 189-196.

Greenfield N., Fasman G.D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* 8, 4108-4116.

Guermeur Y. (1997). Combinaison de classifieurs statistiques, application à la prédiction de structure secondaire des protéines. PhD Thesis.

Guillén J., Pérez-Berná A.J., Moreno M.R., Villalaín J. (2005). Identification of the membrane-active regions of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike membrane glycoprotein using a 16/18-mer peptide scan: implications for the viral fusion mechanism. *J. Virol.* 79, 1743-1752.

Hadlow W.J. (1959). Scrapie and Kuru. *Lancet* 2, 289-290.

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. *Nat. Struct. Biol.* 8, 715-720.

Harper J.D., Lansbury P.T. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie : Mechanistic Truths and Physiological Consequences of the Time-Dependent Solubility of Amyloid Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 385-407.

Harrison P.M., Bamorough P., Daggett V., Prusiner S.B., Cohen F.E. (1997). The prion folding problem. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 53-59.

Hofmann M.W., Weise K., Ollesch J., Agrawal P., Stalz H., Stelzer W., Hulsbergen F., de Groot H., Gerwert K., Reed J., Langosch D. (2004). *De novo* design of conformationally flexible transmembrane peptides driving membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14776-14781.

Horth M., Lambrecht B., Khim M.C.L., Bex F., Thiriart C., Ruyschaert J.M., Burny A., Brasseur R. (1991). Theoretical and functional analysis of the SIV fusion peptide. *EMBO J.* 10, 2747-2755.

Huang Z., Prusiner S.B., Cohen F.E. (1995). Scrapie prions : a three-dimensional model of an infectious fragment. *Folding & Design* 1, 13-19.

Huff M.E., Balch W.E., Kelly J.W. (2003). Pathological and functional amyloid formation orchestrated by the secretory pathway. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 674-682.

Hughes S.R., Goyal S., Sun J.E., Gonzalez-DeWhitt P., Fortes M., Riedel N.G., Sahasrabudhe S.R. (1996). Two-hybrid system as a model to study the interaction of beta-amyloid peptide monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2065-2070.

Jähnig F. (1990). Structure predictions of membrane proteins are not that bad. *Trends Biochem. Sci.* 15, 93-95.

Janowski R., Kozak M., Jankowska E., Grzonka Z., Grubb A., Abrahamson M., Jaskolski M. (2001). Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nat. Struct. Biol.* 8, 316-320.

Jarrett J.T., Berger E.P., Lansbury P.T. (1993). The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.* 695, 144-148.

Jaskólski M. (2001). 3D domain swapping, protein oligomerization, and amyloid formation. *Acta Biochim. Pol.* 48, 807-827.

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

Johnson R.J. (2005). Prion diseases. *Lancet Neurol.* 4, 635-642.



- Bibliographie -

- Kagan B.L., Azimov R., Azimova R. (2004). Amyloid peptide channels. *J. Membr. Biol.* 202, 1-10.
- Kajava A.V., Baxa U., Wickner R.B., Steven A.C. (2004). A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: the parallel superpleated  $\beta$ -structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 7885-7890.
- Kallberg Y., Gustafsson M., Persson B., Thyberg J., Johansson J. (2001). Prediction of amyloid fibril-forming proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 12945-12950.
- Kawahara M., Kuroda Y. (2000). Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's  $\beta$ -amyloid protein : Channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res. Bull.* 53, 389-397.
- Kayed R., Head E., Thompson J.L., McIntire T.M., Milton S.C., Cotman C.W., Glabe C.G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486-489.
- Kelly J.W. (1996). Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 11-17.
- Kelly J.W. (1998). The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 101-106.
- Kelly J.W., Balch W.E. (2003). Amyloid as a natural product. *J. Cell Biol.* 161, 461-462.
- King C.Y., Tittmann P., Gross H., Gebert R., Aebi M., Wüthrich K. (1997). Prion-inducing domain 2-114 of yeast Sup35 protein transforms *in vitro* into amyloid-like filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 6618-6622.
- King C.Y., Diaz-Avalos R. (2004). Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature* 428, 319-323.
- Kirkitadze M.D., Condrón M.M., Teplow D.B. (2001). Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis. *J. Mol. Biol.* 312, 1103-1119.
- Korenaga T., Yan J., Sawashita J., Matsushita T., Naiki H., Hosokawa M., Mori M., Higuchi K., Fu X. (2006). Transmission of amyloidosis in offspring of mice with AApoAII amyloidosis. *Am. J. Pathol.* 168, 898-906.
- Kushnirov V.V., Ter-Avanesyan M.D. (1998). Structure and replication of yeast prions. *Cell* 94, 13-16.
- Kyle R.A. (2001). Amyloidosis: a convoluted story. *Br. J. Haematol.* 114, 529-538.
- Lacroute F. (1971). Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. *J. Bacteriol.* 106, 519-522.

Lal R., Lin H., Quist A.P. (2007). Amyloid bêta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1966-1975.

Lambert G., Decout A., Vanloo B., Rouy D., Duverger N., Kalopissis A., Vandekerckhove J., Chambaz J., Brasseur R., Rosseneu M. (1998). The C-terminal helix of human apolipoprotein AII promotes the fusion of unilamellar liposomes and displaces apolipoprotein AI from high-density lipoproteins. *Eur. J. Biochem.* 253, 328-338.

Lansbury P.T.J., Costa J.M., Griffiths E.J., Simon E.J., Auger M., Halverson K.J., Kocisko D.A., Hendsch Z.S., Ashburn T.T., Spencer R.G. (1995). Structural model for the bêta-amyloid fibril based on interstrand alignment of an antiparallel-sheet comprising a C-terminal peptide. *Nat. Struct. Biol.* 2, 990-998.

Lashuel H.A., Hartley D., Petre B.M., Walz T., Lansbury P.T. Jr. (2002). Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418, 291-291.

Lashuel H.A., Hartley D.M., Petre B.M., Wall J.S., Simon M.N., Walz T., Lansbury P.T. Jr. (2003). Mixtures of wild-type and a pathogenic (E22G) form of Abêta40 *in vitro* accumulate protofibrils, including amyloid pores. *J. Mol. Biol.* 332, 795-808.

Lee H.J., Choi C., Lee S.J. (2002). Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J. Biol. Chem.* 277, 671-678.

Levin J.M., Robson B., Garnier J. (1996). An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity. *FEBS Lett.* 205, 303-308.

LeVine H. (1993). Thioflavin T interaction with synthetic Alzheimer's disease bêta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* 2, 404-410.

Levy-Lahad E., Wijsman E.M., Nemens E., Anderson L., Goddard K.A., Weber J.L., Bird T.D., Schellenberg G.D. (1995). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269, 970-973.

Lian H.Y., Jiang Y., Zhang H., Jones G.W., Perrett S. (2006). The yeast prion protein Ure2: structure, function and folding. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 535-545.

Liautard J.P., Alvarez-Martinez M.T., Feraudet C., Torrent J. (2002). The prion protein: structure, dynamics and *in vitro* conversion. *Med. Sci. (Paris)* 18, 62-69.

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

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 beta-amyloid peptide and apolipoprotein E alpha-helices. *J. Neurochem.* 73, 758-769.

Lins L., Charlotheaux B., Thomas A., Brasseur R. (2001). Computational study of lipid-destabilising protein fragments: towards a comprehensive view of tilted peptides. *Proteins* 44, 435-447.

Lins L., Charlotheaux B., Heinen C., Thomas A., Brasseur R. (2006). "De novo" design of peptides with specific lipid-binding properties. *Biophys. J.* 90, 470-479.

Lins L., El Kirat K., Flore C., Stroobant V., Thomas A., Brasseur R. (2007). Lipid-destabilizing properties of the hydrophobic helices H8 and H9 from colicin E1. *Mol. Membr. Biol.* 24, 419-430.

Liu W., Chou K.C. (1999). Prediction of protein secondary structure content. *Protein Eng.* 12, 1041-1050.

López De La Paz M., Goldie K., Zurdo J., Lacroix E., Dobson C.M., Hoenger A., Serrano L. (2002). De novo designed peptide-based amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16052-16057.

López De La Paz M., Serrano L. (2004). Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 87-92.

Lorin A., Thomas A., Stroobant V., Brasseur R., Lins L. (2006). Lipid-destabilising properties of a peptide with structural plasticity. *Chem. Phys. Lipids* 141, 185-196.

Lührs T., Ritter C., Adrian M., Riek-Loher D., Bohrmann B., Dobeli H., Schubert D., Riek R. (2005). 3D structure of Alzheimer's amyloid- $\beta$ (1-42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17342-17347.

Lundmark K., Westermark G.T., Nystrom S., Murphy C.L., Solomon A., Westermark P. (2002). Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6979-6984.

Lundmark K., Westermark G.T., Olsen A., Westermark P. (2005). Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: Cross-seeding as a disease mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 6098-6102.

Maat-Schieman M., Roos R., van Duinen S. (2005). Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type. *Neuropathology* 25, 288-297.

Maddelein M.L., Dos Reis S., Duvezin-Caubet S., Coulary-Salin B., Saupe S.J. (2002). Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7402-7407.

Mager P.P., Penke B., Walter R., Harkany T., Härtig W. (2002). Pathological Peptide Folding in Alzheimer's Disease and Other Conformational Disorders. *Curr. Med. Chem.* 9, 1763-1780.

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

- Martin I., Dubois M.C., Defrise-Quertain F., Saermark T., Burny A., Brasseur R., Ruysschaert J.M. (1994). Correlation between fusogenicity of synthetic modified peptides corresponding to the NH<sub>2</sub>-terminal extremity of simian immunodeficiency virus gp32 and their mode of insertion into the lipid bilayer: an infrared spectroscopy study. *J. Virol.* 68, 1139-1148.
- Masters C.L. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4245-4249.
- Mehta P.D., Capone G., Jewell A., Freedland R.L. (2007). Increased amyloid bêta protein levels in children and adolescents with Down syndrome. *J. Neurol. Sci.* 254, 22-27.
- Miake H., Mizusawa H., Iwatsubo T., Hasegawa M. (2002). Biochemical characterization of the core structure of alpha-synuclein filaments. *J. Biol. Chem.* 277, 19213-19219.
- Moreno M.R., Pascual R., Villalaín J. (2004). Identification of membrane-active regions of the HIV-1 envelope glycoprotein gp41 using a 15-mer gp41-peptide scan. *Biochim. Biophys. Acta* 1661, 97-105.
- Moriarty D.F., Raleigh D.P. (1999). Effects of sequential proline substitutions on amyloid formation by human amylin<sub>20-29</sub>. *Biochemistry* 38, 1811-1818.
- Moriyama H., Edskes H.K., Wickner R.B. (2000). [URE3] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone Ydj1p. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8916-8922.
- Mornon J.P., Prat K., Dupuis F., Boisset N., Callebaut I. (2002). Structural features of prions explored by sequence analysis. II. A PrP<sup>(Sc)</sup> model. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 2144-2154.
- Murphy R.M. (2007). Kinetics of amyloid formation and membrane interaction with amyloidogenic proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1923-1934.
- Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M., Takeda T. (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal. Biochem.* 177, 244-249.
- Nakayashiki T., Kurtzman C.P., Edskes H.K., Wickner R.B. (2005). Yeast prions [URE3] and [PSI<sup>+</sup>] are diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 10575-10580.
- Nazabal A., Maddelein M.L., Bonneau M., Saupe S.J., Schmitter J.M. (2005). Probing the structure of the infectious amyloid form of the prion-forming domain of HET-s using high resolution hydrogen/deuterium exchange monitored by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 280, 13220-13228.
- Nelder J.A., Mead R.A. (1997). A simplex method for function minimization. *Comput. J.* 7, 303-313.
- Nelson R., Sawaya M.R., Balbirnie M., Madsen A.O., Riek C., Grothe R., Eisenberg D. (2005). Structure of the cross-bêta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435, 773-778.

- Bibliographie -

- Nelson R., Eisenberg D. (2006). Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 260-265.
- Newman M., Musgrave I.F., Lardelli M. (2007). Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 285-297.
- Nguyen J., Baldwin M.A., Cohen F.E., Prusiner S.B. (1995). Prion protein peptides induce  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -sheet conformational transitions. *Biochemistry* 34, 4186-4192.
- Nickmans A. (1999). Etude structurale de la famille des protéines prion. Travail de fin d'étude réalisé à la *Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux* 78p.
- Ohnishi S., Takano K. (2004). Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 511-524.
- Olofsson A., Ippel J.H., Wijmenga S.S., Lundgren E., Ohman A. (2004). Probing solvent accessibility of transthyretin amyloid by solution NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 279, 5699-56707.
- Parry H.B. (1983). *Scrapie disease in sheep*. Ed. D.R. Oppenheimer, Academic Press, Londres.
- Patel B.K., Liebman S.W. (2007). "Prion-proof" for [PIN+]: infection with in vitro-made amyloid aggregates of Rnq1p-(132-405) induces [PIN+]. *J. Mol. Biol.* 365, 773-782.
- Pawar A.P., Dubay K.F., Zurdo J., Chiti F., Vendruscolo M., Dobson C.M. (2005). Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *J. Mol. Biol.* 350, 379-392.
- Peelman F., Goethals M., Vanloo B., Talussot C., Brasseur R., Vandekerckhove J., Rosseneu M. (1997). Structural and functional properties of the 154-171 wild-type and variant peptides of human lecithin-cholesterol acyltransferase. *Eur. J. Biochem.* 249, 708-715.
- Pérez-Méndez O., Vanloo B., Decout A., Goethals M., Peelman F., Vandekerckhove J., Brasseur R., Rosseneu M. (1998). Contribution of the hydrophobicity gradient of an amphipathic peptide to its mode of association with lipids. *Eur. J. Biochem.* 256, 570-579.
- Perutz M.F., Johnson T., Suzuki M., Finch J.T. (1994). Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5355-5358.
- Perutz M.F., Finch J.T., Berriman J., Lesk A. (2002). Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5591-5595.
- 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  $\beta$ -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16742-16747.

- Bibliographie -

Peuvot J., Schanck A., Lins L., Brasseur R. (1999). Are the fusion processes involved in birth, life and death of the cell depending on tilted insertion of peptides into membranes ? *J. Theor. Biol.* 198, 173-181.

Pierce M.M., Baxa U., Steven A.C., Bax A., Wickner R.B. (2005). Is the prion domain of soluble Ure2p unstructured? *Biochemistry* 44, 321-328.

Pillot T., Goethals M., Vanloo B., Talusot C., Brasseur R., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Lins L. (1996). Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer bêta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* 271, 28757-28765.

Pillot T., Lins L., Goethals M., Vanloo B., Baert J., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Brasseur R. (1997). The 118-135 peptide of the human prion protein forms amyloid fibrils and induces liposome fusion. *J. Mol. Biol.* 274, 381-393.

Pillot T., Goethals M., Najib J., Labeur C., Lins L., Chambaz J., Brasseur R., Vandekerckhove J., Rosseneu M. (1999). Beta-amyloid peptide interacts specifically with the carboxy-terminal domain of human apolipoprotein E: relevance to Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 72, 230-237.

Polak E. (1971). *Computational methods in Optimization* (New York: Academic Press), § 2.3.

Pountney D.L., Lowe R., Quilty M., Vickers J.C., Voelcker N.H., Gai W.P. (2004). Annular alpha-synuclein species from purified multiple system atrophy inclusions. *J. Neurochem.* 90, 502-512.

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

Prusiner S.B. (1994). Inherited prion diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4611-4614.

Prusiner S.B. (1996). Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. *Trends Biochem. Sci.* 21, 482-487.

Prusiner S.B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 13363-13383.

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

Rahman M., Brasseur R. (1994). WinMGM : a fast CPK molecular graphicsprogram for analyzing molecular structure. *J. Mol. Graphics* 12, 212-218.

Rahman M., Lins L., Thomas-Soumarmon A., Brasseur R. (1997). Are amphipatic asymmetric peptides ubiquitous structures for membrane destabilisation. *J. Mol. Model.* 3, 203-215.

Rajagopalan S., Andersen J.K. (2001). Alpha synuclein aggregation: is it the toxic gain of function responsible for neurodegeneration in Parkinson's disease? *Mech. Ageing Dev.* 122, 1499-1510.

- Bibliographie -

- Relini A., Torrassa S., Rolandi R., Gliozzi A., Rosano C., Canale C., Bolognesi M., Plakoutsi G., Bucciantini M., Chiti F., Stefani M. (2004). Monitoring the process of HypF fibrillization and liposome permeabilization by protofibrils. *J. Mol. Biol.* 338, 943-957.
- Rees D.C., Chirino A.J., Kim K.H., Komiya H. (1994). Membrane protein structure and stability: implications of the first crystallographic analyses. In White S.H. (eds). *Membrane Protein Structure*. New York, p.3-26.
- Resende C.G., Outeiro T.F., Sands L., Lindquist S., Tuite M.F. (2003). Prion protein gene polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 49, 1005-1017.
- Richardson J.S., Richardson D.C. (2002). Natural  $\beta$ -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2754-2759.
- Riek R., Hornemann S., Wider G., Billeter M., Glockshuber R, Wuthrich K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* 382, 180-182.
- Rochet J.C., Lansbury P.T.Jr. (2000). Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 60-68.
- Rosano C., Zuccotti S., Bucciantini M., Stefani M., Ramponi G., Bolognesi M. (2002). Crystal structure and anion binding in the prokaryotic hydrogenase maturation factor HypF acylphosphatase-like domain. *J. Mol. Biol.* 321, 785-796.
- Ross E.D., Baxa U., Wickner R.B. (2004). Scrambled prion domains form prions and amyloid. *Mol. Cell Biol.* 24, 7206-7213.
- Ross E.D., Minton A., Wickner R.B. (2005). Prion domains: sequences, structures and interactions. *Nat. Cell Biol.* 7, 1039-1044.
- Rost B., Sander C. (1994). Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* 232, 584-599.
- Sambashivan S., Liu Y., Sawaya M.R., Gingery M., Eisenberg D. (2006). Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure. *Nature* 437, 266-269.
- Santoso A., Chien P., Osherovich L.Z., Weissman J.S. (2000). Molecular basis of a yeast prion species barrier. *Cell* 100, 277-288.
- Sawaya M.R., Sambashivan S., Nelson R., Ivanova M.I., Sievers S.A., Apostol M.I., Thompson M.J., Balbirnie M., Wiltzius J.J., McFarlane H.T., Madsen A.Ø., Riek C., Eisenberg D. (2007). Atomic structures of amyloid cross- $\beta$  spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447, 453-457.
- Schanck A., Brasseur R., Peuvot J. (1998). Destabilization of a model membrane by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779-815.
- Schlumpberger M., Prusiner S.B., Herskowitz I. (2001). Induction of distinct [URE3] yeast prion strains. *Mol. Cell Biol.* 21, 7035-7046.

- Bibliographie -

Serpell L.C., Sunde M., Benson M.D., Tennent G.A., Pepys M.B., Fraser P.E. (2000). The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* 300, 1033-1039.

Sherman M.Y. (2004). Yeast prions: Protein aggregation is not enough. *Plos Biol.* 2, 436-439.

Shewmaker F., Wickner R.B., Tycko R. (2006). Amyloid of the prion domain of Sup35p has an in-register parallel  $\beta$ -sheet structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 19754-19759.

Shewmaker F., Mull L., Nakayashiki T., Masison D.C., Wickner R.B. (2007). Ure2p function is enhanced by its prion domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 176, 1557-1565.

Sigurdsson B. (1954). Rida: A Chronic Encephalitis of Sheep. *Br. Vet. J.* 110, 341-354.

Sipe J.D., Cohen A.S. (2000). Review : History of the Amyloid Fibril. *J. Struct. Biol.* 130, 88-98.

Sondheimer N., Lindquist S. (2000). Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell.* 5, 163-172.

Soto C., Estrada L., Castilla J. (2006). Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem. Sci.* 31, 150-155.

Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Hasegawa M., Goedert M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6469-6473.

Sreerama N., Woody R.W. (2000). Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287, 252-260.

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

Talarek N., Maillet L., Cullin C., Aigle M. (2005). The [URE3] prion is not conserved among *Saccharomyces species*. *Genetics* 171, 23-34.

Talmud P., Lins L., Brasseur R. (1996). Prediction of signal peptide functional properties : a study of the orientation and angle insertion of yeast invertase mutants and human apolipoprotein B signal peptide variants. *Protein Eng.* 9, 317-321.

Tanaka M., Chien P., Naber N., Cooke R., Weissman J.S. (2004). Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* 428, 323-328.

Tanaka M., Chien P., Yonekura K., Weissman J.S. (2005). Mechanism of cross-species prion transmission: an infectious conformation compatible with two highly divergent yeast prion proteins. *Cell* 121, 49-62.

Tanaka M., Collins S.R., Toyama B.H., Weissman J.S. (2006). The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* 442, 585-589.



Tanford C. (1973). The hydrophobic effect : formation of micelles and biological membranes. *New York : Wiley.*

Ter-Avanesyan M.D., Dagkesamanskaya A.R., Kushnirov V.V., Smirnov V.N. (1994). The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [psi+] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137, 671-676.

Thomas A., Deshayes S., Decaffmeyer M., Van Eyck M.H., Charlotiaux B., Brasseur R. (2006). Prediction of peptide structure: How far are we? *Proteins* 65, 889-897.

Thomas P., Fenech M. (2007). A review of genome mutation and Alzheimer's disease. *Mutagenesis* 22, 15-33.

Thompson M.J., Sievers S.A., Karanicolas J., Ivanova M.I., Baker D., Eisenberg D. (2006). The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 4074-4078.

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

True H.L., Berlin I., Lindquist S.L. (2004). Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature* 431, 184-187.

Tuite M.F., Koloteva-Levin N. (2004). Propagating prions in fungi and mammals. *Mol. Cell.* 14, 541-552.

Tycko R. (2003). Insights into the amyloid folding problem from solid-state NMR. *Biochemistry* 42, 3151-3159.

Olofsson A., Borowik T., Gröbner G., Sauer-Eriksson A.E. (2007). Negatively charged phospholipid membranes induce amyloid formation of medin via an alpha-helical intermediate. *J. Mol. Biol.* 374, 186-194.

Uéda K., Fukushima H., Masliah E., Xia Y., Iwai A., Yoshimoto M., Otero D.A., Kondo J., Ihara Y., Saitoh T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11282-11286.

Ulmer T.S., Bax A., Cole N.B., Nussbaum R.L. (2005). Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 280, 9595-9603.

Urakov V.N., Valouev I.A., Kochneva-Pervukhova N.V., Packeiser A.N., Vishnevsky A.Y., Glebov O.O., Smirnov V.N., Ter-Avanesyan M.D. (2006). N-terminal region of *Saccharomyces cerevisiae* eRF3 is essential for the functioning of the eRF1/eRF3 complex beyond translation termination. *BMC Mol. Biol.* 7: 34.

Uversky V.N., Li J., Fink A.L. (2001). Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. *J. Biol. Chem.* 276, 10737-10744.

Uversky V.N., Fink A.L. (2004). Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim. Biophys. Acta* 1698, 131-153.

- Volles M.J., Lansbury P.T.Jr. (2002). Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* 41, 4595-4602.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3810-3814.
- Weinreb P.H., Zhen W., Poon A.W., Conway K.A., Lansbury P.T. Jr. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35, 13709-13715.
- Westermarck P. (2005). Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. *FEBS J.* 272, 5942-5949.
- Westermarck P., Benson M.D., Buxbaum J.N., Cohen A.S., Frangione B., Ikeda S., Masters C.L., Merlini G., Saraiva M.J., Sipe J.D., Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. (2005). Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 12, 1-4.
- Wetzel R. (2002). Ideas of order for amyloid fibril structure. *Structure* 10, 1031-1036.
- Wickner R.B., Edskes H.K., Shewmaker F., Nakayashiki T. (2007). Prions of fungi: inherited structures and biological roles. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 611-618.
- Wickner R.B. (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264, 566-569.
- Wille H., Michelitsch M.D., Guénebaud 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3563-3568.
- Wood S.J., Wypych J., Steavenson S., Louis J.C., Citron M., Biere A.L. (1999). alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* 274, 19509-19512.
- Wood-Kaczmar A., Gandhi S., Wood N.W. (2006). Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends Mol. Med.* 12, 521-528.
- Yang J.T. Wu C.S., Martinez H.M. (1986). Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* 130, 208-269.
- Yoon S., Welsh W.J. (2004). Detecting hidden sequence propensity for amyloid fibril formation. *Protein Sci.* 13, 2149-2160.
- Zahn R., Liu A., Lührs T., Riek R., Von Schroetter C., López García F., Billeter M., Calzolari L., Wider G., Wüthrich K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 145-150.

- Bibliographie -

Zigas V., Gajdusek D.C. (1957). Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. *Med. J. Aust.* 44, 745-754.

Žerovnik E. (2002). Amyloid-fibril formation. Proposed mechanisms and relevance to conformational disease. *Eur. J. Biochem.* 269, 3362-3371.



# **ANNEXES**



## Annexe I

Echelle d'hydrophobicité consensus d'Eisenberg (Eisenberg D. *et al.*, 1982)

Acides aminés	Hydrophobicité
Cystéine	0,29
Sérine	-0,18
Thréonine	-0,05
Proline	0,12
Alanine	0,62
Glycine	0,48
Asparagine	-0,78
Aspartate	-0,90
Glutamate	-0,74
Glutamine	-0,85
Histidine	-0,40
Arginine	-2,50
Lysine	-1,50
Méthionine	0,64
Isoleucine	1,40
Leucine	1,10
Valine	1,10
Phénylalanine	1,20
Tyrosine	0,26
Tryptophane	0,81





## Annexe II

Codes une lettre et trois lettres des acides aminés

Acides aminés	Code une lettre	Code trois lettres
Cystéine	C	Cys
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Proline	P	Pro
Alanine	A	Ala
Glycine	G	Gly
Asparagine	N	Asn
Aspartate	D	Asp
Glutamate	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Histidine	H	His
Arginine	R	Arg
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Valine	V	Val
Phénylalanine	F	Phe
Tyrosine	Y	Tyr
Tryptophane	W	Trp



### **Annexe III**

Code source du module sélection de la méthode de détection automatique. Ce programme a été écrit dans le langage Visual Basic 6.0.

**Module de Sélection**

Fichier pex2stat :

Nom du fichier de sortie :

---

Taille des peptides allant de  à

Séquence allant de  à

Angle (°) compris entre  et

Pénétration (Å) comprise entre  et   
(Sélection sur Ipl : )

Emin(Kcal/mol) allant de  à

Hydrophobicité minimum :

Nombre de Proline Max :

Nombre de peptides sélectionnés :  
?

Prédiction

## Option Explicit

```
Dim DefaultDir As String
Dim NumeroLigne As Integer
Dim LigneTemporaire As String
Dim ligne As String
Dim TempArray() As String
Dim Tailleseq As Integer
Dim Enmin_min As Single
Dim Enmin_max As Single
Dim taille_min As Integer
Dim taille_max As Integer
Dim Amin As Single
Dim Amax As Single
Dim Pmin As Single
Dim Pmax As Single
Dim Hmax As Single
Dim Promax As Integer
Dim etat As String
Dim seq() As String
Dim taille() As Integer
Dim i As Integer
Dim residu() As String
Dim H() As Single
Dim Hmoy As Single
Dim séquence() As String
Dim debut() As Integer
Dim fin() As Integer
Dim resultat() As Single
Dim Emin() As Single
Dim Angle() As Single
Dim pénétration() As Single
Dim contrainte As Single
Dim j As Integer
Dim k As Integer
Dim outputfile As String
Dim Today As Variant
Dim parasup As Boolean
Dim nbpep As Integer
Dim Pen() As Single
Dim Ang() As Single
Dim ener() As Single
Dim rapport As Single
Dim deb() As Integer
Dim der() As Integer
Dim num() As Boolean
Dim red() As Integer
Dim nbtest As Integer
Dim l As Integer
Dim d As Integer
Dim domaindeb() As Integer
Dim domainfin() As Integer
Dim domainNb() As Integer
Dim nbselect As Integer
Dim valabs As String
Dim dist() As Integer
Dim nom As String
Dim nombis As String
Dim prediction() As String
Dim seqtot() As String
Dim temp As String
Dim p As Integer
Dim mn As Integer
Dim mp As Integer
```

## Private Sub browse\_Click()

```
CommonDialog.CancelError = True
CommonDialog.Filter = "All Files (*.*)|*.*|Pexfiles (*.Pex2stat)|*.Pex2stat|"
CommonDialog.FilterIndex = 2
CommonDialog.DialogTitle = "Open Pexfile"
CommonDialog.InitDir = DefaultDir
CommonDialog.Flags = cdlOFNExplorer And cdlOFNFileMustExist
On Error Resume Next
Err = 0
CommonDialog.ShowOpen
```

```

If Err = 32755 Then CommonDialog.CancelError = False: Exit Sub
On Error GoTo 0
CommonDialog.CancelError = False

txtentrée.Text = CommonDialog.FileName

DefaultDir = Left(CommonDialog.FileName, InStrRev(CommonDialog.FileName, "\"))
Open CommonDialog.FileName For Input As 1
j = 0
Do While Not EOF(1)
    Input #1, NumeroLigne
    Line Input #1, LigneTemporaire
    If NumeroLigne = 0 Then Exit Do 'fin du fichier
    j = j + 1
    ligne = Replace(LigneTemporaire, " ", " ")
    For i = 1 To 3
        ligne = Replace(ligne, " ", " ")
    Next
    TempArray() = Split(ligne, Chr(32))

    ReDim Preserve deb(1 To j)
    ReDim Preserve der(1 To j)
    ReDim Preserve taille(1 To j)
    ReDim Preserve ener(1 To j)
    ReDim Preserve Pen(1 To j)
    ReDim Preserve Ang(1 To j)
    ReDim Preserve num(1 To j)
    ReDim Preserve seq(1 To j)
    deb(j) = Val(TempArray(2))
    der(j) = Val(TempArray(3))
    taille(j) = Val(TempArray(4))
    ener(j) = Val(TempArray(5))
    Pen(j) = Val(TempArray(6))
    Ang(j) = Val(TempArray(7))
    seq(j) = TempArray(8)
    num(j) = True
    If Tailleseq < der(j) Or j = 1 Then Tailleseq = der(j)
    If Enmin_min > ener(j) Or j = 1 Then Enmin_min = ener(j)
    If Enmin_max < ener(j) Or j = 1 Then Enmin_max = ener(j)
    If taille_min > taille(j) Or j = 1 Then taille_min = taille(j)
    If taille_max < taille(j) Or j = 1 Then taille_max = taille(j)
    If Amin > Ang(j) Or j = 1 Then Amin = Ang(j)
    If Amax < Ang(j) Or j = 1 Then Amax = Ang(j)
    If Pmin > Pen(j) Or j = 1 Then Pmin = Pen(j)
    If Pmax < Pen(j) Or j = 1 Then Pmax = Pen(j)
Loop
Close 1
If Enmin_min < 0 Then Enmin_min = Int(Enmin_min) Else Enmin_min = Int(Enmin_min)
If Enmin_max < 0 Then Enmin_max = Int(Enmin_max) + 1 Else Enmin_max = Int(Enmin_max + 1)
If Amin < 0 Then Amin = Int(Amin) Else Amin = Int(Amin)
If Amax < 0 Then Amax = Int(Amax) + 1 Else Amax = Int(Amax) + 1
If Pmin < 0 Then Pmin = Int(Pmin) Else Pmin = Int(Pmin)
If Pmax < 0 Then Pmax = Int(Pmax) + 1 Else Pmax = Int(Pmax) + 1
nbpep = j
Tmin.Text = taille_min
Tmax.Text = taille_max
Smin.Text = "1"
Smax.Text = Tailleseq
Enmin.Text = Enmin_min
Enmax.Text = Enmin_max
Anmin.Text = Amin
Anmax.Text = Amax
Pemin.Text = Pmin
Pemax.Text = Pmax
txtresults.Text = ""

ReDim red(1 To Tailleseq, taille_min To taille_max)
nbtest = nbpep
For j = 1 To nbpep
    If red(deb(j), taille(j)) = 0 Then
        red(deb(j), taille(j)) = 1
    Else
        num(j) = False
        nbtest = nbtest - 1
    End If
Next j

```

```

    lblstat.Caption = "? / " & nbtest
End Sub

Private Sub cmdanalyse_Click()
    DomainAnalysis
    MsgBox "Opération terminée", , "Fin"
End Sub

Private Sub Command1_Click()
    DomainAnalysis
    Today = Date
    If txtsortie.Text <> "" Then
        outputfile = CurDir & "\" & txtsortie.Text & ".txt"
        Open outputfile For Output As #2
            Print #2, Tab(66); Today
            Print #2, ""
            Print #2, Tab(7); "Résultat de la sélection"
            Print #2, Tab(7); "-----"
            Print #2, ""
            Print #2, ". . . ."; Tab(27); "<H>"; Tab(34); "Emin"; Tab(44); "Z_min"; _
                Tab(54); "Angle"; Tab(63); "Séquence"
            Print #2, ""
            For i = 1 To nbselect
                Print #2, i & ";"; Tab(7); "séquence " & debut(i) & "-" & fin(i); _
                    Tab(24); ":" & Format(resultat(i), "#0.00"); Tab(34); _
                        Format(Emin(i), "##0.0"); Tab(44); Format(pénétration(i), "##0.0") _
                            ; Tab(54); Format(Angle(i), "##0.0"); Tab(63); séquence(i)
            Next
            Print #2, ""
            Print #2, ""
            Print #2, ""
            Print #2, "Domain    Nb"
            For i = 1 To d
                Print #2, domaindeb(i) & "-" & domainfin(i) & "    " & domainNb(i)
            Next i
            Print #2, nbselect & " / " & nbtest & " => " & Format(rapport, "##0.0") & " %"
            Print #2, ""
            Print #2, ""
            Print #2, ""
            If chkAbs.Value = vbChecked Then
                valabs = "OUI"
            Else
                valabs = "NON"
            End If
            Print #2, "Paramètres :"
            Print #2, ""
            Print #2, "Taille des peptides allant de " & Tmin.Text & " à " & Tmax.Text
            Print #2, "Séquence allant de " & Smin.Text & " à " & Smax.Text
            Print #2, "Angle(°) compris entre " & Anmin.Text & " et " & Anmax.Text
            Print #2, "Pénétration(A) comprise entre " & Pemin.Text & " et " _
                & Pemax.Text & " (en valeurs absolues : " & valabs & " )"
            Print #2, "Emin(Kcal/mol) allant de " & Emin.Text & " à " & Enmax.Text
            Print #2, "Hydrophobicité minimum : " & txtH.Text
            Print #2, "Nombre de proline maximum : " & txtP.Text
        Close #2

    If Check1.Value = vbChecked Then

        'Construction du graphique Excel'
        .....

        Dim appExcel As Excel.Application
        Dim wbExcel As Excel.Workbook
        Dim wsExcel As Excel.Worksheet
        Dim Mongraph As Excel.Chart
        Dim MaPlage As Excel.Range

        Set appExcel = CreateObject("Excel.Application")
        appExcel.Workbooks.Add
        Set wbExcel = appExcel.ActiveWorkbook
        Set wsExcel = wbExcel.ActiveSheet

        wsExcel.Cells(1, 2).Value = "Sélectionnés"
        wsExcel.Cells(1, 3).Value = "Testés"
        wsExcel.Cells(1, 4).Value = "Prédiction"
        For i = 1 To Tailleseq
            wsExcel.Cells(i + 1, 1).Value = i

```

```

wsExcel.Cells(i + 1, 2).Value = dist(2, i)
If dist(1, i) = 0 Then dist(1, i) = 1
wsExcel.Cells(i + 1, 3).Value = dist(1, i)
temp = (dist(2, i) / dist(1, i)) * 8
If temp <> 0 Then temp = Int(temp) + 1
wsExcel.Cells(i + 1, 4).Value = temp
Next i

Set MaPlage = wsExcel.Cells(2, 2).CurrentRegion
Set Mongraph = wbExcel.Charts.Add
Mongraph.ChartType = xlXYScatterLinesNoMarkers

wbExcel.ActiveChart.SeriesCollection.NewSeries
wbExcel.ActiveChart.SeriesCollection(1).XValues = _
    wsExcel.Range(wsExcel.Cells(2, 1), wsExcel.Cells(Tailleseq + 1, 1))
wbExcel.ActiveChart.SeriesCollection(1).Values = _
    wsExcel.Range(wsExcel.Cells(2, 2), wsExcel.Cells(Tailleseq + 1, 2))

With wbExcel.ActiveChart
    .HasTitle = False
    With .Axes(xlCategory)
        .HasTitle = True
        .AxisTitle.Characters.Text = "séquence"
        .HasMajorGridlines = False
        .HasMinorGridlines = False
        .MinimumScale = 1
        .MaximumScale = Tailleseq
        .MajorUnit = 150
        .Crosses = xlCustom
        With .TickLabels.Font
            .Name = "Arial"
            .Size = 16
        End With
        With .AxisTitle.Font
            .Name = "Arial"
            .Bold = False
            .Italic = False
            .Size = 16
        End With
    End With
    With .Axes(xlValue)
        .HasTitle = True
        .AxisTitle.Characters.Text = "Occurence"
        .HasMajorGridlines = False
        .HasMinorGridlines = False
        .MaximumScaleIsAuto = True
        .MajorUnitIsAuto = True
        .Crosses = xlCustom
        .CrossesAt = 0
        With .TickLabels.Font
            .Name = "Arial"
            .Size = 16
        End With
        With .AxisTitle.Font
            .Name = "Arial"
            .Bold = False
            .Italic = False
            .Size = 16
        End With
    End With
    .HasLegend = False
    .PlotArea.Interior.Color = RGB(255, 255, 255)
End With

nom = CurDir & "\" & txtsortie.Text
nombis = nom & ".xls"
Do While Dir(nombis) <> ""
    nom = nom & ""
    nombis = nom & ".xls"
Loop

wbExcel.Close True, FileName:=nom
appExcel.Quit

Set MaPlage = Nothing
Set Mongraph = Nothing
Set wsExcel = Nothing

```



```

Set wbExcel = Nothing
Set appExcel = Nothing

''Construction de la matrice qui va servir pour le document word''
.....

Dim indice As String
ReDim prediction(1 To 5, 1 To Tailleseq + 1)
prediction(1, 1) = " "
For j = 1 To Tailleseq
    prediction(1, j + 1) = " "
    If j / 10 = Int(j / 10) Then
        indice = Str(j)
        For l = 1 To Len(indice) - 1
            prediction(1, j + 2 - l) = Mid(indice, Len(indice) + 1 - l, 1)
        Next l
    End If
Next j
prediction(2, 1) = " "
For j = 1 To Tailleseq
    prediction(2, j + 1) = " "
    If j / 10 = Int(j / 10) Then
        prediction(2, j + 1) = "I"
    End If
Next j
prediction(3, 1) = "Sequence "
prediction(4, 1) = "Pred. "
prediction(5, 1) = "Conf. "
For j = 1 To Tailleseq
    prediction(3, j + 1) = seqtot(j)
    temp = (dist(2, j) / dist(1, j)) * 8
    If temp <> 0 Then temp = Int(temp) + 1
    If temp <> 0 Then
        prediction(4, j + 1) = "O"
    Else
        prediction(4, j + 1) = " "
    End If
    prediction(5, j + 1) = temp
Next j

''Construction du document word''
.....

Dim appWord As Word.Application
Dim DocWord As Word.Document

Set appWord = CreateObject("Word.Application")
Set DocWord = appWord.Documents.Add
'appWord.Visible = True

appWord.Selection.TypeText "Résultat de la prédiction"
appWord.Selection.TypeParagraph
appWord.Selection.TypeParagraph
appWord.Selection.Font.Name = "Courier New"
appWord.Selection.Font.Size = 9

p = 0
mn = 71
mp = Int(Tailleseq / 70) + 1
For l = 1 To mp
    p = p + 1
    If p = mp Then mn = Tailleseq - (mp - 1) * 70 + 1
    For i = 1 To 5
        appWord.Selection.TypeText (prediction(i, 1))
        For j = 2 To mn
            appWord.Selection.TypeText (prediction(i, j + (l - 1) * 70))
        Next j
        appWord.Selection.TypeParagraph
    Next i
    appWord.Selection.TypeParagraph
    appWord.Selection.TypeParagraph
Next l

'Debug.Print structure(1, j)
'appWord.Selection.InsertBreak Type:=wdPageBreak

```

```

With appWord.Selection.Sections(1)
    .Headers(1).Range.Text = Date
    .Headers(1).Range.ParagraphFormat.Alignment = wdAlignParagraphRight
End With

nom = CurDir & "\" & txtsortie.Text
nombis = nom & ".doc"
Do While Dir(nombis) <> ""
    nom = nom & ""
    nombis = nom & ".doc"
Loop

DocWord.SaveAs nombis
appWord.Quit
Set DocWord = Nothing
Set appWord = Nothing

End If

MsgBox "Opération terminée", , "Fin"
Else: MsgBox "Veuillez spécifier le nom du fichier de sortie", , "Attention"
End If

End Sub
Private Sub DomainAnalysis()

ReDim dist(1 To 2, 1 To Tailleseq)
ReDim seqtot(1 To Tailleseq)

If Not IsNumeric(Tmin.Text) Or Not IsNumeric(Tmax.Text) Or Not IsNumeric(Smin.Text) _
Or Not IsNumeric(Smax.Text) Or Not IsNumeric(Anmin.Text) Or Not IsNumeric(Anmax.Text) _
Or Not IsNumeric(Pemin.Text) Or Not IsNumeric(Pemax.Text) Or Not IsNumeric(Enmin.Text) _
Or Not IsNumeric(Emax.Text) Then
    MsgBox "veuillez insérer des valeurs numériques dans les champs"
    Exit Sub
End If

j = 0
For l = 1 To nbpep
    If num(l) = True Then
        Hmoy = 0
        k = 0
        parasup = True
        ReDim Preserve residu(1 To taille(l))
        ReDim Preserve H(1 To taille(l))
        For i = 1 To taille(l)
            residu(i) = Mid(seq(l), i, 1)
            If residu(i) = "R" Then
                H(i) = -2.5
            ElseIf residu(i) = "K" Then
                H(i) = -1.5
            ElseIf residu(i) = "D" Then
                H(i) = -0.9
            ElseIf residu(i) = "Q" Then
                H(i) = -0.85
            ElseIf residu(i) = "N" Then
                H(i) = -0.78
            ElseIf residu(i) = "E" Then
                H(i) = -0.74
            ElseIf residu(i) = "H" Then
                H(i) = -0.4
            ElseIf residu(i) = "S" Then
                H(i) = -0.18
            ElseIf residu(i) = "T" Then
                H(i) = -0.05
            ElseIf residu(i) = "P" Then
                H(i) = 0.12
                k = k + 1
            ElseIf residu(i) = "Y" Then
                H(i) = 0.26
            ElseIf residu(i) = "C" Then
                H(i) = 0.29
            ElseIf residu(i) = "G" Then
                H(i) = 0.48
            ElseIf residu(i) = "A" Then
                H(i) = 0.62
            End If
        Next i
    End If
Next l

```

```

ElseIf residu(i) = "M" Then
    H(i) = 0.64
ElseIf residu(i) = "W" Then
    H(i) = 0.81
ElseIf residu(i) = "L" Or residu(i) = "V" Then
    H(i) = 1.1
ElseIf residu(i) = "F" Then
    H(i) = 1.2
ElseIf residu(i) = "I" Then
    H(i) = 1.4
End If
Hmoy = Hmoy + H(i)
Next
Hmoy = Hmoy / taille(l)
If txtH.Text <> "" And IsNumeric(txtH.Text) Then
    Hmax = txtH.Text
    If Hmoy < Hmax Then
        parasup = False
    End If
End If
If txtP.Text <> "" And IsNumeric(txtP.Text) Then
    Promax = txtP.Text
    If k > Promax Then
        parasup = False
    End If
End If
If chkAbs.Value = vbChecked Then
    If Abs(Pen(l)) > Pemax.Text Or Abs(Pen(l)) < Pemin.Text Then
        parasup = False
    End If
Else
    Pmin = Pemin.Text
    Pmax = Pemax.Text
    If Pen(l) < Pmin Or Pen(l) > Pmax Then
        parasup = False
    End If
End If

For i = 1 To taille(l)
    dist(1, deb(l) + i - 1) = dist(1, deb(l) + i - 1) + 1
    seqtot(deb(l) + i - 1) = Mid(seq(l), i, 1)
Next i

If taille(l) >= Tmin.Text And taille(l) <= Tmax.Text And deb(l) >= Smin.Text And _
    der(l) <= Smax.Text And Ang(l) > Anmin.Text And Ang(l) < Anmax.Text And _
    ener(l) > Enmin.Text And ener(l) < Enmax.Text And parasup = True Then

    j = j + 1
    ReDim Preserve séquence(1 To j)
    ReDim Preserve debut(1 To j)
    ReDim Preserve fin(1 To j)
    ReDim Preserve resultat(1 To j)
    ReDim Preserve Emin(1 To j)
    ReDim Preserve Angle(1 To j)
    ReDim Preserve pénétration(1 To j)
    debut(j) = deb(l)
    fin(j) = der(l)
    Emin(j) = ener(l)
    pénétration(j) = Pen(l)
    Angle(j) = Ang(l)
    séquence(j) = seq(l)
    resultat(j) = Hmoy

    For i = 1 To taille(l)
        dist(2, deb(l) + i - 1) = dist(2, deb(l) + i - 1) + 1
    Next i

End If
End If
Next l
nbselect = j
rapport = (nbselect / nbtest) * 100
lblstat.Caption = nbselect & " / " & nbtest & " => " & Format(rapport, "##0.0") & " %"

If j <> 0 Then
    d = 1
    ReDim Preserve domaindeb(1 To d)

```

```

ReDim Preserve domainfin(1 To d)
ReDim Preserve domainNb(1 To d)
domaindeb(1) = debut(1)
domainfin(1) = fin(1)
domainNb(1) = 1
For j = 2 To nbselect
    If debut(j) < domainfin(d) Then
        domainNb(d) = domainNb(d) + 1
        If fin(j) > domainfin(d) Then domainfin(d) = fin(j)
    Else
        d = d + 1
        ReDim Preserve domaindeb(1 To d)
        ReDim Preserve domainfin(1 To d)
        ReDim Preserve domainNb(1 To d)
        domainNb(d) = 1
        domaindeb(d) = debut(j)
        domainfin(d) = fin(j)
    End If
Next j
txtresults.Text = "Domain    Nb" & vbCrLf
For i = 1 To d
    txtresults.Text = txtresults.Text & domaindeb(i) & "-" & domainfin(i) _
        & "    " & domainNb(i) & vbCrLf
Next i
End If
End Sub

```

## **Annexe IV**

Crowet J.M., Lins L., Dupiereux I., Elmoualija B., Lorin A., Charloteaux B., Stroobant V., Heinen E., Brasseur R. (2007). Tilted properties of the 67-78 fragment of alpha-synuclein are responsible for membrane destabilization and neurotoxicity. *Proteins* 68, 936-947.



# In Silico tilted properties of the 67–78 fragment of $\alpha$ -synuclein are responsible for membrane destabilization and neurotoxicity

Jean-Marc Crowet,<sup>1\*</sup> Laurence Lins,<sup>1</sup> Ingrid Dupiereux,<sup>2</sup> Benaïssa Elmoualija,<sup>2</sup> Aurélien Lorin,<sup>1</sup> Benoit Charlotteaux,<sup>1</sup> Vincent Stroobant,<sup>3</sup> Ernst Heinen,<sup>2</sup> and Robert Brasseur<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gembloux Agricultural University, Centre de Biophysique Moléculaire Numérique, 2 Passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgium

<sup>2</sup> Laboratoire d'Histologie humaine, Centre de Recherche sur les Protéines Prion, Université de Liège, Institut de pharmacie-CHU, 1 Avenue de l'Hôpital, Sart Tilman, B-4000 Liège, Belgium

<sup>3</sup> Ludwig Institute for Cancer Research - Brussels Branch, 74 Av. Hippocrate, B-1200 Brussels, Belgium

## ABSTRACT

$\alpha$ -Synuclein is a 140 residue protein associated with Parkinson's disease. Intraneural inclusions called Lewy bodies and Lewy neurites are mainly composed of  $\alpha$ -synuclein aggregated into amyloid fibrils. Other amyloidogenic proteins, such as the  $\beta$  amyloid peptide involved in Alzheimer's disease and the prion protein (PrP) associated with Creutzfeldt-Jakob's disease, are known to possess "tilted peptides". These peptides are short protein fragments that adopt an oblique orientation at a hydrophobic/hydrophilic interface, which enables destabilization of the membranes. In this paper, sequence analysis and molecular modelling predict that the 67–78 fragment of  $\alpha$ -synuclein is a tilted peptide. Its destabilizing properties were tested experimentally. The  $\alpha$ -synuclein 67–78 peptide is able to induce lipid mixing and leakage of unilamellar liposomes. The neuronal toxicity, studied using human neuroblastoma cells, demonstrated that the  $\alpha$ -synuclein 67–78 peptide induces neurotoxicity. A mutant designed by molecular modelling to be amphipathic was shown to be significantly less fusogenic and toxic than the wild type. In conclusion, we have identified a tilted peptide in  $\alpha$ -synuclein, which could be involved in the toxicity induced during amyloidogenesis of  $\alpha$ -synuclein.

Proteins 2007; 68:936–947.  
© 2007 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** tilted peptides; hydrophobicity; molecular modelling; Parkinson; lipid-interacting peptides.

## INTRODUCTION

$\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ -syn) is a small protein of 140 residues mainly expressed in neurons in the central nervous system.<sup>1,2</sup> Intraneural inclusions called Lewy bodies and Lewy neurites are mainly composed of  $\alpha$ -syn aggregated into amyloid fibrils and are the common hallmark of several neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies.<sup>3,4</sup>  $\alpha$ -Synuclein is unstructured in solution and its helical content increases in the presence of lipids.<sup>5,6</sup> Structure of the micelle-bound  $\alpha$ -syn has been resolved by Ulmer et al.; it forms two anti-parallel curved  $\alpha$ -helices (3–37 and 45–92) while the acidic C-terminal tail remains unstructured.<sup>7</sup> The sequence of  $\alpha$ -syn is characterized by seven imperfect repeats of eleven residues in the N-terminal domain, containing two lysines per repeat. This region can form amphipathic  $\alpha$ -helices at the liposome surface.<sup>8</sup> The association between  $\alpha$ -syn and the membrane arises from electrostatic and hydrophobic interactions.<sup>9</sup> Lysines form a charged boundary at the hydrophilic/hydrophobic interface<sup>8</sup> and it has been shown that  $\alpha$ -syn preferentially binds to vesicles containing acidic phospholipids.<sup>6</sup>

The central region of  $\alpha$ -syn is crucial for aggregation and cytotoxicity. The region 39–101 forms the fibril core<sup>10,11</sup> and contains the nonamyloid component, a fragment(61–95) found in amyloid plaques of Alzheimer's disease.<sup>12,13</sup> Moreover, the peptide 71–82 has been found to be necessary and sufficient for fibril formation.<sup>14</sup> Several fragments of this region are able to aggregate and induce cytotoxicity *in vitro*.<sup>14–16</sup> El-Agnaf et al.

**Abbreviations:**  $\alpha$ -syn,  $\alpha$ -synuclein; A $\beta$ ,  $\beta$ -Amyloid peptide; CHOL, cholesterol; DPX, *p*-xylene-bis-pyridinium bromide; HCA, hydrophobic cluster analysis; HPTS, 8-hydroxyppyrene-1,3,6-trisulfonic acid; IMPALA, integral membrane protein and lipid association; LUVs, large unilamellar vesicles; MTS, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; R18, octadecyl rhodamine chloride; SIV, simian immunodeficiency virus; SM, sphingomyelin; SUVs, small unilamellar vesicles.

Grant sponsor: Ministère de la Région Wallonne; Grant numbers: 114915, 215140- $\alpha$ BUSTEC; Grant sponsor: National Fund for Scientific Research of Belgium; Grant number: F.N.R.S.-Télévie 7.4.527.05.F; Grant sponsor: Funds for Industrial and Agricultural Research (FRIA).

J.M.C. and L.L. contributed equally to this work.

\*Correspondence to: Jean-Marc Crowet, Centre de Biophysique Moléculaire Numérique, FUSAGx, 2 Passage des déportés, B-5030 Gembloux, Belgium. E-mail: crowet.jm@fsagx.ac.be

Received 15 November 2006; Revised 31 January 2007; Accepted 20 February 2007

Published online 6 June 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/prot.21483

define the peptide 68–76 as the minimum toxic fragment.<sup>16</sup> Moreover, this region shows sequence similarity with domains of the  $\beta$  amyloid peptide (A $\beta$ ) and the PrP protein crucial for aggregation and cytotoxicity.<sup>15</sup>

In these two major amyloidogenic proteins implicated in neurodegenerative disorders, we have detected fragments that have an asymmetric distribution of their hydrophobic amino acids when helical, resulting in a hydrophobicity gradient.<sup>17,18</sup> This property is a feature of the so-called “tilted peptides”.<sup>19</sup> Because of the gradient, tilted peptides adopt an oblique orientation towards a hydrophobic/hydrophilic interface as in biological membranes. This tilted insertion is thought to disturb the parallelism of lipid acyl chains.<sup>19–21</sup> Indeed, tilted peptides induce liposome fusion, whereas mutations leading to loss of this tilted orientation do not.<sup>22–24</sup> Furthermore, it should be noted that tilted peptides present a structural lability that could be important for their destabilizing activity.<sup>24–26</sup> Structural approaches, like polarized infrared spectroscopy (ATR-FTIR), have shown that the fusion depends on the helix formation and orientation into lipid bilayers.<sup>24,27,28</sup> The existence of this type of peptides has been confirmed by the neutron diffraction studies on the fusion peptide of SIV (Simian immunodeficiency virus)<sup>29</sup> and Han et al. have shown by NMR and EPR analysis that the fusion domain of Influenza hemagglutinin HA2 presents an angle close to 40° when inserted into a lipid bilayer.<sup>30</sup>

Thus tilted peptides often play a functional role in the proteins in which they are found.<sup>20,31</sup> The presence of such fragments in amyloidogenic proteins has led to the proposal that tilted peptides could be involved in the toxicity associated with them,<sup>17,18,20</sup> and indeed tilted peptides of A $\beta$  and PrP were found in areas undergoing conformational changes and known to be important for toxicity.<sup>17,18,32,33</sup>

Since tilted peptides were detected in A $\beta$  and PrP, we asked whether such fragments could be present in  $\alpha$ -syn. By sequence analysis and molecular modelling, we predicted a tilted peptide corresponding to the 67–78 fragment of  $\alpha$ -syn. This peptide was experimentally tested for lipid-mixing and leakage to highlight its lipid destabilizing properties. Its neuronal toxicity was studied using human neuroblastoma cells. Mutants were designed by molecular modelling to assess the role of the hydrophobicity gradient in lipid destabilization and neurotoxicity.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Egg phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), cholesterol (CHOL), and sphingomyelin (SM) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Egg

phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylinositol (PI) were obtained from Lipid Products (Redhill, Surrey, UK). Octadecyl rhodamine chloride (R18), 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS), and *p*-xylylene-bis-pyridinium bromide (DPX) came from Molecular Probes (Eugene, OR). Buffers used were 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.01% EDTA and 1 mM NaN<sub>3</sub> (pH 7.4). Buffers used for circular dichroism measurements were 1 mM Tris-HCl (pH 7.4). All cell culture supplies were purchased from Life Technologies. Peptides were amidated at the C-ter and acetylated at the N-ter. The peptides were synthesized by conventional solid phase peptide synthesis, using Fmoc for transient NH<sub>2</sub>-terminal protection and were characterized using mass spectrometry. The  $\alpha$ -synuclein peptide (GGAVVTGVTAVA) and the mutant  $\alpha$ -synuclein peptide (GGAVSAGVASVT) were 80 and 90% pure, respectively.

## Methods

### Sequence analysis

**The hydrophobic cluster analysis.** Hydrophobic cluster analysis (HCA) plot represents the protein sequence as an unrolled cylinder on which the sequence is written to simulate an  $\alpha$ -helix. This view is duplicated to restore the environment of each amino acid.<sup>34</sup> In this plot, the hydrophobic amino acids (M, I, L, V, F, Y, W) are circled and hatched. Alanine is considered as hydrophobic when it is surrounded by a least three hydrophobic residues. Hydrophobic clusters, varying in length and shape, define specific secondary structures.<sup>34</sup>

**The Jähnig's plot.** In the Jähnig's plot, a mean of the hydrophobicity ( $\langle H\alpha \rangle$ ) is attributed to each residue based on a 17-residue window. The Jähnig's equation gives more importance to residues close in terms of secondary structure [see Eq. (1)].<sup>35</sup> In this plot, amphipathic  $\alpha$ -helix can be predicted as regularly oscillating curve. Tilted peptides are found as ascending or descending oscillations.<sup>20</sup>

$$\langle H\alpha_{(i)} \rangle = \frac{h_{(i\pm 8)} + h_{(i\pm 7)} + \frac{1}{4}h_{(i\pm 5)} + h_{(i\pm 4)} + \frac{3}{4}h_{(i\pm 3)} + \frac{1}{2}h_{(i\pm 1)} + h_{(i)}}{10} \quad (1)$$

### Molecular modelling of the peptides

$\alpha$ -Helical peptides were 3D-built using Hyperchem 6.0 (Hypercube Inc.). As previously described, the  $\alpha$ -helix structure is calculated using bond lengths and valence angles of the AMBER united atom forcefield.<sup>36</sup> Conformation of the side chains were optimized by the conjugate gradient method of Polak-Ribiere.



### The IMPALA method

IMPALA (integral membrane protein and lipid association) is a method that enables simulation of the insertion of a molecule (peptide, protein, drug) into a modelled membrane.<sup>37</sup> The latter is described by a function  $C_{(z)}$ , which varies along the  $Z$  axis (outside the membrane,  $C_z$  is equal to 1 and in the membrane core,  $C_z$  is equal to 0). Hence there is no lipid molecule physically represented. The presence of water (and hence the lipids) is modelled implicitly by the  $C_{(z)}$  function that can be considered as the water concentration.  $Z$  is normal to the membrane surface and its origin is at the centre of the membrane.

$$C_{(z)} = 1 - \frac{1}{1 + e^{\alpha(|z|-z_0)}} \quad (2)$$

where  $z_0$  and  $\alpha$  are fixed at such values that  $C_{(-13.5 \text{ \AA})}$  to  $C_{(13.5 \text{ \AA})} = 0$ ,  $C_{(18 \text{ \AA})}$  to  $C_{(\infty)} = 1$ , and  $C_{(-18 \text{ \AA})}$  to  $C_{(\infty)} = 1$ . The  $C_{(z)}$  function is continuous and constant in the  $XY$  plane. The domain from  $|z| = 18$  to  $13.5 \text{ \AA}$  corresponds to the polar head of lipid and domain from  $|z| = 13.5$  to  $0 \text{ \AA}$  to the hydrophobic tails of phospholipids.<sup>37</sup>

The interaction between a peptide and the modelled membrane is simulated by the sum of two restraints ( $E_{\text{env}}$ ) that mimic the properties of the membrane: one simulates the hydrophobic effect ( $E_{\text{int}}$ ), which pushes hydrophobic atoms into the membrane, and the other accounts for the lipid-like perturbation ( $E_{\text{lip}}$ ), which is because of the insertion of the molecule in the organized lipid phase.<sup>37</sup> For the peptide (or any molecule), each atom contribution is taken into account to provide the total restraint.

$$E_{\text{env}} = E_{\text{int}} + E_{\text{lip}} \quad (3)$$

$$E_{\text{int}} = - \sum_{i=1}^N S_{(i)} E_{\text{tr}(i)} C_{(z_i)} \quad (4)$$

$$E_{\text{lip}} = \alpha_{\text{lip}} \sum_{i=1}^N S_{(i)} (1 - C_{(z_i)}) \quad (5)$$

where  $N$  is the total number of atoms,  $S_{(i)}$  is the solvent accessible surface of the atom  $i$ ;  $E_{\text{tr}(i)}$  is the transfer energy of the atom  $i$ , and  $C_{(z_i)}$  is the value of the  $C_{(z)}$  function at the position  $z_i$  of the atom  $i$ .  $\alpha_{\text{lip}}$  is a positive empirical factor fixed at 0.018.<sup>37</sup>

The behavior of peptides in the modelled membrane was analyzed by a systematic procedure. Taking steps of  $1 \text{ \AA}$  along the  $Z$  axis through the membrane,  $E_{\text{env}}$  was calculated for 5000 random orientations of the peptide in a helical conformation. The position of the structure with the lowest restraint values is considered as the most stable in the bilayer. From there, an IMPALA optimization was performed using a Monte-Carlo simulation of 500 steps. Random rotations of  $1^\circ$  max and random translations of  $0.5 \text{ \AA}$  max of the peptide were allowed. Side chain motions are taken into account by the angular dy-

namics applied at each step of the IMPALA optimization. Since the lipids are only represented by their properties in IMPALA, it does not permit the effect of the peptide on the lipid structure and hence the membrane disruption to be examined.

### Angular dynamics optimization

To analyze structural variations of the peptide inserted in the membrane, we have used the angular dynamics procedure previously defined to simulate the protein folding and described elsewhere.<sup>38,39</sup>

In the simulations, the total energy ( $E_{\text{tot}}$ ) is the sum of the intramolecular energy of the peptide ( $E_{\text{intra}}$ ) and the energy due to the membrane environment ( $E_{\text{env}}$ ) (see supra).  $E_{\text{tot}}$  is distributed at each step of the calculation on the peptide torsion  $k$ -axis. This total energy is equal to:

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{intra}} + E_{\text{env}} = \sum_k E(k) \quad (6)$$

The total energy associated with each torsion axis ( $E(k)$ ) is therefore represented by the sum of the following:

- the torsion energy of the  $k$  axis ( $E(k)_{\text{tor}}$ ),
- the intramolecular interaction energies (corresponding to the Van der Waals energy  $E_{\text{vdw}}$ , the electrostatic energy  $E_{\text{elec}}$ , and the hydrophobic energy  $E_{\text{pho\_in}}$ ) between atoms  $i$  and  $j$ , divided by the number of axes between these atoms,
- the energy in the membrane for the atoms  $i$  and  $j$  divided by the number of atoms of the system minus 1 ( $N - 1$ ) and by the number of axes between atoms  $i$  and  $j$ .

$$E(k) = \underbrace{E(k)_{\text{tor}}}_A + \underbrace{\sum_{i=1}^W \sum_{j=w+1}^N f (E_{\text{vdw}}^{ij} + E_{\text{elec}}^{ij} + E_{\text{pho\_in}}^{ij})}_B + \underbrace{\sum_{i=1}^W \sum_{j=w+1}^N f \frac{E_{\text{env}}}{N-1}}_C \quad (7)$$

with  $f = 1/\text{number of axes between } i \text{ and } j$ .

The energy  $E(k)$  enables calculation of an angular dynamics that gives rise to an acceleration of torsion axes. During the dynamics, the length of atomic bonds and the value of valence angles are kept constant, only torsion angles are modified. All calculation of energies, angular acceleration, and rotational velocity are described in details in Lins et al.<sup>38</sup>

### Restraints map

Diagrams showing the restraint values ( $E_{\text{env}}$ ) vs. the angle between the helix axis and the bilayer normal and

vs. the penetration of the center of the mass are obtained as follows: for each degree (angle) and for each Å (penetration), the lowest restraint value obtained during IMPALA simulation is taken. All the points are then joined to generate a 3D-map.

#### Peptide structure prediction by a stochastic procedure

On the basis of a stochastic algorithm, peptide structures in different environments can be predicted. In the present case, the environment is a lipid bilayer, simulated by IMPALA. The stochastic method uses a *de novo* search of energy minima by an iterative stochastic procedure and is described in details by Thomas et al.<sup>40</sup> From the sequence, the procedure generates  $100 \times 10^4$  structures using  $\phi/\psi$  couples randomly selected among 64 couples derived from the structural alphabet for protein structures proposed by Etchebest et al.<sup>41</sup> At each iteration of  $10^4$  structures, structure energies are calculated and the values are ranked. Energies calculated for each generated structure include intramolecular energies (Van der Waals, electrostatic, etc.) and IMPALA restraints. The 100 conformations of highest energy on the one hand, and the 100 structures of lowest energy on the other, are compared. When a  $\phi/\psi$  couple yields only energetically unfavorable structures, its probability is decreased for the following iterations. When a  $\phi/\psi$  couple yields only favorable structures, its probability is increased for the following iterations. Calculations are stopped after 100 iterations. Throughout the procedure, structures of low energy are retained; the best 99 models are selected and the energy is minimized using a simplex method.<sup>42</sup> All energy calculations are described in details elsewhere.<sup>40</sup> This stochastic algorithm is used by the peptide server PepLook, which was developed by Biosiris-Peptides (Gembloux, Belgium).<sup>43</sup>

#### Liposome preparation

Small unilamellar vesicles (SUVs) and large unilamellar vesicles (LUVs) were used in our experiments. These vesicles were prepared from a solution of multilamellar vesicles (MLV) obtained after hydration for 1 h at 37°C of dry lipid films. These films were mixtures by weight of 26.6% PC, 26.6% SM, 26.6% PE, and 20.2% CHOL for neutral liposomes and 30% PC, 30% PE, 2.5% PI, 10% PS, 5% SM, and 22.5% CHOL for acidic liposomes. For the SUV preparation, the MLV suspension was sonicated for 15 min. Following this samples were centrifugated for 10 min at 2000g. LUVs were prepared by the extrusion technique of Mayer et al.<sup>44</sup> The MLV suspension was submitted to five successive cycles of freezing and thawing and thereafter extruded 10 times through stacked polycarbonate filters (pore size, 0.08  $\mu$ M), under a nitrogen pressure of 20 bars using an extruder (Lipex Biomembranes, Vancouver Canada). The concen-

tration of the liposome suspensions was determined by phosphorus analysis.<sup>45</sup>

#### Lipid-mixing experiments

Mixing of the lipid phase of liposomes can be followed using R18, a lipid soluble probe.<sup>46</sup> In the labelled liposome population, R18 is self-quenched and represents 6.5% of the total lipid weight. When labelled liposomes fuse to unlabelled liposomes, R18 fluorescence increases due to the probe dilution. The weight ratio of labelled to unlabelled liposomes is 1:4 and the final concentration is between 12.5 and 50  $\mu$ M. R18 fluorescence ( $\lambda_{exc}$ , 560 nm;  $\lambda_{em}$ , 590 nm) is measured on a Perkin-Elmer LS-50B fluorimeter.

#### Leakage of liposome vesicle contents

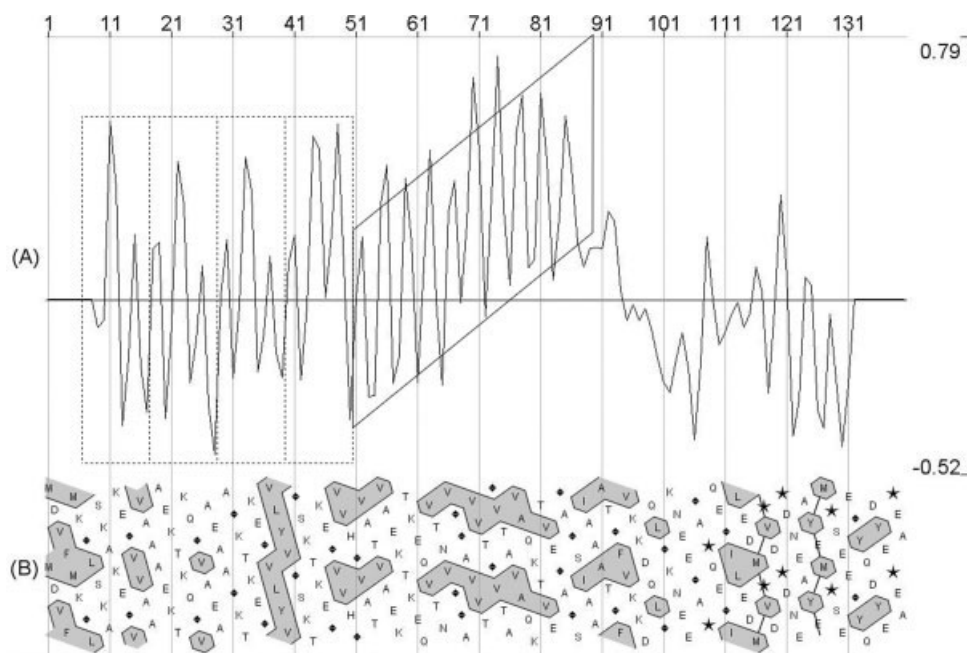
Membrane perturbation and vesicle release can be measured by the assay of Ellens et al.<sup>47</sup> based on the quenching of HPTS by DPX. HPTS and DPX were co-encapsulated in the aqueous phase of the same liposomes. When leakage of vesicle content occurs, the quenching by DPX decreases and the fluorescence of HPTS increases. HPTS fluorescence was measured on a Perkin-Elmer LS-50B fluorimeter ( $\lambda_{exc}$ , 360 nm;  $\lambda_{em}$ , 520 nm). Liposomes were prepared as described above but were rehydrated with 1 mL of 12.5 mM HPTS (45 mM NaCl), 45 mM DPX (20 mM NaCl), and 10 mM Tris-HCl at pH 7.4 and passed through a Sephadex G-75 column to removed unencapsulated material.

#### Circular dichroism measurements

CD spectra were recorded on a Jasco J-815 CD spectrometer with 10-mm path length quartz cuvettes. Ten scans were taken and automatically averaged in the wavelength range from 190 to 250 nm. Peptide secondary structures were determined using CDpro software package, which involved CDSSTR, SELCON3, and CONTINLL methods.<sup>48</sup> Percentages were calculated by averaging the percentages provided by the three methods. The peptides stock solutions used for the measurements were diluted in 1 mM Tris buffer at pH 7.4, or in TFE to reach a concentration of 10  $\mu$ M.

#### Cell culture

Human SH-SY5Y neuroblastoma cells, kindly provided by Professor Nigel M. Hooper, were cultured in Dulbecco's minimum Eagle medium (DMEM) (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies), 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies); cells were maintained at 37°C in a humidified incubator under 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. For experiments, cells were maintained in FBS-free DMEM medium containing the neuroblastoma growth



**Figure 1**

(A) Jähniq profile of the  $\alpha$ -synuclein protein. The four first repeats have been boxed (dotted lines) and the domain presenting a hydrophobicity gradient is boxed in continuous line. (B) HCA plot of the  $\alpha$ -synuclein sequence. V, F, W, Y, M, L, and I are hydrophobic. These amino acids are circled and hatched to form hydrophobic clusters. G is represented by  $\blacklozenge$  and P by a star. By default, A is hydrophilic but when three or more hydrophobic residues surround it, alanine is considered as hydrophobic.

supplement N<sub>2</sub> (Life technologies) and 1% penicillin/streptomycin.

### Cell viability assay

Lyophilized 67–78 peptide of  $\alpha$ -synuclein and the mutant were dissolved in sterile phosphate-buffered saline at a concentration of 1 mM (stock solution) and freshly prepared aliquots were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. For the cellular toxicity experiments, the peptides were dissolved in culture medium to reach the desired concentration (25–400  $\mu\text{M}$ ), soon before being added to the cells.

Human SH-SY5Y cells were seeded into 96-well culture plates and allowed to attach. Sixteen hours after seeding, the medium was replaced with serum-free medium containing the neuroblastoma growth supplement N<sub>2</sub> and the cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of peptides.

The cell viability was measured using the CellTiter 96 AQueous nonradioactive cell proliferation assay (Promega) according to the manufacturer's instruction. The cell toxicity was assessed quantitatively by MTS assay in the presence of phenazine methosulfate (PMS). After addition of 20  $\mu\text{L}$  of the combined MTS/PMS solution in each well, the plates were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for 2 h. The absorb-

ance was measured at 490 nm (EL 312e microplate Bio-Tek Instruments).

All MTS assays were performed in triplicate experiments, each repeated three times. MTS assay is a sensitive indicator of mitochondrial activity.

## RESULTS

### Sequence analysis

Tilted peptides are usually identified using methods based on hydrophobicity such as Jähniq and HCA plots.<sup>20</sup> The Jähniq method allocates at each residue a mean hydrophobicity, giving more weight to neighboring residues in terms of secondary structure. In  $\langle H\alpha \rangle$  Jähniq profiles, amphipathic helices appear as oscillations with a periodicity of 3–4 amino acids and tilted peptides as increasing or decreasing oscillations, according to the hydrophobic gradient.<sup>20</sup> The  $\langle H\alpha \rangle$  Jähniq profile of  $\alpha$ -syn shows three zones, an amphipathic domain (Sequence 1–50) defined by regular oscillations, a domain presenting increasing hydrophobicity (Sequence 51–89) and a hydrophilic tail (Sequence 90–140) defined by irregular oscillations [Fig. 1(A)]. The first domain corresponds to four imperfect repeats of eleven residues and each presents similar oscillation. However, the 51–89 domain, which

**Table I**

Mean Hydrophobicity and IMPALA Results for Fragments of the 63–82 Region of  $\alpha$ -Synuclein Presenting Tilted Peptide Properties

	Mean hydrophobicity <sup>a</sup>	Mass center position (Å) <sup>b</sup>	Angle of insertion (°) <sup>c</sup>	Peptide sequence
Sequence 63–78	0.56	–8.5	43	VTNVGGAVVTGVTAVA
Sequence 66–78	0.67	–9.3	31	VGGAVVTGVTAVA
Sequence 67–78	0.63	–10	31	GGAVVTGVTAVA
Sequence 68–78	0.65	–10.8	33	GAVVTGVTAVA

<sup>a</sup>Mean hydrophobicity was calculated using the consensus scale of Eisenberg.<sup>49</sup>

<sup>b</sup>The mass center (MC) position is the distance between the MC and the bilayer center.

<sup>c</sup>The angle is calculated between the helix axis and the bilayer normal.

includes the three other repeats, presents regular ascending oscillations characteristic of tilted peptides. Irregular oscillations of the 90–140 domain indicate that it does not form an amphipathic helix.

HCA plots represent the sequences as  $\alpha$ -helices in a 2D view. This graphical representation allows the detection of hydrophobic clusters whose shape and length can be related to secondary structures and hydrophobic properties. The HCA diagram of the  $\alpha$ -syn sequence is presented in Figure 1(B). Within the domain presenting increasing hydrophobicity, the 63–82 region is enriched in hydrophobic residues and glycines while containing few polar and charged residues. It was previously shown that tilted peptides present this distribution of amino acids.<sup>19</sup>

The two methods suggest that the 63–82 region could contain a tilted peptide. The mean hydrophobicity of tilted peptides, calculated on the basis of the Eisenberg consensus hydrophobicity scale ranges from 0.16 (tilted peptide of lipoprotein lipase) to 0.93 (tilted peptide of SIV).<sup>31,49</sup> Thus, the mean hydrophobicity of various fragments within the 63–82 region of  $\alpha$ -syn was calculated and fragments with a mean hydrophobicity greater than 0.2 were modelled and tested using IMPALA (Table I).

### Molecular modelling of the peptides

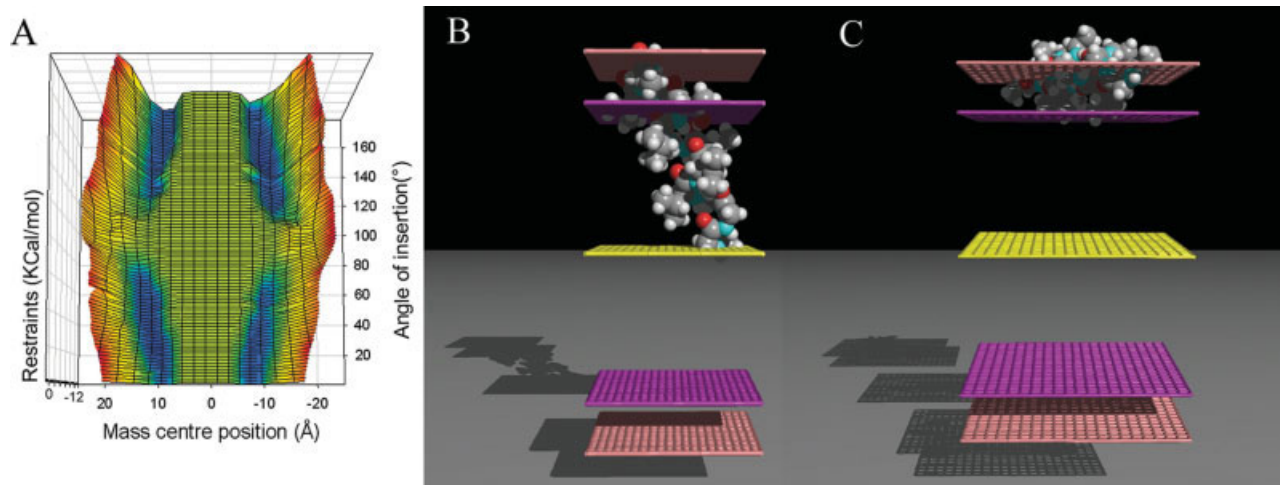
Fragments with sufficient hydrophobicity were then 3D built as helices. To predict their behavior in a membrane, calculations were carried out in three steps. Firstly, an IMPALA systematic procedure was used for the selection of the best tilted peptide from 10 candidates corresponding to different fragments from the 63–82 region. Restraints were calculated for a great number of positions of each peptide in the modelled bilayer. Secondly, an IMPALA optimization was performed from the structure with the lowest restraint value (after the first step) by applying an angular dynamics at each IMPALA step (see methods). This step enables evaluation of the structural fluctuations of the peptide from the alpha helical model. The third step corresponds to the stochastic approach, allowing the analysis of the peptide's structural propen-

sity in the model membrane. In this method, no assumption is made about the initial conformation of the peptide; it starts from the sequence of the peptide selected after the two first steps.

Table I corresponds to the fragments selected after the first calculation step. These fragments present tilted properties, i.e. a high hydrophobicity, a position of the mass center near the phospholipid headgroup/acyl chain interface in the model membrane, and a tilt between 30° and 60°. The 67–78 peptide was chosen for further analysis, since it has a length of 12 residues corresponding to the minimal length for stable helical structure and fits the other criteria of tilted peptides. The most stable position of this fragment corresponds to an angle towards the interface plane around 31° and its mass centre is about 10 Å from the bilayer centre (Table I). Figure 2(A) shows the corresponding restraint map. This peptide is able to adopt four metastable positions within the membrane, two on each side of the membrane. If we consider only a layer, the most stable position corresponds to a tilt between 20° and 40° and a penetration of 10 Å [Fig. 2(A)]. The existence of metastable positions has already been observed for tilted peptides and are thought to contribute to their destabilizing activity.<sup>19</sup>

To further predict the structural stability of the helical conformation of the  $\alpha$ -syn peptide into a lipid environment and to improve the modelling of the peptide-membrane interaction, angular dynamics were carried out. The peptide remains helical during the procedure (data not shown). The RMS deviation between the structures before and after angular dynamics is 1.48 Å.

To improve the study of the peptide structure in a modelled membrane without allocating an initial secondary structure, an iterative stochastic procedure was used (third step of calculation). After 100 iterations, the results showed that the first three residues of the wild type (WT) peptide adopted a random coil conformation while the other residues were helical. The RMS deviations between the lowest energy structure and the other 98 selected models was under 1 Å, suggesting a low structural lability when the molecule is taken as isolated. Hence, the helical model seems a reasonable hypothesis

**Figure 2**

(A) 3D plot of the 67–78 peptide represents the restraints vs. the helix axis angle (with respect to the bilayer normal) and vs. the mass centre penetration calculated as described in Methods. Restraints increase from blue to red. (B, C) View of the WT peptide and the mutant peptide respectively in the optimal conformation from the stochastic procedure. Mid plane = bilayer center ( $z = 0$ ); first upper (bottom) plane = lipid acid chain/polar headgroups interface at 13.5 Å from the center, second upper (bottom) plane = lipid/water interface ( $z = 18$  Å).

for the modelling approach. The stochastic procedure also provides the optimal conformation of peptide in the IMPALA implicit bilayer [Fig. 2(B)].

### Design of mutants

To assess the importance of the hydrophobicity gradient for the destabilizing activity of the peptide and hence for the fusion process, “non-tilted” mutants were designed by molecular modelling, as previously shown for other tilted peptides.<sup>22–24</sup> Mutants were built to adopt a parallel orientation to the lipid bilayer surface. Whenever possible, residue permutations were preferentially chosen; otherwise, substitutions with small amino acids like serine, were carried out.<sup>50</sup> Sixty five mutants were designed and IMPALA simulations were run for all the peptides. From these simulations, four mutants were predicted to be parallel to the membrane surface. They are listed in Table II. The SynuM53 mutant (2 permutations and 2 substitutions), oriented parallel to the mem-

**Table II**

Mutants Designed Without Hydrophobicity Gradient

	Mean hydrophobicity <sup>a</sup>	Angle of insertion (°) <sup>a</sup>	Peptide sequence
SynuM40	0.31	86	GGAQVTGVTQA
SynuM44	0.47	89	GGAVQAGVATVT
SynuM53	0.52	91.5	GGAVSAGVASVT
SynuM65	0.46	89.5	GGSVTAGVASVT

<sup>a</sup>Hydrophobicity and angles are calculated as in Table I.

brane, has the mean hydrophobicity value closest to the WT.

The conformation of the mutant was computed by an iterative stochastic procedure, as for the WT [Fig. 2(C)]. The best structures were similar, only the last residue of the mutant adopts a random coil conformation in addition to the three first residues.

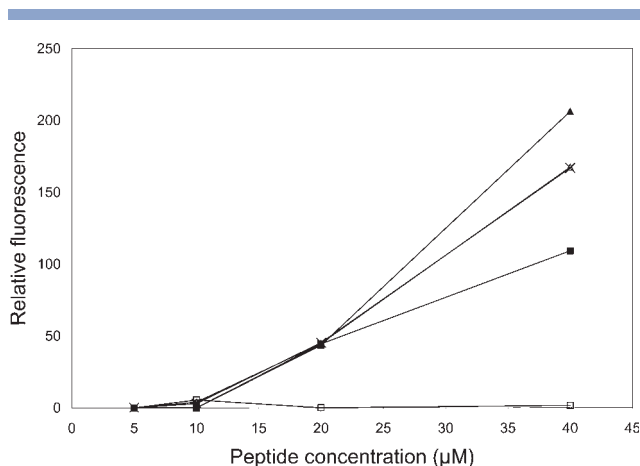
### Circular dichroism measurements

The secondary structure of the  $\alpha$ -syn peptides was evaluated from the measurement of their CD spectra at increasing concentration of TFE. The 67–78 peptide and the SynuM53 mutant undergoes significant structural modifications (from 5 to 40% helix), while increasing the TFE amount (Table III). This suggests a structural plasticity for the peptide, depending on the environment.

**Table III**

Secondary Structure (%) of the WT and Mutant  $\alpha$ -Synuclein Peptides Determined from CD Measurements

	$\alpha$ -Helix (%)	$\beta$ -Sheet (%)	Turns (%)	Unordered (%)
100% TFE				
WT	40.5	15.5	18.1	26.7
Mutant	39.3	17.9	18.4	24.7
50% TFE				
WT	18.9	22.8	21.9	33
Mutant	17.9	27	21.9	33.1
0% TFE				
WT	5.3	27.1	23.1	42.8
Mutant	5.8	29	22.7	40.2



**Figure 3**

Fusion induced by the  $\alpha$ -syn peptide and the synuM53 mutant as a function of peptide concentration. The relative fluorescence of the R18 probe is measured after 15 min of incubation. The fluorescence observed without peptides was subtracted. WT  $\alpha$ -syn peptide in the presence of neutral SUVs ( $\blacktriangle$ ), charged SUVs ( $\blacksquare$ ), neutral LUVs ( $\triangle$ ), charged LUVs ( $\times$ ), and synuM53 mutant in the presence of neutral SUVs ( $\square$ ).

The structural lability is a feature observed for almost all tilted peptides studied until now.<sup>24–26</sup> It was shown that increasing the TFE content allows highlighting structural lability.<sup>51</sup>

### Lipid-mixing and leakage assays

From the modelling approaches, the 67–78 fragment of  $\alpha$ -syn was predicted to adopt a tilted orientation to the membranes. Since tilted peptides induce liposome fusion *in vitro* because of their destabilizing activity on membranes,<sup>17,18,20,22–24</sup> the  $\alpha$ -syn tilted peptide was probed for lipid-mixing and leakage experiments.

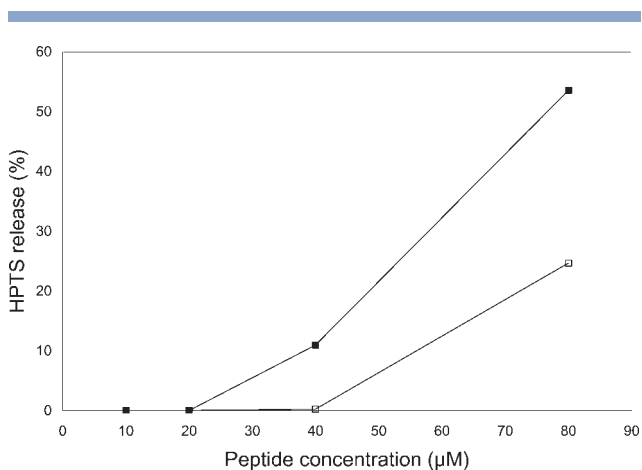
The peptide, dissolved in TFE or HFP/TFE, was added to a mixture of unlabelled liposomes and R18-labelled liposomes. When lipid-mixing between vesicles occurs, an increase in R18 fluorescence was observed because of the dilution of the lipophilic probe. Different experimental conditions were tested. We have used small (SUV) or large (LUV) liposomes composed of lipids with either a global neutral charge (PC, PE, SM, CHOL) or with acidic lipids (PC, PE, PI, PS, SM, CHOL). The R18 fluorescence intensity was recorded after 15 min. Figure 3 shows that the peptide causes lipid mixing whatever the liposome type (LUV or SUV, with acidic lipids or not) in a concentration-dependent way. This effect was maximal at 40  $\mu$ M, corresponding to a molar peptide/lipid ratio of 1.6 (Fig. 3). The mutant peptide was tested in the same conditions as the  $\alpha$ -syn WT. The lipid-mixing experiments clearly showed that the synuM53 mutant does not induce significant liposome fusion (Fig. 3). It should be noted that when the peptide solution was

replaced by TFE, no significant effect on R18 fluorescence was observed. This suggests that there was no significant spontaneous vesicle fusion.

To rule out diffusion of R18 without true lipid fusion (due for example to vesicle aggregation) we carried out leakage assays. For this, HPTS and DPX were encapsulated in the same liposomes. When liposomes containing HPTS-DPX are destabilized, the two probes are released into the medium, and there is a dequenching of the HPTS and an increase of fluorescence. Since the lipid-mixing was optimal with uncharged SUVs, only those liposomes were used. Experiments showed that the  $\alpha$ -syn tilted peptide induced significant release of HPTS (Fig. 4). Leakage assays also showed almost 50% decrease in HPTS release for the mutant (Fig. 4), confirming a loss of destabilizing capacities, in agreement with the modelling approaches.

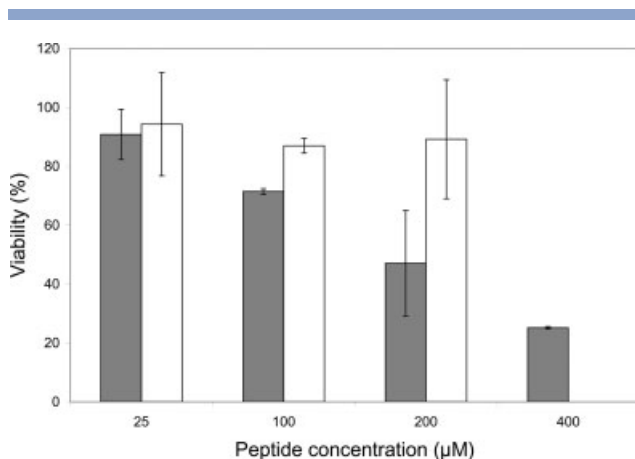
### In Vitro cytotoxicity of the $\alpha$ -synuclein 67–78 peptide and the SynuM53 mutant on human neuroblastoma cells

Neuronal injuries induced by the  $\alpha$ -syn 67–78 peptide were monitored by measuring the reduction of the mitochondrial activity using the MTS assay. MTS is converted to a formazan product by dehydrogenase enzymes, which becomes inactive as the cells suffer. Measurement of this formazan product is an indicator of cell metabolism and viability. As shown on Figure 5, treatment of the  $\alpha$ -syn 67–78 peptide induced a concentration-dependent decrease in the number of active cells, while the SynuM53 mutant peptide treatment showed no significant effect. Indeed, MTS reduction (cell viability) was significantly affected by the 67–78 peptide at concentrations from



**Figure 4**

Leakage of neutral SUVs induced by the WT  $\alpha$ -syn peptide ( $\blacksquare$ ) and the synuM53 mutant ( $\square$ ) as a function of peptide concentration. The relative fluorescence obtained after addition of 25  $\mu$ L of Triton X-100 (1%) is 100%. The HPTS fluorescence is measured after 15 min. The fluorescence observed without peptides was subtracted.



**Figure 5**

WT  $\alpha$ -syn peptide (filled bars) and synuM53 mutant (open bars) were added at concentrations of 25–400M (400M not determined for the synuM53 mutant). Cell metabolism (SH-SY5Y cell line) was measured 24 h later using the MTS assay. Each value represents the mean percentage of cell survival (MTS assay) standard deviations from triplicate experiments repeated three times (nine observations).

400 to 100  $\mu$ M over a 24 h period (around 25% viability for 400  $\mu$ M). In contrast, the peptide exerted no toxic properties at lower concentrations.

## DISCUSSION

The existence of tilted peptides was first predicted by molecular modelling approaches (tilted peptides of NDV (Newcastle disease virus), SIV, BLV (bovine leukemia virus), etc.)<sup>23,52,53</sup> and supported later by various experimental techniques like polarized ATR-FTIR spectroscopy, NMR, EPR, or neutron diffraction.<sup>24,29,30</sup> Tilted peptides are defined as short peptides with a minimal mean hydrophobicity of 0.2 (Eisenberg's scale) and an asymmetric distribution of their hydrophobic residues (hydrophobicity gradient) when helical. These properties allow a tilted orientation of the peptides at a hydrophilic/hydrophobic interface.<sup>20</sup> Since tilted peptides were detected in A $\beta$  and PrP,<sup>17,18</sup> two proteins involved in neurodegenerative diseases, we asked whether such fragments could be present in  $\alpha$ -syn, the main protein linked to Parkinson's disease. It should be noted that the  $\alpha$ -syn central region presents a sequence similarity with regions including the A $\beta$  and PrP tilted peptides, further supporting this hypothesis.<sup>15</sup>

From the Jähnig's plot, it was predicted that the 1–89 domain of  $\alpha$ -syn is amphipathic. This corresponds to the behavior of this protein in presence of lipids.<sup>6</sup> The structure of the micelle-bound  $\alpha$ -syn has been resolved by NMR and it was reported that  $\alpha$ -syn forms two anti-parallel amphipathic helices (helix-N 3–37; helix-C 45–92).<sup>7</sup> On the Jähnig plot, we also observed an increase in

hydrophobicity in the 51–89 region of  $\alpha$ -syn, with the oscillations remaining regular. In the HCA plot, this corresponds to the most hydrophobic domain of  $\alpha$ -syn. Within this domain, the 63–82 region, rich in glycine, alanine and valine, has the characteristic amino acid composition of tilted peptides.<sup>19</sup> This is in agreement with the study of Du et al., underlying the importance of the  $\alpha$ -syn composition of this region.<sup>54</sup> The IMPALA simulations predict that the 67–78 peptide is able to insert obliquely into the model membrane. In addition, the peptide belongs to the class A of tilted peptides, since it has access to the two layers of the model membrane.<sup>19</sup> This could lead to metastable positions and enable the peptide to have access to a wide conformational space. The effects of the tilted peptide on the lipid organization were further established by studying the molecular interaction between the peptide and the lipid molecules using the Hypermatrix method (data not shown).<sup>55</sup> The tilted peptide was able to destabilize the lipid organization, inducing a negative monolayer curvature, which was shown to be important in the fusion process.<sup>19,27</sup>

The dynamic and stochastic calculations showed that when the peptide was taken as an isolated molecule in a hydrophobic environment, the helical conformation appeared very stable. The 99 structures provided by the stochastic procedure were mainly helical. The RMS deviations between structures were under 1 Å.

The 67–78 peptide was further tested *in vitro* for its lipid destabilizing activity. The WT  $\alpha$ -syn peptide 67–78 induced fusion and altered the permeability of liposomes and therefore could be considered as belonging to the class of tilted peptides. Fusion was observed with different types of liposome but was more important for the noncharged SUVs. This is in apparent contradiction with the results of Davidson et al., showing that the whole  $\alpha$ -syn interacts preferentially with small charged vesicles.<sup>6</sup> This discrepancy could be due to the fact that the N-terminal domain of  $\alpha$ -syn contains positively charged residues that are not present in the 67–78 peptide.

It was previously shown for other tilted peptides, such as the N-terminal domain of the gp32 of SIV, that the hydrophobicity gradient is responsible for the lipid destabilization.<sup>24</sup> To test the importance of the hydrophobicity distribution, we designed mutants by molecular modelling, one of which was experimentally probed in detail. Results obtained with the SynuM53 mutant peptide suggest that the lipid destabilization was related to the hydrophobicity gradient. Indeed, the mutant peptide, without a hydrophobicity gradient, did not induce fusion and led to significantly less leakage. The hydrophobic distribution also appeared to have a role in cell toxicity. We showed that the tilted fragment was neurotoxic, inducing the death of neuroblastoma cells, while the nonoblique mutant was not toxic.

How do the tilted properties of the 67–78  $\alpha$ -syn fragment relate to the neurotoxicity of  $\alpha$ -syn? Firstly, the

interaction of this fragment in the whole protein with the membrane could lead to cell death by either direct perturbation of the membrane organization or by helping formation of a pore. We have very recently suggested that tilted peptides could help formation of pores in colicin E1.<sup>56</sup> Pore formation could be related to the neurotoxicity of  $\alpha$ -syn in an oligomeric form. Several studies have suggested that prefibrillar oligomers could be the pathogenic species instead of the mature fibrils,<sup>57,58</sup> because two  $\alpha$ -syn mutations causing early-onset Parkinson's disease have been shown to accelerate oligomerization, rather than fibrillation.<sup>57</sup> Several studies have shown that ring-shaped  $\alpha$ -syn protofibrils could form pores and induce vesicle permeabilization.<sup>59–61</sup> This was also suggested for PrP protein (involved in the prion diseases) and for A $\beta$  peptide (involved in Alzheimer's disease), where a tilted peptide is also present.<sup>59,62–64</sup> Though protofibrils are mainly  $\beta$ -structured, they contain some degree of  $\alpha$ -helical secondary structure.<sup>60,65</sup> The  $\alpha$ -syn tilted peptide could initiate the destabilization of the membrane under a transient helical conformation, allowing insertion and pore formation, leading to subsequent  $\beta$  structuration into fibrils, in the same way that a helical intermediate is formed during the fibrillogenesis of A $\beta$  peptide.<sup>66</sup>

On the other hand, a predisposition to amyloid formation could also be related to the position of the 67–78 fragment in  $\alpha$ -syn: It lies in a region that undergoes transconformation. Indeed, the central region of  $\alpha$ -syn appears to be very important for transconformation and neurotoxicity, being notably found in the core region of amyloid fibrils.<sup>10,11</sup> Truncation of the C-terminal domain of  $\alpha$ -syn induces faster aggregation than the full-length molecule.<sup>67</sup> Giasson et al. have previously suggested that a peptide of 12 amino acids (residues 71–82) from the hydrophobic domain of  $\alpha$ -syn is necessary and sufficient for fibrillation. Introduction of a charged residue in this peptide decreased the polymerization rate, and a deletion prevented the polymer formation.<sup>14</sup> In contrast, El-Agnaf et al. have determined from a systematic research of aggregation properties and toxicity of  $\alpha$ -syn fragments that the 68–78 peptide is the shortest fragment retaining aggregation properties and toxicity.<sup>16</sup> It is important to note that tilted peptides are structurally labile.<sup>24–26</sup> The  $\alpha$ -syn protein shows this increase in lability, by being random in solution, and the N-terminal domain of  $\alpha$ -syn is helical in the presence of lipids and depending on the conditions, it forms amyloid fibrils, which are  $\beta$  structured.<sup>5,7,11</sup> This is detected in CD experiments that show that increasing the TFE content increases the helical conformation of the 67–78 fragment, from 5 to 40%. We suggest that amyloidogenic proteins could need structurally labile regions to initiate the whole transconformation. Thus, initiation of the transconformation could be assumed by tilted peptides. This has also been proposed for PrP and A $\beta$  peptide.<sup>18,20</sup>

In the future, this work could contribute to a new pharmacological approach for neurotoxic diseases. Tilted peptides have the potential to provide a target for molecules, which could decrease or abolish their destabilizing activities. This was notably shown for the A $\beta$  tilted peptide whose fusogenic capacities are significantly decreased by specific hydrophobic interactions with amphipathic apolipoprotein E helices.<sup>68,69</sup> Derivatives of those helices were designed by molecular modelling and shown to be more efficient in terms of inhibitory effects.<sup>70</sup>

In conclusion, we have shown that the 67–78 peptide of  $\alpha$ -syn is able to induce liposome destabilization and neurotoxicity, as predicted by molecular modelling approaches. Though the tilted insertion has not been firmly proved experimentally, we assume that the  $\alpha$ -syn peptide presents all the properties of the “tilted peptide family” since introducing a mutation that alters the tilted peptide structure clearly showed that there was a correlation between the lipid insertion and the destabilizing activity of the peptide, on liposomes as well as on cells. These tilted properties could be involved in the neurotoxicity of  $\alpha$ -syn, either by direct perturbation of cell membrane or by helping formation of a pore.

## ACKNOWLEDGMENTS

L.L. and R.B. thank the National Funds for Scientific Research (FNRS) of Belgium, where they are Research Associate and Research Director, respectively. We are grateful to Dr. P. Talmud for reading the manuscript.

## REFERENCES

1. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 1988;8:2804–2815.
2. Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* 1994;345:27–32.
3. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M.  $\alpha$ -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6469–6473.
4. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lansbury PL, Goedert M. Filamentous  $\alpha$ -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett* 1998;251:205–208.
5. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT, Jr. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 1996;35:13709–13715.
6. Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM. Stabilization of  $\alpha$ -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 1998;273:9443–9449.
7. Ulmer TS, Bax A, Cole NB, Nussbaum RL. Structure and dynamics of micelle-bound human  $\alpha$ -synuclein. *J Biol Chem* 2005;280:9595–9603.
8. Bussell R, Eliezer D. A structural and functional role for 11-mer repeats in  $\alpha$ -synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. *J Mol Biol* 2003;329:763–778.
9. Zhu M, Li J, Fink AL. The association of  $\alpha$ -synuclein with membranes affects bilayer structure, stability, and fibril formation. *J Biol Chem* 2003;278:40186–40197.



10. Miake H, Mizusawa H, Iwatsubo T, Hasegawa M. Biochemical characterization of the core structure of  $\alpha$ -synuclein filaments. *J Biol Chem* 2002;277:19213–19219.
11. Del Mar C, Geenbaum EA, Mayne L, Englander SW, Woods V. Structure and properties of  $\alpha$ -synuclein and other amyloids determined at the amino acid level. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15477–15482.
12. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11282–11286.
13. Iwai A. Properties of NACP/ $\alpha$ -synuclein and its role in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2000;1502:95–109.
14. Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of  $\alpha$ -synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 2001;276:2380–2386.
15. El-Agnaf OMA, Bodles A, Guthrie DJS, Harriott P, Irvine GB. The N-terminal region of non-A $\beta$  component of Alzheimer's Disease amyloid is responsible for its tendency to assume  $\beta$ -sheet and aggregate to form fibrils. *Eur J Biochem* 1998;258:157–163.
16. El-Agnaf OMA, Irvine GB. Aggregation and neurotoxicity of  $\alpha$ -synuclein and related peptides. *Biochem Soc Trans* 2002;30:559–565.
17. Pillot T, Goethals M, Vanloo B, Talussot C, Brasseur R, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Lins L. Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide. *J Biol Chem* 1996;271:28757–28765.
18. Pillot T, Lins L, Goethals M, Vanloo B, Baert J, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Brasseur R. The 118–135 peptide of the human prion protein forms amyloid fibrils and induces liposome fusion. *J Mol Biol* 1997;274:381–393.
19. Lins L, Charloteaux B, Thomas A, Brasseur R. Computational study of lipid-destabilizing protein fragments: towards a comprehensive view of tilted peptides. *Proteins* 2001;44:435–447.
20. Brasseur R. Tilted peptides: a motif for membrane destabilization (Hypothesis). *Mol Membr Biol* 2000;17:31–40.
21. Colotto A, Martin I, Ruyschaert JM, Sen A, Hui SW, Epanand RM. Structural study of the interaction between the SIV fusion peptide and model membranes. *Biochemistry* 1996;35:980–989.
22. Pérez-Méndez O, Vanloo B, Decout A, Goethals M, Peelman F, Vandekerckhove J, Brasseur R, Rosseneu M. Contribution of the hydrophobicity gradient of an amphipathic peptide to its mode of association with lipids. *Eur J Biochem* 1998;256:570–579.
23. Horth M, Lambrecht B, Khim MCL, Bex F, Thiriart C, Ruyschaert JM, Burny A, Brasseur R. Theoretical and functional analysis of the SIV fusion peptide. *EMBO J* 1991;10:2747–2755.
24. Martin I, Dubois MC, Defrise-Quertain F, Saermark T, Burny A, Brasseur R, Ruyschaert JM. Correlation between fusogenicity of synthetic modified peptides corresponding to the NH<sub>2</sub>-terminal extremity of simian immunodeficiency virus gp32 and their mode of insertion into the lipid bilayer: an infrared spectroscopy study. *J Virol* 1994;68:1139–1148.
25. Charloteaux B, Lorin A, Crowet JM, Stroobant V, Lins L, Thomas A, Brasseur R. The N-terminal 12 residue long peptide of HIV gp41 is the minimal peptide sufficient to induce significant T-cell-like membrane destabilization in vitro. *J Mol Biol* 2006;359:597–609.
26. Lorin A, Thomas A, Stroobant V, Brasseur R, Lins L. Lipid-destabilising properties of a peptide with structural plasticity. *Chem Phys Lipids* 2006;141:185–196.
27. Martin I, Schaal H, Scheid A, Ruyschaert JM. Lipid membrane fusion induced by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 N-terminal extremity is determined by its orientation in the lipid bilayer. *J Virol* 1996;70:298–304.
28. Castano S, Desbat B. Structure and orientation study of fusion peptide FP23 of gp41 from HIV-1 alone or inserted into various lipid membrane models (mono-, bi- and multilayers) by FT-IR spectroscopies and Brewster angle microscopy. *Biochim Biophys Acta* 2005;1715:81–95.
29. Bradshaw JP, Darkes MJ, Harroun TA, Katsaras J, Epanand RM. Oblique membrane insertion of viral fusion peptide probed by neutron diffraction. *Biochemistry* 2000;39:6581–6585.
30. Han X, Bushweller JH, Cafiso DS, Tamm LK. Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat Struct Biol* 2001;8:715–720.
31. Brasseur R, Pillot T, Lins L, Vandekerckhove J, Rosseneu M. Peptides in membranes: tipping the balance of membrane stability. *Trends Biochem Sci* 1997;22:167–171.
32. Lansbury PTJ, Costa JM, Griffiths EJ, Simon EJ, Auger M, Halverson KJ, Kocisko DA, Hendsch ZS, Ashburn TT, Spencer RG. Structural model for the  $\beta$ -amyloid fibril based on interstrand alignment of an antiparallel-sheet comprising a C-terminal peptide. *Nat Struct Biol* 1995;2:990–998.
33. Nguyen J, Baldwin MA, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein peptides induce  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -sheet conformational transitions. *Biochemistry* 1995;34:4186–4192.
34. Gaboriaud C, Bissery V, Benchetrit T, Mornon JP. Hydrophobic cluster analysis an efficient new way to compare and analyse amino acid sequence. *FEBS Lett* 1987;224:149–155.
35. Jahng F. Structure predictions of membrane proteins are not that bad. *Trends Biochem Sci* 1990;15:93–95.
36. Brasseur R, Lins L, Vanloo B, Ruyschaert JM, Rosseneu M. Molecular modelling of the amphipathic helices of the plasma apolipoproteins. *Proteins* 1992;13:246–257.
37. Ducarme P, Rahman M, Brasseur R. Impala: a simple restraint field to simulate the biological membrane in molecular structure studies. *Proteins* 1998;30:357–371.
38. Lins L, Charloteaux B, Heinen C, Thomas A, Brasseur R. “De novo” design of peptides with specific lipid-binding properties. *Biophys J* 2006;90:470–479.
39. Brasseur R. Simulating the folding of small proteins by use of the local minimum energy and the free solvation energy yields native-like structures. *J Mol Graph* 1995;13:312–322.
40. Thomas A, Deshayes S, Decaffmeyer M, Van Eyck MH, Charloteaux B, Brasseur R. Prediction of peptide structure: How far are we? *Proteins* 2006;65:889–897.
41. Etchebest C, Benros C, Hazout S, de Brevern AG. A structural alphabet for local protein structure: improved prediction methods. *Proteins* 2005;59:810–827.
42. Nelder JA, Mead RA. A simplex method for function minimization. *Comput J* 1997;7:303–313.
43. [http://www.biosiris.com/en/Online\\_order/PepLook/PepLook\\_order.html](http://www.biosiris.com/en/Online_order/PepLook/PepLook_order.html).
44. Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta* 1986;858:161–168.
45. Mrsny RJ, Volwerk JJ, Griffith OH. A simplified procedure for lipid phosphorus analysis shows that digestion rates vary with phospholipid structure. *Chem Phys Lipids* 1986;39:185–191.
46. Hoekstra D, De Boer T, Klappe K, Wilschut J. Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes. *Biochemistry* 1984;23:5675–5681.
47. Ellens H, Bentz J, Szoka FC. H<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-induced fusion and destabilization of liposomes. *Biochemistry* 1985;24:3099–3106.
48. Sreeram N, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* 2000;287:252–260.
49. Eisenberg D, Weiss R, Terwilliger T. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of the  $\alpha$ -helix. *Nature* 1982;299:371–374.
50. Jonson PH, Petersen SB. A critical view on conservative mutations. *Protein Eng* 2001;14:397–402.
51. Hofmann MW, Weise K, Ollesch J, Agrawal P, Stalz H, Stelzer W, Hulsbergen F, de Groot H, Gerwert K, Reed J, Langosch D. De novo design of conformationally flexible transmembrane peptides

- driving membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:14776–14781.
52. Brasseur R, Lorge P, Espion D, Goormaghtigh E, Burny A, Ruyschaert JM. The Mode of insertion of the paramyxovirus F1 N-terminus into lipid matrix, an initial step in host cell-virus fusion. *Virus Genes* 1988;1:325–332.
  53. Vonèche V, Portetelle D, Kettman R, Willems L, Limbach K, Paoletti E, Ruyschaert JM, Burny A, Brasseur R. 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3810–3814.
  54. Du HN, Tang L, Luo XY, Li HT, Hu J, Zhou JW, Hu HY. A peptide motif consisting of glycine, alanine, and valine is required for the fibrillization and cytotoxicity of human  $\alpha$ -synuclein. *Biochemistry* 2003;42:8870–8878.
  55. Brasseur R, Ruyschaert JM. Conformation and mode of organization of amphiphilic membrane components: a conformational analysis. *Biochem J* 1986;238:1–11.
  56. Lins L, El Kirat K, Flore C, Stroobant V, Thomas A, Brasseur R. Lipid-destabilizing properties of the hydrophobic helices H8 and H9 from colicin E1. *Mol Membr Biol*, in press.
  57. Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both  $\alpha$ -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:571–576.
  58. Goldberg MS, Lansbury PT, Jr. Is there a cause-and-effect relationship between  $\alpha$ -synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol* 2000;2:115–119.
  59. Lashuel HA, Hartley D, Petre BM, Walz T, Lansbury PT. Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 2002;418:291–291.
  60. Volles MJ, Lansbury PT. Vesicle permeabilization by protofibrillar  $\alpha$ -synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* 2002;41:4595–4602.
  61. Pountney DL, Lowe R, Quilty M, Vickers JC, Voelcker NH, Gai WP. Annular  $\alpha$ -synuclein species from purified multiple system atrophy inclusions. *J Neurochem* 2004;90:502–512.
  62. Lins L, Charloteaux B, Thomas A, Brasseur R. Implication of a structural motif in the instability of a toxic protein: the Prion. In: Renaville R, Burny A, editors. *Biotechnology in animal husbandry*. Boston, MA: Kluwer; 2001. pp 15–32.
  63. Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, Frangione B, Kagan B, Ghiso J, Lal R. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:10427–10432.
  64. Lin H, Bhatia R, Lal R. Amyloid  $\beta$  protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J* 2001;15:2433–2444.
  65. Apetri MM, Maiti NC, Zagorski MG, Carey PR, Anderson VE. Secondary structure of  $\alpha$ -synuclein oligomers: characterization by raman and atomic force microscopy. *J Mol Biol* 2006;355:63–71.
  66. Kirkitadze MD, Condron MM, Teplow DB. Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis. *J Mol Biol* 2001;312:1103–1119.
  67. Crowther RA, Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated  $\alpha$ -synuclein. *FEBS Lett* 1998;436:309–312.
  68. Lins L, Thomas-Soumarmon A, Pillot T, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Brasseur R. Molecular determinants of the interaction between the C-terminal domain of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide and apolipoprotein E  $\alpha$ -helices. *J Neurochem* 1999;73:758–769.
  69. Pillot T, Goethals M, Najib J, Labeur C, Lins L, Chambaz J, Brasseur R, Vandekerckhove J, Rosseneu M.  $\beta$ -amyloid peptide interacts specifically with the carboxy-terminal domain of human apolipoprotein E: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1999;72:230–237.
  70. Decaffmeyer M, Lins L, Charloteaux B, VanEyck MH, Thomas A, Brasseur R. Rational design of complementary peptides to the  $\beta$ Amyloid 29-42 fusion peptide: an application of PepDesign. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:320–327.

## **Annexe V**

Charloteaux B., Lorin A., Crowet J.M., Stroobant V., Lins L., Thomas A., Brasseur R. (2006). The N-terminal 12 residue long peptide of HIV gp41 is the minimal peptide sufficient to induce significant T-cell-like membrane destabilization *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 359, 597-609.



# The N-terminal 12 Residue Long Peptide of HIV gp41 is the Minimal Peptide Sufficient to Induce Significant T-cell-like Membrane Destabilization *in Vitro*

B. Charlotheaux<sup>1†\*</sup>, A. Lorin<sup>1†</sup>, J. M. Crowet<sup>1</sup>, V. Stroobant<sup>2</sup>, L. Lins<sup>1</sup>  
A. Thomas<sup>1</sup> and R. Brasseur<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Biophysique  
Moléculaire Numérique, Faculté  
Universitaire des Sciences  
Agronomiques, Passage des  
déportés, B-5030 Gembloux  
Belgium

<sup>2</sup>Ludwig Institute for Cancer  
Research—Brussel Branch  
74 Av. Hippocrate, B-1200  
Brussels, Belgium

Here, we predicted the minimal N-terminal fragment of gp41 required to induce significant membrane destabilization using IMPALA. This algorithm is dedicated to predict peptide interaction with a membrane. We based our prediction of the minimal fusion peptide on the tilted peptide theory. This theory proposes that some protein fragments having a peculiar distribution of hydrophobicity adopt a tilted orientation at a hydrophobic/hydrophilic interface. As a result of this orientation, tilted peptides should disrupt the interface. We analysed *in silico* the membrane-interacting properties of gp41 N-terminal peptides of different length derived from the isolate BRU and from an alignment of 710 HIV strains available on the Los Alamos National Laboratory. Molecular modelling results indicated that the 12 residue long peptide should be the minimal fusion peptide. We then assayed lipid-mixing and leakage of T-cell-like liposomes with N-terminal peptides of different length as first challenge of our predictions. Experimental results confirmed that the 12 residue long peptide is necessary and sufficient to induce membrane destabilization to the same extent as the 23 residue long fusion peptide. *In silico* analysis of some fusion-incompetent mutants presented in the literature further revealed that they cannot insert into a modelled membrane correctly tilted. According to this work, the tilted peptide model appears to explain at least partly the membrane destabilization properties of HIV fusion peptide.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** HIV-1; fusion peptide; membrane fusion; tilted peptide; molecular modelling

\*Corresponding author

## Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) penetrates T-cells through the gp120-mediated specific binding to the CD4 receptor and chemokine co-receptor, and the subsequent fusion of its

envelope with the plasma membrane. The gp41 transmembrane envelope protein is involved in the fusion between these two membranes by decreasing the activation energy barrier related to this process.<sup>1–8</sup> Concomitantly with fusion, gp41 undergoes drastic structural changes that notably release the N-terminal fusion peptide (FP).<sup>1,3–7</sup> Mutagenesis studies with intact gp41 show that FP sequence is important for complete cell-virus fusion.<sup>9–12</sup> Experiments with synthetic peptides revealed that the gp41 FP lyses membranes, induces pore formation and leakage of lipid vesicles even in the absence of the whole protein.<sup>13–18</sup>

Lipid destabilization by the FP requires its insertion into the membrane.<sup>13,19</sup> Mutations preventing insertion give a non-fusogenic peptide.<sup>14</sup> Correlation between FP ability to insert into a membrane and the capacity of the parent protein to mediate fusion has also been shown.<sup>13,20,21</sup> These

† B.C. and A.L. contributed equally to this work.

Abbreviations used: FP; fusion peptide; HIV; human immunodeficiency virus; NHR; N-terminal heptad repeat; wt; wild-type; PDB; Protein Data Bank; IMPALA; Integral Membrane Protein and Lipid Association; LUV; large unilamellar vesicle; DMPC; dimirystoyl-phosphatidylcholine; DOPC; dioleoyl-phosphatidylcholine; DOPG; dioleoyl-phosphatidylglycerol; DOPE; dioleoyl-phosphatidylethanolamine; Chol; cholesterol; DPC; dodecylphosphocholine.

E-mail address of the corresponding author:  
charlotheaux.b@fsagx.ac.be

results demonstrate that studies with model peptides can generally be extrapolated to the whole protein.

Many publications are dedicated to the determination of FP structure in different environments.<sup>13,18,20,22–40</sup> Resulting data are confusing and somehow paradoxical. The FP structure can be predominantly  $\alpha$ -helix,<sup>13,25,26,41,42</sup>  $\beta$ -structures<sup>16,18,31,32,37,40,43</sup> or both.<sup>19,26,33,44,45</sup> These differences may have to do with the investigated peptide, its environment, sample preparation, peptide load, experimental method and even time of measurement.<sup>19,44</sup> For instance,  $\beta$  structures in lipids are observed if oligomerization is promoted by high peptide concentration,<sup>13,19,25,26,41</sup> by cross-linking,<sup>39</sup> or by linking to the first heptad repeat of gp41 ectodomain.<sup>31,32,46</sup> On the opposite, low peptide concentration and SDS micelles favour the occurrence of helical structures.<sup>19,25,26,42</sup>

From these studies, we can conclude that FP presents intrinsic polymorphism and can adopt several structures in its membrane-associated form. The fusogenic structure(s) must, however, be clearly established. Helical and  $\beta$  structures could both be relevant and serve specific purposes.<sup>32,33,44</sup> It has also been proposed that  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -sheet transition could occur during the early steps of fusion and be related to formation of the fusion pore.<sup>19,33,44</sup> According to Sackett & Shai, FP oligomerization into parallel  $\beta$ -sheet would also be required for virus-cell fusion.<sup>32,47</sup>

IR and NMR measurements indicate that a helical structure of the FP inserts obliquely into a membrane.<sup>13,19,25,45</sup> This tilted orientation was also shown by molecular modelling.<sup>27,28,48,49</sup> Moreover, obliquity was shown to correlate to fusogenicity, since mutant peptides that are no more tilted are defective for fusion.<sup>13,27,28,49</sup>

Various peptide segments have been modelled as asymmetric amphipathic alpha-helices.<sup>50–52</sup> They have been named “tilted peptides”, since theoretical calculations have shown that they insert obliquely into model membranes.<sup>50–52</sup> Tilted peptides are short sequence fragments (10–20 residues long) that possess an asymmetric hydrophobicity gradient along their sequence when they are helical.<sup>50–52</sup> Due to this gradient, they adopt a tilted orientation with respect to a lipid/water interface inducing lipid destabilization. In the past decade, we have detected those peptides in several proteins with various functions.<sup>50–52</sup> To assist those predictions, we have developed IMPALA. This method allows us to study the interactions between a compound and a lipid bilayer using simple restraint functions designed to mimic the major properties of the membrane.<sup>53</sup> IMPALA was used to analyse peptide and protein interactions with the membrane,<sup>53–55</sup> and predict tilted peptides.<sup>56,57</sup> Recently, IMPALA was used to design a *de novo* fusogenic peptide made of non-natural amino acids.<sup>58</sup>

To date, no precise definition of the fusion peptide has been proposed in the literature.<sup>24</sup> Furthermore, there are some disagreements on

which gp41 region corresponds to the FP. Some authors study a 16 residue,<sup>27,45,49</sup> others, a 23 residue<sup>10,26,37,59,60</sup> or even a 33 residue long FP.<sup>12</sup>

Here, we looked for the minimal peptide sufficient to induce significant membrane destabilization. We call it the “minimal FP”. We tried to find out which gp41 fragment of sequence corresponds to the minimal FP on the basis of the tilted peptide theory. Using IMPALA, we searched for the shortest N-terminal peptide with an optimal tilted insertion as helix into a modelled membrane. This study was performed for the HIV-1 BRU isolate and for 710 other HIV strains. From these results, we predicted that the minimal FP should include only the first 12 residues. Liposome fusion and leakage assays were then used to check the validity of our prediction. These results are discussed with respect to the current data on the FP structure and the gp41-mediated fusion model.

## Results

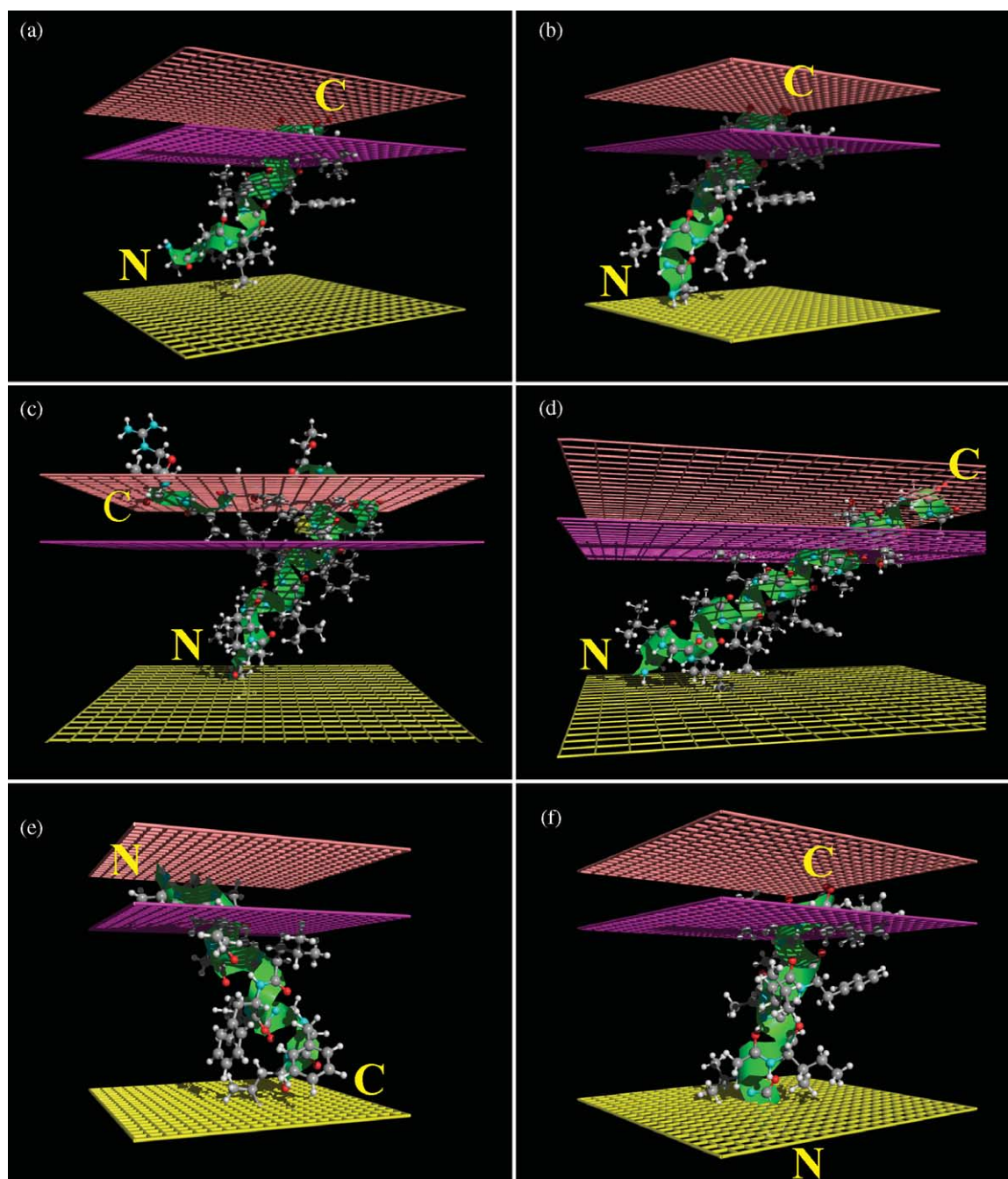
### *In silico* prediction of the minimal FP for the HIV BRU isolate

In order to predict the minimal gp41 FP, we first analysed peptides of different length from the BRU isolate. Two types of structure were investigated: canonical helical models and models derived from the Protein Data Bank (PDB) structure proposed by Gordon *et al.*<sup>25</sup> For helical models,  $\alpha$ -helices of different length were constructed with Hyperchem as described in Materials and Methods. For the Gordon’s model, all the 17 structures of the PDB file were used. The Gordon’s model contains 23 residues. Shorter peptide 3-D models were created by deleting the C-terminal residues.

Membrane interaction properties of N-terminal peptides from eight to 23 residues were predicted using IMPALA (FP8 to FP23). The lower limit of eight residues was fixed to have at least two helix turns. We determined the minimal FP on the basis of the tilted peptide theory. That is to say that we searched for the shortest helical peptide able to insert into the membrane with an oblique angle as close as possible to 45°. Figures 1 and 2 present the results of these simulations for both investigated 3-D models.

No peptide lays parallel to the membrane surface (angle between 0° and 30°) in IMPALA simulations. All peptides insert in the membrane with an angle between 30° and 80°. As shown in Figure 1, all peptides have their N terminus in the membrane hydrophobic core and their C terminus in the aqueous phase or around the lipid polar head groups. IMPALA results are similar for helical peptides and Gordon’s model up to 18 residues. For the 17 Gordon’s models, standard deviation is between 5° and 15° depending on peptide length.

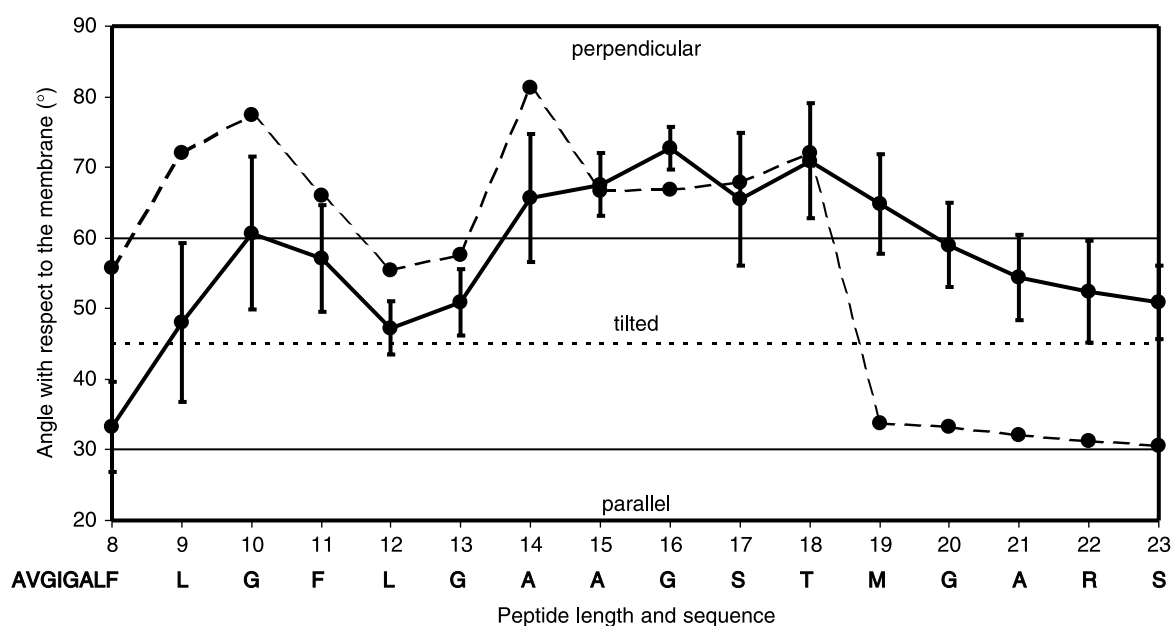
According to the literature, the helix axis of tilted peptides makes an angle between 30° and 60° with respect to the membrane plane.<sup>50</sup> Only six peptides



**Figure 1.** Most stable position in the membrane as predicted by IMPALA for FP12 with structure from the Gordon's model (a) or in canonical helical structure (b), for FP23 with structure from the Gordon's model (c) or in canonical helical structure (d), for FP12 V2E mutant (e) and FP12 G10V mutant with helical structure (f). N-terminal and C-terminal extremities are indicated. Only one layer of the membrane is represented. Bottom plane (yellow), bilayer centre ( $z=0$ ); first upper plane (mauve), lipid chain/polar headgroups interface at 13.5 Å from the centre; second upper plane (pink), lipid/water interface ( $z=18$  Å).

have a tilted insertion for canonical helical structures and the Gordon's models: FP8, FP12, FP13, FP21, FP22 and FP23 (Figure 2). For FP8, the predictions based on the helical and Gordon's models gave divergent results. Hence, FP8 was discarded. FP12 has the optimal oblique angle in IMPALA simulation since its tilt is the closest to 45°.

The predicted angle is 55° for the helical model and 48(±5)° for Gordon's models. For both models, FP12 penetrates significantly into the membrane (Figure 1). Small differences between the results obtained using the canonical helical structure or the 17 Gordon's models further support that FP12 should be the minimal FP.



**Figure 2.** Optimal angle with respect to the membrane plane predicted by IMPALA for FPs of different length. The dotted line corresponds to the peptides with canonical helical structure. The continuous line corresponds to the mean angle for peptides derived from Gordon's model. Standard deviation for the 17 structures is represented.

### ***In silico* prediction of the minimal FP for 710 HIV strains**

We analysed FP sequences from 710 HIV strains. The gp41 sequence alignment was downloaded from the HIV sequence database from the Los Alamos National Laboratory†. On the basis of the alignment, we extracted sub-databases of peptides corresponding to the eight to 18 residue long reference peptides from the isolate BRU. This analysis was done with respect to the alignment rather than length itself since fusogenic properties are supposed to be coded by FP sequence. For each sub-database, all non-redundant peptides were constructed as canonical helices and studied with IMPALA.

Table 1 indicates the number of non-redundant peptides of the same length, shorter or longer than the aligned reference peptide from the BRU isolate. Sequences with the same length as the reference peptide of the BRU isolate account for 70% or more excepted for the eight residue long reference peptide (64%).

We performed IMPALA simulations for all non-redundant peptides. Some peptides insert with their C-terminal extremity in the membrane hydrophobic core of the membrane (Table 1). They were discarded for further analyses. These peptides correspond for example to mutants with a Glu or Ser residue in the second position (data not shown). Figure 3 presents the results for all remaining peptides. They are similar to those obtained for the BRU isolate using helical and Gordon's models.

Tilted insertion is observed for peptides aligned with 12 and 13 residue long peptides of the BRU isolate (Figure 3). Again, from these results, we selected the 12 residue long peptide as minimal FP since it is the shortest peptide predicted tilted in the membrane. It makes an angle with respect to the membrane plane equal to  $55(\pm 6)^\circ$ . For this peptide, the standard deviation is furthermore the smallest.

### ***In silico* analysis of mutant FP**

The last step of our *in silico* analysis consisted of the characterization of mutant FP described in the literature.<sup>9-12</sup> Most of these mutations have been shown to be associated with a significant reduction of gp41-mediated cell-cell fusion (Table 2). These mutations were introduced into the 12 residue long FP, since it was the predicted minimal FP. Using canonical helical structures, we then investigated if the tilted insertion was maintained. Table 2 and Figure 1 present the IMPALA results obtained for these mutants.

IMPALA results reveal some correlation between a correct tilted insertion in the membrane and the behaviour of the corresponding gp41 in cell-cell fusion assays. The non-fusogenic V2E and V2R mutants insert in the modelled membrane with their C terminus in the hydrophobic core instead of their N terminus. L9R and G10V mutants are not tilted. Both mutations correspond to mutants unable to induce syncytia. Two other mutants induce around 10% of syncytia formation. Their predicted insertion angle is equal to the  $60^\circ$  cutoff value for tilted peptides. IMPALA predicts that the seven last mutants correctly penetrate the membrane with their N terminus and are tilted. These

† <http://www.hiv.lanl.gov/>



**Table 1.** Analysis of non-redundant FP of different length derived from the alignment of 710 HIV strains

Reference sequence	AVGIGALF Length	F 8	L 9	G 10	F 11	L 12	G 13	A 14	A 15	G 16	S 17	T 18
Shorter peptides		16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Peptides with reference length		97	123	125	126	127	134	152	152	152	152	154
Longer peptides		36	36	36	39	39	44	44	44	44	44	44
Non-inserted peptides (%) <sup>a</sup>		14.1	16	3.9	6.6	4.9	3.2	2.4	0.5	0.5	0.5	0.5
Tilted peptides (%)		13.4	2.9	2.8	2.2	89	92	4.2	20.7	22.6	22.2	23.2
Average angle (°)		61	69	76	65	55	56	74	63	61	64	66
Standard deviation (°)		19	12	10	10	6	6	10	7	10	10	13

Results are presented with respect to the length of the corresponding reference peptide. Number of peptides shorter than the reference peptide, with the same length or longer.

<sup>a</sup> Non-inserted peptides are peptides that do not insert into the membrane or insert their C terminus instead of their N terminus. These peptides are not taken into account for the calculation of the average angle. Peptides are considered tilted if their angle is between 30° and 60° with respect to the membrane.

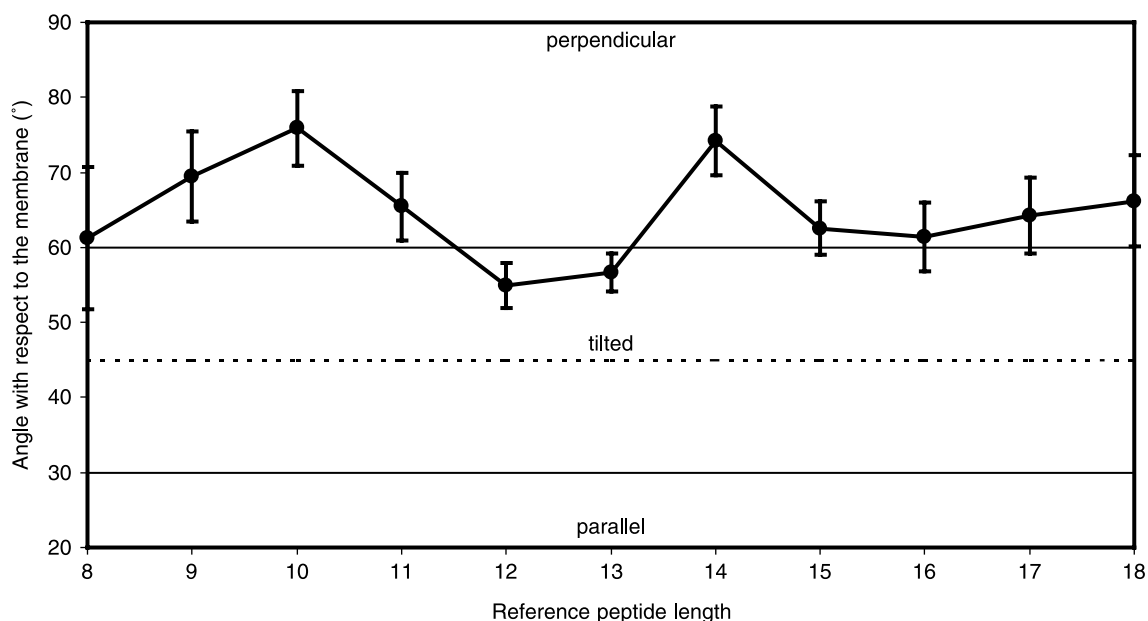
mutants are fusogenic and induce at least 15% of syncytia with respect to the wild-type (wt).

### Lipid-mixing and leakage assays

According to our *in silico* analyses, the 12 residue long peptide should be the minimal FP for membrane destabilization. In order to validate our prediction, we carried out lipid-mixing assays with nine to 14, 16 and 23 residue long gp41 N-terminal peptides corresponding to the sequence of the isolate BRU. The ApoE peptide was used as negative control.<sup>61</sup> The induction of vesicular lipid mixing by the different peptides was tested with LUVs mimicking the composition of T-cell membrane since it is the target membrane of gp41 FP. The R18-labelled and R18-free liposomes were mixed and the time-course

increase of fluorescence intensity due to the dequenching of the probe was measured to follow-up lipid fusion.

Figure 4(a) clearly shows that the 12 residue peptide induces fusion to the same extent as the 23 residue long peptide. In both cases, the process is dose-dependent. For peptide/lipid ratio of 0.2 or higher, both peptides induce more than 30% of lipid-mixing. Figure 4(b) shows the lipid-mixing induced by all tested peptides at a peptide/lipid ratio of 0.4. While the nine and ten residue long peptides do not induce significant fusion, peptides of 12 residues or more induce fusion to the same extent as the 23 residue long FP. Fusogenic activity of the 11 residue long peptide is approximately half of the longer peptides.



**Figure 3.** Optimal angle with respect to the membrane plane predicted by IMPALA for FP derived from the alignment. Results are presented as a function of the length of the reference peptide from the BRU isolate. Standard deviation for the different sequences is represented.

**Table 2.** IMPALA analysis of 12 residue FP with mutations described in the literature (see references in the Table)

Reference	Literature		IMPALA	
	Mutation	% Syncytia	Inserted ter.	Angle
WT	/	100	N-ter.	56
Buchschacher <i>et al.</i> <sup>9</sup>	V2A	96	N-ter.	57
	V2R	<1	C-ter.	44
	V2G	56	N-ter.	56
	G3V	34	N-ter.	55
Delahunty <i>et al.</i> <sup>10</sup>	G5V	45	N-ter.	56
	F8V	33	N-ter.	53
	G10V	0	N-ter.	73
	F11V	15	N-ter.	58
	A1E	8	N-ter.	61
Freed <i>et al.</i> <sup>11</sup>	V2E	<2	C-ter.	56
	L9R	<2	N-ter.	27
	A1VF8L	56	N-ter.	56
Pritsker <i>et al.</i> <sup>12</sup>	F11G	10	N-ter.	60

The column Inserted ter. indicates if the N terminus or the C terminus is inserted in the membrane hydrophobic core. The column Angle gives the angle between the helix axis and the membrane plane (°).

We then performed leakage assays to further assess the lipid-destabilizing properties of the peptides. As in lipid-mixing, the 12 residue long peptide induces permeability comparable to that induced by the 23 residue long peptide and the process is dependent on the peptide concentration (data not shown). The highest response is obtained for a peptide/lipid ratio of 0.8. Figure 4(c) presents a comparison of the liposome permeability induced by the peptides as a function of peptide length. Again, FP9 and FP10 do not induce significant membrane-destabilization. FP11 causes 35–40% leakage and FP12 or longer, around 85%.

From these results, we can conclude that the gp41 12 residue peptide is able to induce significant lipid-mixing and leakage of T-cell-like liposomes. Moreover, it is the smallest peptide with membrane-destabilizing properties similar to that of the 23 residue peptide.

## Discussion

Understanding viral fusion is a major challenge for public health to develop drugs and vaccines that prevent virus entry into cells. This is also a subject of choice to unravel the general mechanism of membrane fusion. Here, we combined molecular modelling with biophysical approaches to find out the minimal part of the gp41 FP that induces significant membrane-destabilization.

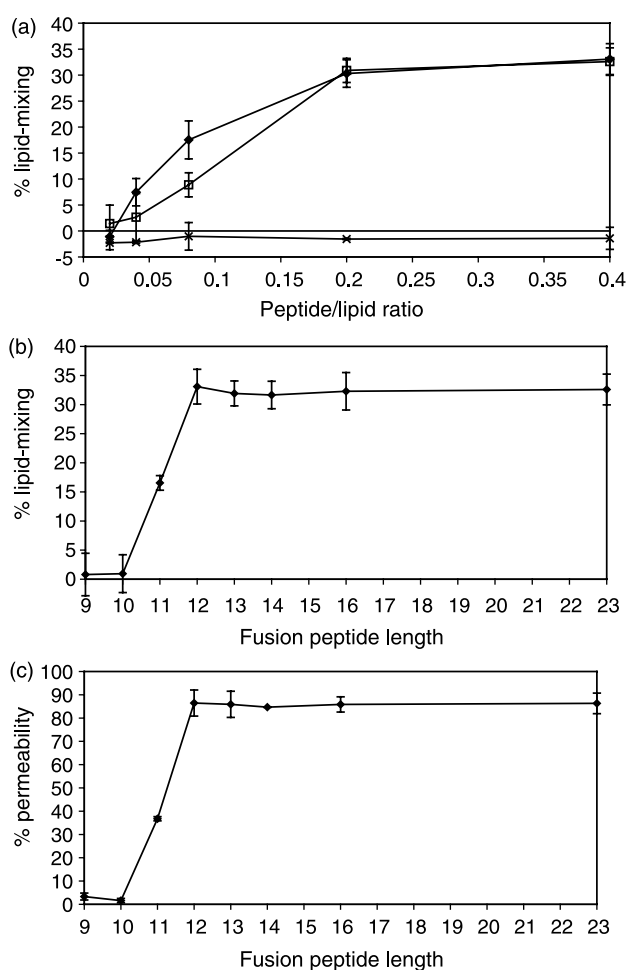
We used the tilted peptide theory to predict the minimal FP. We made *in silico* simulations of peptides of different length inserted in an implicit membrane model. These simulations were performed with several 3-D models and various gp41 sequences. We predicted that the 12 residue long peptide would insert in the membrane with an angle between 45° and 55° with respect to the membrane plane depending on the sequence and the 3-D model used for the calculations. According to the tilted peptide theory, this peptide would have fusogenic properties. Our predictions furthermore

revealed that this peptide is the shortest one that would have membrane-destabilizing properties. The tilted peptide theory was also able to partly explain the phenotype of some mutants presented in the literature. Results of lipid-mixing and leakage assays are in agreement with the calculations. The 12 N-terminal residues of gp41 correspond to the smallest peptide able to destabilize the membrane to the same extent as the 23 residue long FP.

### Are the membrane destabilizing properties of the FP related to helical structure?

The use of helical representation of protein sequence has already been shown to give valuable information about its properties even for regions that do not adopt helical conformation in the 3-D structure. This was emphasized in the early eighties by Eisenberg, who developed the concept of the helical hydrophobic moment.<sup>62–64</sup> Another example is the hydrophobic cluster analysis method that uses a flattened projection of an  $\alpha$ -helix for secondary structure prediction and sequence comparison.<sup>65–68</sup> Similarly the use of helical FP models could allow the prediction of fusogenic and non-fusogenic peptides even for non-helical peptides. However, some data suggest that a helical structure of gp41 FP could be relevant for membrane destabilization.

Fusion peptides from several other viruses like Ebola, NDV, BLV and SIV have been proposed to adopt a helical oblique conformation when inserted in lipids.<sup>56,69–72</sup> In all cases, experimental data assessed the prediction of helical conformation and for some, of tilted insertion.<sup>56,73–76</sup> Furthermore, mutational analyses confirmed the relationship between the oblique orientation and fusogenic properties of WT peptides.<sup>56,70–72</sup> This was not only shown for peptides *in vitro* but also with complete fusion glycoproteins in cell–cell fusion assays.<sup>56,70–72</sup> Tilted peptides with membrane-destabilizing properties have been detected in various other proteins like fertilin,<sup>77</sup> lipase,<sup>57</sup> yeast invertase<sup>78</sup> and A $\beta$



**Figure 4.** (a) Percentage of lipid-mixing of LUVs mimicking T-cell membrane induced by the 12 residue FP (◆), 23 residue FP (□) and the ApoE peptide (X, negative control) as a function of peptide/lipid molar ratio. (b) Percentage of lipid-mixing of LUVs mimicking T-cell membrane induced by FPs of different length at a peptide/lipid ratio of 0.4 (optimal fusion). (c) Percentage of leakage using LUVs mimicking T-cell membrane induced by FPs of different length at a peptide/lipid ratio of 0.8 (optimal leakage).

peptide.<sup>79,80</sup> Recently, we designed a tilted *de novo* peptide made of non-natural residues that was shown to destabilize membranes *in vitro*.<sup>58</sup> Tilted peptides appear thus to be more than a simple theoretical concept.

In the context of this study, we predicted a tilted orientation of gp41 helical FP in agreement with previous studies.<sup>13,19,27,48</sup> Very recently, Castano & Desbat used PMIRRAS and polarized ATR spectroscopy coupled with Brewster angle microscopy and spectral simulations to determine the structure and orientation of a 23 residue long gp41 FP in lipids.<sup>19</sup> They showed that, at low concentration, the FP forms an  $\alpha$ -helix with a tilted angle of  $53.5(\pm 3.0)^\circ$  with respect to the membrane plane in

multibilayers of DOPC/Chol/DOPE/DOPG ( $P/L$  ratio = 0.005), and a tilted angle of  $51.0(\pm 5.0)^\circ$  in DMPC bilayers ( $P/L$  ratio = 0.01). This correlates well with the results of the IMPALA simulations.

Furthermore, analysing several mutant peptides, we predicted that the FP V2E mutant should not be able to correctly insert into the membrane. Preliminary results indicate that a 12 residue long peptide with this mutation does not induce lipid-mixing in our conditions (data not shown). Morris *et al.* used a number of NMR techniques to characterize the differences between the WT and V2E peptides in the presence of DPC micelles as membrane mimics.<sup>28</sup> They showed that differences in activity are not correlated to different conformational characteristics. Both peptides are at least in an  $\alpha$ -helical conformation between the Ile4 to Leu12. Spin-label studies provided clear indication that the wt FP inserts its N terminus into the micelles. On the opposite, the V2E mutant does not insert into the micelles while its membrane affinity is not impaired. They concluded from the spin-label results and deuterium amide proton exchange experiments that the oblique insertion of the FP correlates with its fusogenic activity.

Since (1) tilted peptides have been evidenced for several other viruses and various proteins, (2) the gp41 FP has been determined to adopt an  $\alpha$ -helix structure in some conditions, (3) the predicted angle correlates well with the angle determined experimentally, and (4) we were able to predict the effect of some mutants, it is likely that our prediction method owes its success to some significance of the helical structure for membrane-destabilization. How could this proposal be in agreement with the growing body of evidence indicating that a  $\beta$ -structure is important for fusion?<sup>26,32,38,44</sup>

### How is the FP structure related to fusion?

A lot of publications have been dedicated to the study of the gp41 fusion peptide in various conditions.<sup>13,18,20,22–25,27–30,32,35,37,40,47</sup> According to these studies, the peptide is either helical,<sup>13,25,41,42</sup> extended,<sup>16,18,32,37,40,43,47</sup> or even a combination of both structures.<sup>19,26,33,44,45</sup> This leads to the conclusion that the gp41 FP present some structural flexibility and is able to adopt various structures depending on its environment.

In the native envelope complex, the gp41 FP is buried into the hydrophobic core of the gp41–gp120 oligomer.<sup>1,3–7</sup> After gp120 shedding, it becomes accessible to the aqueous environment and would be projected towards the target membrane with the formation of the pre-hairpin structure of the gp41 ectodomain. It would then interact with the membrane inducing its dehydration, and inserts to mediate fusion and the formation of the pore. These events expose the FP to a variety of environments. It is probable that due to its structural flexibility, the FP fluctuates between coil,  $\alpha$  and  $\beta$ -structure along its way from the centre of the native gp120–gp41 complex to the fusion pore.

We propose that during the first step of the fusion process, the FP would adopt a transient helical structure that would induce destabilization of the membrane and prime it for fusion. The monomeric  $\alpha$ -helix would then reorganize into oligomeric  $\beta$  structures. This second step would induce fusion and formation of the pore.

The significance of the FP structure determined experimentally is somehow limited due to practical constraints. Indeed, these results have generally been obtained after incubation with lipids while the fusion process is a relatively fast phenomenon.<sup>13,37</sup> Recently, Buzon *et al.* used FTIR measurements to follow the structural modifications encountered by the FP that moves from water phase to lipids.<sup>44</sup> They showed that FP23 with a free N terminus forms a mixture of unordered,  $\beta$  and  $\alpha$ -structures in aqueous buffer. Upon interaction with a model membrane, slow conformational change leads to the formation of aggregated  $\beta$ -structures. Helical structures persist during the first 50 s. As indicated by their results, the fusion process depends on the  $\alpha$  to  $\beta$  transition rather than  $\beta$  structure itself. The importance of such conformational changes was also stated previously.<sup>26,33</sup> Furthermore, distinct roles have been proposed for helical and extended FP conformations.<sup>26,29,33</sup> This is in agreement with Castano & Desbat, who showed using FTIR spectroscopy that the  $\alpha$ -conformation induces lipid acyl chain disorder while the  $\beta$ -conformation induces a complete disorganization of the lipid chains.<sup>19</sup> The requirement of two distinct conformations and transition should account for the peculiar composition of viral FP, which are for example particularly rich in glycine residues.<sup>81</sup>

Similarities between the gp41 FP and amyloid peptide of Alzheimer's disease have already been mentioned in the literature.<sup>26,32,82</sup> A $\beta$ 29-42 is implicated in the formation of senile plaques of Alzheimer's disease.<sup>83-85</sup> This peptide is also known to have several conformations, from random coil to helix and  $\beta$ -extended forms.<sup>86,87</sup> Because of its hydrophobicity, the latter is responsible for the peptide aggregation often observed in NMR experiments.<sup>88</sup> Beta aggregates are considered as a denatured stable structural conformation. It has been proposed that before peptide aggregation, a transient helical form might have peculiar biological properties related to membrane-destabilization. This peptide has been shown to belong to the tilted peptide class.<sup>50,80</sup> Recently, we designed peptides that inhibit the fusogenicity of the A $\beta$ 29-42 peptide *in vitro*.<sup>89</sup> Since the design of the inhibitors was based on helical 3-D models, these results point out the correlation between helicity and fusogenicity in the case of the amyloid peptide.

A crucial point related to the significance of  $\alpha$  and  $\beta$ -structure for fusion is oligomerization. Oligomerization, promoted by high peptide load,<sup>13,19,25,26,41</sup> FP cross-linking<sup>39</sup> or linking of the FP to oligomerization motives,<sup>32,47</sup> is always related to an increase of lipid-mixing with respect to monomeric forms. In addition to the  $\alpha$  to  $\beta$  transition, oligomerization appears to be

another key factor governing the fusion process. It has also been suggested that the FP could form higher order oligomers consecutively to the clustering of gp41 trimers at the fusion pore.<sup>32,44,90</sup>

*In vivo*, FP is part of the whole gp41 protein. Its oligomeric state depends thus on the structure and clustering of gp41 trimers. A model for conformational transitions of the gp41 ectodomain is proposed in the literature.<sup>1,3-7</sup> This model is based on numerous experimental data and on homologies with the haemagglutinin fusion protein. According to this model, the N-terminal heptad repeat (NHR) region should form a trimeric coiled-coil structure in the pre-hairpin intermediate and post-fusion structures but not in the native gp41-gp120 complex. Mutations that affect the helicity and/or the oligomerization of the NHR impair fusogenicity while they have no detectable effect on the structure of the native envelope complex, for example.<sup>91-97</sup> Oligomerization of the FP before the formation of the pre-hairpin intermediate is thus unlikely. Indeed, it has been shown that the formation of FP  $\beta$ -sheet is driven by oligomerization of the NHR or GCN4 motives.<sup>32,47</sup> Oligomerization is required to mask the polar backbone of  $\beta$ -strand FP and to allow its insertion into the membrane. The first conformation adopted by gp41 FP in *in vivo*-like conditions could be an  $\alpha$ -helix. In the case of HA2-mediated fusion, FP insertion into the target membrane occurs before the formation of the pre-hairpin structure.<sup>3</sup> Moreover, inserted FPs have a helical conformation with a tilted angle.<sup>98</sup>

In conclusion, this work is another piece of evidence that the tilted peptide theory can predict fusogenic properties of peptides using helical 3-D models. We show that the 12 N-terminal residues of the HIV gp41 are necessary and sufficient to induce membrane destabilization of T-cell-like membranes to the same extent as the 23 residue long peptide. We propose that the gp41 FP inserts transiently into the target membrane as an  $\alpha$ -helix to induce a first destabilization and prime the membrane for fusion. A transition from monomeric  $\alpha$ -conformation to oligomeric  $\beta$ -sheet would then be responsible for fusion and pore formation. The proposed model reconciles conflicting data presented in the literature. Data related to gp41 fusion peptide as well as conformational modifications of the gp41 ectodomain, and viral fusion correlate well with our proposal. This model needs further experiments to be validated or invalidated.

## Materials and Methods

### *In silico*

#### Materials

All calculations were performed on Pentium 4 processors. Molecular views were drawn using WinMGM (Ab Initio technology, Obernai, France).

### Peptide sequence and structure

HIV-1 BRU isolate gp41 sequence corresponds to Swissprot entry P03377. The first 23 residues are AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS. The gp41 sequence alignment of 710 HIV strains was extracted from the HIV sequence database of the Los Alamos National Laboratory†. Mutant peptide sequences were generated introducing the corresponding mutation into the 12 residue sequence of BRU isolate.

Structures of the Gordon's model were extracted from the PDB, accession code 1ERF. Gordon *et al.* combined experimental studies and molecular simulations to provide 17 structures representative of the 23 residue peptide structure in HFIP solvent. These structures are mainly folded in  $\alpha$ -helix (residues 3 to 16) and are very close to the structure of the peptide in a POPG membrane.<sup>25</sup>

Canonical helical peptides were constructed using Hyperchem (release 6.1 for windows-Hypercube) assigning values of phi/psi angles of  $-58^\circ$  and  $-47^\circ$  corresponding to classical  $\alpha$ -helical structure.<sup>99</sup> The conformation of backbone and side-chains was optimized with Hyperchem by a conjugated gradient procedure using AMBER force field.

### Membrane insertion

We inserted peptides into an implicit bilayer using the IMPALA (Integral Membrane Protein and Lipid Association) algorithm developed by Ducarme *et al.*<sup>53</sup> It simulates the insertion of any molecule (protein, peptide, drug) into a bilayer by adding energy restraint functions to the usual energy description of molecules.<sup>100,101</sup>

The lipid bilayer is defined by  $C(z)$ , which represents and empirical function describing membrane properties. This function is constant in the membrane plane ( $x$  and  $y$ -axes) but varies along the bilayer thickness ( $z$ -axis) and more specifically, at the lipid/water interface corresponding to the transition between lipid acyl chains (no water = hydrophobic core) and the hydrophilic aqueous environment:

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

where  $\alpha$  and  $z_0$  are constant parameters such that  $C(|z| \geq 18 \text{ \AA}) = 1$  and  $C(|z| \leq 13.5 \text{ \AA}) = 0$ . The value of the function is constant from  $-\infty$  to  $-18 \text{ \AA}$  (hydrophilic phase), from  $-13.5 \text{ \AA}$  to  $13.5 \text{ \AA}$  (hydrophobic core), and from  $18 \text{ \AA}$  to  $\infty$  (hydrophilic phase).

Two restraints simulate the membrane, one the bilayer hydrophobicity ( $E_{\text{int}}$ ), and the other, the lipid perturbation ( $E_{\text{lip}}$ ).

The hydrophobicity of the membrane is simulated by  $E_{\text{int}}$ :

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

where  $N$  is the total number of atoms,  $S_{(i)}$  the solvent accessible surface of atom  $i$ ,  $E_{\text{tr}(i)}$  its transfer energy per unit of accessible surface area, and  $C_{(zi)}$  the value of  $C(z)$  with respect to its position.

The perturbation of the bilayer by insertion of the molecule is simulated by the lipid perturbation restraint

( $E_{\text{lip}}$ ):

$$E_{\text{lip}} = a_{\text{lip}} \sum_{i=1}^N S_{(i)} (1 - C_{(zi)})$$

where  $a_{\text{lip}}$  is an empirical factor of  $0.018 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ .

The interaction of the peptide with the bilayer is analyzed by a Monte Carlo (MC) simulation of 100,000 steps at 298 K. Three degrees of freedom are tested (two rotations and one translation along the  $z$ -axis). Maximal rotations of  $2^\circ$  and translations of  $1 \text{ \AA}$  are allowed per step. No modification of the peptide structure is allowed, so that the Coulomb, van der Waals, and torsion energies are considered as constants. The environment restraint applied on the peptide that inserts into the membrane is the sum of  $E_{\text{int}}$  and  $E_{\text{lip}}$ . The position of the structure with the lowest restraint value is considered as the most stable conformation in the bilayer. Here, calculations were repeated three times for each peptide. All repeats gave similar results.

### In vitro assays

#### Materials

1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*rac*-(1-glycerol) sodium salt (DOPG) and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), cholesterol (CHOL), and bovine brain sphingomyelin (SM) were purchased from Sigma (St Louis MO, USA).

Trifluoroethanol (TFE) was purchased from Sigma (St Louis). Octadecylrhodamine chloride B (R18), acid *N*-*N'*-*p*-xylylenbis (DPX) and 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS) were from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA). Hepes, Triton X-100 were from Sigma (St Louis MO, USA). NaCl was from Merck Eurolab (Leuven, Belgium).

Lipid-mixing buffer used for liposome preparation is 5 mM Hepes (pH 7.4), 100 mM NaCl.

The nine to 14, 16 and 23 residue long gp41 fusion peptides from the BRU isolate were synthesized by conventional solid phase peptide synthesis, using Fmoc for transient  $\text{NH}_2$ -terminal protection, and were characterized using mass spectrometry. These peptides have free N terminus and amidated C terminus. Peptide purity is more than 85%, as indicated by analytical HPLC. The 288–304 fragment of human ApoE peptide (EDMQRQ-WAGLVEKVVQAA) was synthesized by Epytop (Nîmes, France).

#### Liposome preparation

*In vitro* assays were performed with LUVs mimicking the composition of T-cell membrane:<sup>102</sup> DOPC/CHOL/DOPE/DOPG/SM 34/33/16/10/7 (Mol/Mol). Lipids were dissolved in a chloroform/methanol (2:1, v/v) solution. Lipid film was obtained after evaporation under vacuum obtained with a rotovapor (Van Der Heyden Büchi, Switzerland). The lipid film, dried for one night, was then dispersed in 2 ml of lipid-mixing buffer (see above) and was incubated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ .

To obtain LUVs, the hydrated lipid dispersion was exposed to five freeze-thaw cycles ( $-180^\circ\text{C}/+25^\circ\text{C}$ ) and extruded ten times through a polycarbonate membrane ( $0.1 \mu\text{m}$ ) under 20 bars pressure (Extruder Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada).

† <http://www.hiv.lanl.gov/>

Liposome concentration was determined by phosphorus analysis.<sup>103</sup>

#### Lipid-mixing assays

Mixing of liposome membranes was followed by measuring the fluorescence increase of R18, a lipid-soluble probe, after the fusion of labelled and unlabelled liposomes. Labelled liposomes were obtained by incorporating R18 in the dry lipid film at a concentration 5% of the total lipid weight. Labelled and unlabelled liposomes were mixed at a weight ratio 1:4, respectively and a final concentration of 12.5  $\mu$ M in lipid-mixing buffer. The 100% of fusion is determined by adding Triton X-100 at 2% to labelled/unlabelled (1:4, w/w) LUVs. Fluorescence was recorded at room temperature ( $\lambda_{exc}$ , 560 nm;  $\lambda_{em}$ , 590 nm) on an LS-50B PerkinElmer fluorimeter. The pH value was fixed to 7.4.

#### Leakage assays

The HPTS (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid)/DPX (*p*-xylylenebis[pyridinium] bromide) assay of Ellens *et al.* was used to monitor vesicle leakage.<sup>104</sup> The assay is based on the quenching of HPTS by DPX. HPTS and DPX are encapsulated together in liposomes. Leakage of vesicles was followed by the dequenching of HPTS released into the medium. Fluorescence was recorded at room temperature ( $\lambda_{exc}$ , 360 nm;  $\lambda_{em}$ , 520 nm) on a LS-50B PerkinElmer fluorimeter.

Liposomes (LUVs) were prepared as described above in 12.5 mM HPTS (45 mM NaCl), 45 mM DPX (20 mM NaCl), 10 mM Hepes (pH 7.4) buffer. Vesicles containing encapsulated HPTS and DPX were eluted in the void volume of Sephadex G-75 column, with 10 mM Hepes buffer (pH 7.4).

For lipid-mixing and leakage experiments, assays were performed with LUVs that mimic the composition of the T-cell membrane (see liposome preparation) and were repeated three times with different batches of peptides. The peptide/lipid ratio varied from 0.04 to 0.8.

## Acknowledgements

This work was supported by the Ministère de la Région Wallonne contract no. 14540 (PROTMEM). The work of A.L. was supported by the National Fund for Scientific Research of Belgium (grant F.N.R.S.-Televie no. 7.4.527.05.F). The work of J.-M.C. was supported by a grant from the Funds for Industrial and Agricultural Research (FRIA). L.L. and R.B. thank the National Funds for Scientific Research (FNRS) of Belgium where they are Research Associate and Research Director, respectively. A.T. is Research Director at INSERM (France).

## References

- Colman, P. M. & Lawrence, M. C. (2003). The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 309–319.
- Eckert, D. M. & Kim, P. S. (2001). Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 777–810.
- Gallo, S. A., Finnegan, C. M., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S. S. *et al.* (2003). The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1614**, 36–50.
- Greenberg, M., Cammack, N., Salgo, M. & Smiley, L. (2004). HIV fusion and its inhibition in antiretroviral therapy. *Rev. Med. Virol.* **14**, 321–337.
- Jiang, S., Zhao, Q. & Debnath, A. K. (2002). Peptide and non-peptide HIV fusion inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 563–580.
- Root, M. J. & Steger, H. K. (2004). HIV-1 gp41 as a target for viral entry inhibition. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 1805–1825.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L. J., Harrison, S. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1999). Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol. Membr. Biol.* **16**, 3–9.
- White, J. M. (1992). Membrane fusion. *Science*, **258**, 917–924.
- Buchsacher, G. L., Jr, Freed, E. O. & Panganiban, A. T. (1995). Effects of second-site mutations on dominant interference by a human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutant. *J. Virol.* **69**, 1344–1348.
- Delahunty, M. D., Rhee, I., Freed, E. O. & Bonifacino, J. S. (1996). Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: identification of critical glycine residues. *Virology*, **218**, 94–102.
- Freed, E. O., Myers, D. J. & Risser, R. (1990). Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 4650–4654.
- Pritsker, M., Rucker, J., Hoffman, T. L., Doms, R. W. & Shai, Y. (1999). Effect of nonpolar substitutions of the conserved Phe11 in the fusion peptide of HIV-1 gp41 on its function, structure, and organization in membranes. *Biochemistry*, **38**, 11359–11371.
- Martin, I., Schaal, H., Scheid, A. & Ruyschaert, J. M. (1996). Lipid membrane fusion induced by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 N-terminal extremity is determined by its orientation in the lipid bilayer. *J. Virol.* **70**, 298–304.
- Mobley, P. W., Waring, A. J., Sherman, M. A. & Gordon, L. M. (1999). Membrane interactions of the synthetic N-terminal peptide of HIV-1 gp41 and its structural analogs. *Biochim. Biophys. Acta*, **1418**, 1–18.
- Nir, S. & Nieva, J. L. (2000). Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion. *Prog. Lipid Res.* **39**, 181–206.
- Pereira, F. B., Goni, F. M., Muga, A. & Nieva, J. L. (1997). Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: dose and sequence effects. *Biophys. J.* **73**, 1977–1986.
- Pereira, F. B., Goni, F. M. & Nieva, J. L. (1997). Membrane fusion induced by the HIV type 1 fusion peptide: modulation by factors affecting glycoprotein 41 activity and potential anti-HIV compounds. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **13**, 1203–1211.
- Rafalski, M., Lear, J. D. & DeGrado, W. F. (1990). Phospholipid interactions of synthetic peptides representing the N-terminus of HIV gp41. *Biochemistry*, **29**, 7917–7922.

19. Castano, S. & Desbat, B. (2005). Structure and orientation study of fusion peptide FP23 of gp41 from HIV-1 alone or inserted into various lipid membrane models (mono-, bi- and multibi-layers) by FT-IR spectroscopies and Brewster angle microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1715**, 81–95.
20. Chang, D. K., Cheng, S. F. & Chien, W. J. (1997). The amino-terminal fusion domain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41 inserts into the sodium dodecyl sulfate micelle primarily as a helix with a conserved glycine at the micelle–water interface. *J. Virol.* **71**, 6593–6602.
21. Schaal, H., Klein, M., Gehrman, P., Adams, O. & Scheid, A. (1995). Requirement of N-terminal amino acid residues of gp41 for human immunodeficiency virus type 1-mediated cell fusion. *J. Virol.* **69**, 3308–3314.
22. Curtain, C., Separovic, F., Nielsen, K., Craik, D., Zhong, Y. & Kirkpatrick, A. (1999). The interactions of the N-terminal fusogenic peptide of HIV-1 gp41 with neutral phospholipids. *Eur. Biophys. J.* **28**, 427–436.
23. Durell, S. R., Martin, I., Ruysschaert, J. M., Shai, Y. & Blumenthal, R. (1997). What studies of fusion peptides tell us about viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion (review). *Mol. Membr. Biol.* **14**, 97–112.
24. Epand, R. M. (2003). Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim. Biophys. Acta*, **1614**, 116–121.
25. Gordon, L. M., Mobley, P. W., Pilpa, R., Sherman, M. A. & Waring, A. J. (2002). Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in membrane environments using  $^{13}\text{C}$ -enhanced Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1559**, 96–120.
26. Gordon, L. M., Mobley, P. W., Lee, W., Eskandari, S., Kaznessis, Y. N., Sherman, M. A. & Waring, A. J. (2004). Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in lipid detergent and aqueous environments using  $^{13}\text{C}$ -enhanced Fourier transform infrared spectroscopy. *Protein Sci.* **13**, 1012–1030.
27. Kamath, S. & Wong, T. C. (2002). Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion domain by molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* **83**, 135–143.
28. Morris, K. F., Gao, X. & Wong, T. C. (2004). The interactions of the HIV gp41 fusion peptides with zwitterionic membrane mimics determined by NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1667**, 67–81.
29. Nieva, J. L., Nir, S., Muga, A., Goni, F. M. & Wilschut, J. (1994). Interaction of the HIV-1 fusion peptide with phospholipid vesicles: different structural requirements for fusion and leakage. *Biochemistry*, **33**, 3201–3209.
30. Nieva, J. L. & Agirre, A. (2003). Are fusion peptides a good model to study viral cell fusion? *Biochim. Biophys. Acta*, **1614**, 104–115.
31. Sackett, K. & Shai, Y. (2003). How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain. *J. Mol. Biol.* **333**, 47–58.
32. Sackett, K. & Shai, Y. (2005). The HIV fusion peptide adopts intermolecular parallel beta-sheet structure in membranes when stabilized by the adjacent N-terminal heptad repeat: a  $^{13}\text{C}$  FTIR study. *J. Mol. Biol.* **350**, 790–805.
33. Saez-Cirion, A. & Nieva, J. L. (2002). Conformational transitions of membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *Biochim. Biophys. Acta*, **1564**, 57–65.
34. Waring, A. J., Mobley, P. W. & Gordon, L. M. (1998). Conformational mapping of a viral fusion peptide in structure-promoting solvents using circular dichroism and electrospray mass spectrometry. *Proteins: Struct. Funct. Genet. Suppl.* **2**, 38–49.
35. Wasniewski, C. M., Parkanzky, P. D., Bodner, M. L. & Weliky, D. P. (2004). Solid-state nuclear magnetic resonance studies of HIV and influenza fusion peptide orientations in membrane bilayers using stacked glass plate samples. *Chem. Phys. Lipids*, **132**, 89–100.
36. Yang, J., Parkanzky, P. D., Khunte, B. A., Canlas, C. G., Yang, R., Gabrys, C. M. & Weliky, D. P. (2001). Solid state NMR measurements of conformation and conformational distributions in the membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *J. Mol. Graph. Model.* **19**, 129–135.
37. Yang, J., Gabrys, C. M. & Weliky, D. P. (2001). Solid-state nuclear magnetic resonance evidence for an extended beta strand conformation of the membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *Biochemistry*, **40**, 8126–8137.
38. Yang, J. & Weliky, D. P. (2003). Solid-state nuclear magnetic resonance evidence for parallel and antiparallel strand arrangements in the membrane-associated HIV-1 fusion peptide. *Biochemistry*, **42**, 11879–11890.
39. Yang, R., Yang, J. & Weliky, D. P. (2003). Synthesis, enhanced fusogenicity, and solid state NMR measurements of cross-linked HIV-1 fusion peptides. *Biochemistry*, **42**, 3527–3535.
40. Yang, R., Prorok, M., Castellino, F. J. & Weliky, D. P. (2004). A trimeric HIV-1 fusion peptide construct which does not self-associate in aqueous solution and which has 15-fold higher membrane fusion rate. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14722–14723.
41. Gordon, L. M., Curtain, C. C., Zhong, Y. C., Kirkpatrick, A., Mobley, P. W. & Waring, A. J. (1992). The amino-terminal peptide of HIV-1 glycoprotein 41 interacts with human erythrocyte membranes: peptide conformation, orientation and aggregation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1139**, 257–274.
42. Jaroniec, C. P., Kaufman, J. D., Stahl, S. J., Viard, M., Blumenthal, R., Wingfield, P. T. & Bax, A. (2005). Structure and dynamics of micelle-associated human immunodeficiency virus gp41 fusion domain. *Biochemistry*, **44**, 16167–16180.
43. Peisajovich, S. G., Epand, R. F., Pritsker, M., Shai, Y. & Epand, R. M. (2000). The polar region consecutive to the HIV fusion peptide participates in membrane fusion. *Biochemistry*, **39**, 1826–1833.
44. Buzon, V., Padros, E. & Cladera, J. (2005). Interaction of fusion peptides from HIV gp41 with membranes: a time-resolved membrane binding, lipid mixing, and structural study. *Biochemistry*, **44**, 13354–13364.
45. Martin, I., Defrise-Quertain, F., Decroly, E., Vandenbranden, M., Brasseur, R. & Ruysschaert, J. M. (1993). Orientation and structure of the NH<sub>2</sub>-terminal HIV-1 gp41 peptide in fused and aggregated liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1145**, 124–133.
46. Sackett, K. & Shai, Y. (2002). The HIV-1 gp41 N-terminal heptad repeat plays an essential role in membrane fusion. *Biochemistry*, **41**, 4678–4685.
47. Wexler-Cohen, Y., Sackett, K. & Shai, Y. (2005). The role of the N-terminal heptad repeat of HIV-1 in the

- actual lipid mixing step as revealed by its substitution with distant coiled coils. *Biochemistry*, **44**, 5853–5861.
48. Maddox, M. W. & Longo, M. L. (2002). Conformational partitioning of the fusion peptide of HIV-1 gp41 and its structural analogs in bilayer membranes. *Biophys. J.* **83**, 3088–3096.
  49. Wong, T. C. (2003). Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion peptide by molecular dynamics simulation. II. The glycine mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1609**, 45–54.
  50. Brasseur, R. (2000). Tilted peptides: a motif for membrane destabilization (hypothesis). *Mol. Membr. Biol.* **17**, 31–40.
  51. Lins, L., Charlotheaux, B., Thomas, A. & Brasseur, R. (2001). Computational study of lipid-destabilizing protein fragments: towards a comprehensive view of tilted peptides. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **44**, 435–447.
  52. Peuvot, J., Schanck, A., Lins, L. & Brasseur, R. (1999). Are the fusion processes involved in birth, life and death of the cell depending on tilted insertion of peptides into membranes? *J. Theor. Biol.* **198**, 173–181.
  53. Ducarme, P., Rahman, M. & Brasseur, R. (1998). IMPALA: a simple restraint field to simulate the biological membrane in molecular structure studies. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **30**, 357–371.
  54. Basyn, F., Charlotheaux, B., Thomas, A. & Brasseur, R. (2001). Prediction of membrane protein orientation in lipid bilayers: a theoretical approach. *J. Mol. Graph. Model.* **20**, 235–244.
  55. Basyn, F., Spies, B., Bouffieux, O., Thomas, A. & Brasseur, R. (2003). Insertion of X-ray structures of proteins in membranes. *J. Mol. Graph. Model.* **22**, 11–21.
  56. Adam, B., Lins, L., Stroobant, V., Thomas, A. & Brasseur, R. (2004). Distribution of hydrophobic residues is crucial for the fusogenic properties of the Ebola virus GP2 fusion peptide. *J. Virol.* **78**, 2131–2136.
  57. Thomas, A., Allouche, M., Basyn, F., Brasseur, R. & Kerfelec, B. (2005). Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 40074–40083.
  58. Lins, L., Charlotheaux, B., Heinen, C., Thomas, A. & Brasseur, R. (2006). “De novo” design of peptides with specific lipid-binding properties. *Biophys. J.* **90**, 470–479.
  59. Pereira, F. B., Goni, F. M. & Nieva, J. L. (1995). Liposome destabilization induced by the HIV-1 fusion peptide effect of a single amino acid substitution. *FEBS Letters*, **362**, 243–246.
  60. Pereira, F. B., Valpuesta, J. M., Basanez, G., Goni, F. M. & Nieva, J. L. (1999). Interbilayer lipid mixing induced by the human immunodeficiency virus type-1 fusion peptide on large unilamellar vesicles: the nature of the nonlamellar intermediates. *Chem. Phys. Lipids*, **103**, 11–20.
  61. El Kirat, K., Lins, L., Brasseur, R. & Dufrene, Y. F. (2005). Fusogenic tilted peptides induce nanoscale holes in supported phosphatidylcholine bilayers. *Langmuir*, **21**, 3116–3121.
  62. Eisenberg, D., Weiss, R. M. & Terwilliger, T. C. (1982). The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*, **299**, 371–374.
  63. Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. & Wall, R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* **179**, 125–142.
  64. Eisenberg, D., Weiss, R. M. & Terwilliger, T. C. (1984). The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **81**, 140–144.
  65. Callebaut, I., Labesse, G., Durand, P., Poupon, A., Canard, L., Chomilier, J. *et al.* (1997). Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* **53**, 621–645.
  66. Gaboriaud, C., Bissery, V., Benchetrit, T. & Mornon, J. P. (1987). Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Letters*, **224**, 149–155.
  67. Lemesle-Varloot, L., Henrissat, B., Gaboriaud, C., Bissery, V., Morgat, A. & Mornon, J. P. (1990). Hydrophobic cluster analysis: procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. *Biochimie*, **72**, 555–574.
  68. Woodcock, S., Mornon, J. P. & Henrissat, B. (1992). Detection of secondary structure elements in proteins by hydrophobic cluster analysis. *Protein Eng.* **5**, 629–635.
  69. Brasseur, R., Lorge, P., Goormaghtigh, E., Ruysschaert, 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.
  70. Horth, M., Lambrecht, B., Khim, M. C., Bex, F., Thiriart, C., Ruysschaert, J. M. *et al.* (1991). Theoretical and functional analysis of the SIV fusion peptide. *EMBO J.* **10**, 2747–2755.
  71. Martin, I., Dubois, M. C., Defrise-Quertain, F., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R. & Ruysschaert, J. M. (1994). Correlation between fusogenicity of synthetic modified peptides corresponding to the NH<sub>2</sub>-terminal extremity of simian immunodeficiency virus gp32 and their mode of insertion into the lipid bilayer: an infrared spectroscopy study. *J. Virol.* **68**, 1139–1148.
  72. Voneche, V., Portetelle, D., Kettmann, R., Willems, L., Limbach, K., Paoletti, E. *et al.* (1992). Fusogenic segments 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. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 3810–3814.
  73. 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.
  74. Colotto, A., Martin, I., Ruysschaert, J. M., Sen, A., Hui, S. W. & Epanand, R. M. (1996). Structural study of the interaction between the SIV fusion peptide and model membranes. *Biochemistry*, **35**, 980–989.
  75. Luneberg, J., Martin, I., Nussler, F., Ruysschaert, J. M. & Herrmann, A. (1995). Structure and topology of the influenza virus fusion peptide in lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **270**, 27606–27614.
  76. Schanck, A., Peuvot, J. & Brasseur, R. (1998). Influence of the mode of insertion of SIV peptides into membranes on the structure of model membrane as studied by <sup>31</sup>P NMR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250**, 12–14.
  77. Martin, I., Epanand, R. M. & Ruysschaert, J. M. (1998). Structural properties of the putative fusion peptide of fertilin, a protein active in sperm-egg fusion, upon interaction with the lipid bilayer. *Biochemistry*, **37**, 17030–17039.



78. Talmud, P., Lins, L. & Brasseur, R. (1996). Prediction of signal peptide functional properties: a study of the orientation and angle of insertion of yeast invertase mutants and human apolipoprotein B signal peptide variants. *Protein Eng.* **9**, 317–321.
79. Mingeot-Leclercq, M. P., Lins, L., Bensliman, M., Van Bambeke, F., Van Der, S. P., Peuvot, J. *et al.* (2002). Membrane destabilization induced by beta-amyloid peptide 29–42: importance of the amino-terminus. *Chem. Phys. Lipids*, **120**, 57–74.
80. Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Talusnot, C., Brasseur, R., Vandekerckhove, J. *et al.* (1996). Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* **271**, 28757–28765.
81. Del Angel, V. D., Dupuis, F., Mornon, J. P. & Callebaut, I. (2002). Viral fusion peptides and identification of membrane-interacting segments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1153–1160.
82. Tamm, L. K. & Han, X. (2000). Viral fusion peptides: a tool set to disrupt and connect biological membranes. *Biosci. Rep.* **20**, 501–518.
83. Galasko, D. (1998). Cerebrospinal fluid levels of A beta 42 and tau: potential markers of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* **53**, 209–221.
84. Gooch, M. D. & Stennett, D. J. (1996). Molecular basis of Alzheimer's disease. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **53**, 1545–1557.
85. Shoji, M. (2002). Cerebrospinal fluid Abeta40 and Abeta42: natural course and clinical usefulness. *Front. Biosci.* **7**, d997–d1006.
86. Fernandez, A. & Berry, R. S. (2003). Proteins with H-bond packing defects are highly interactive with lipid bilayers: implications for amyloidogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 2391–2396.
87. Soto, C. & Frangione, B. (1995). Two conformational states of amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurosci. Letters*, **186**, 115–118.
88. Ravault, S., Soubias, O., Saurel, O., Thomas, A., Brasseur, R. & Milon, A. (2005). Fusogenic Alzheimer's peptide fragment Abeta (29–42) in interaction with lipid bilayers: secondary structure, dynamics, and specific interaction with phosphatidyl ethanolamine polar heads as revealed by solid-state NMR. *Protein Sci.* **14**, 1181–1189.
89. Decaffmeyer, M., Lins, L., Charlotiaux, B., Vaneyck, M. H., Thomas, A. & Brasseur, R. (2006). Rational design of complementary peptides to the betaAmyloid 29–42 fusion peptide: an application of PepDesign. *Biochim. Biophys. Acta*, in the press.
90. Ugolini, S., Mondor, I. & Sattentau, Q. J. (1999). HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol.* **7**, 144–149.
91. Bernstein, H. B., Tucker, S. P., Kar, S. R., McPherson, S. A., McPherson, D. T., Dubay, J. W. *et al.* (1995). Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41. *J. Virol.* **69**, 2745–2750.
92. Chen, S. S., Lee, S. F., Hao, H. J. & Chuang, C. K. (1998). Mutations in the leucine zipper-like heptad repeat sequence of human immunodeficiency virus type 1 gp41 dominantly interfere with wild-type virus infectivity. *J. Virol.* **72**, 4765–4774.
93. Dubay, J. W., Roberts, S. J., Brody, B. & Hunter, E. (1992). Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity. *J. Virol.* **66**, 4748–4756.
94. Lu, M., Ji, H. & Shen, S. (1999). Subdomain folding and biological activity of the core structure from human immunodeficiency virus type 1 gp41: implications for viral membrane fusion. *J. Virol.* **73**, 4433–4438.
95. Pombourios, P., Wilson, K. A., Center, R. J., El Ahmar, W. & Kemp, B. E. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein oligomerization requires the gp41 amphipathic alpha-helical/leucine zipper-like sequence. *J. Virol.* **71**, 2041–2049.
96. Shugars, D. C., Wild, C. T., Greenwell, T. K. & Matthews, T. J. (1996). Biophysical characterization of recombinant proteins expressing the leucine zipper-like domain of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. *J. Virol.* **70**, 2982–2991.
97. Wild, C., Dubay, J. W., Greenwell, T., Baird, T., Jr, Oas, T. G., McDanal, C. *et al.* (1994). Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 12676–12680.
98. 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 Struct. Biol.* **8**, 715–720.
99. Creighton, T. E. (1997). In *Proteins: Structures and Molecular Properties, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data* (Creighton, T. E., ed.), 2nd edit, p. 507, W. H. Freeman and Company, New York.
100. Lins, L., Ducarme, P., Breukink, E. & Brasseur, R. (1999). Computational study of nisin interaction with model membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **1420**, 111–120.
101. Vogt, B., Ducarme, P., Schinzel, S., Brasseur, R. & Bechinger, B. (2000). The topology of lysine-containing amphipathic peptides in bilayers by circular dichroism, solid-state NMR, and molecular modeling. *Biophys. J.* **79**, 2644–2656.
102. Aloia, R. C., Tian, H. & Jensen, F. C. (1993). Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 5181–5185.
103. Barlett, G. R. (1959). Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids. *J. Biol. Chem.* **65**, 2146–2156.
104. Ellens, H., Bentz, J. & Szoka, F. C. (1985). H<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-induced fusion and destabilization of liposomes. *Biochemistry*, **24**, 3099–3106.

Edited by J. Karn

(Received 17 February 2006; accepted 3 April 2006)  
Available online 25 April 2006