

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CONVERSION CONFORMATIONNELLE SECONDAIRE ET QUATERNAIRE
D'HORMONES PEPTIDIQUES: ÉQUILIBRE ENTRE FONCTION BIOLOGIQUE
ET AUTO-ASSEMBLAGE PATHOLOGIQUE

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR
NOÉ QUITTOT

SEPTEMBRE 2020

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Au Professeur Steve Bourgault, à qui je souhaite tout d'abord exprimer ma gratitude pour m'avoir accepté en tant qu'étudiant au doctorat au sein de son laboratoire. Merci d'avoir été un directeur de thèse présent et à l'écoute tout au long de mon doctorat.

À Steve, merci de ta bienveillance à mon égard et à celle de ma famille. Merci également, quoi qu'on puisse en dire, de ta patience!

À mes parents, que j'ai su peu rassurés à mon départ, je vous remercie de m'avoir fait confiance et surtout de me soutenir depuis le début. Je remercie aussi mes frères qui sont toujours une source d'inspiration, Lydia et mes grands-parents pour leur soutien.

Je voudrais remercier chaleureusement mes brillants collègues auprès desquel.les j'ai pu tant apprendre et dont je garde d'excellents souvenirs. Merci à Carole-Anne, Trang, Armelle, Mathieu, Margaryta, Billel, Mathew, Ximena, Guillaume, Soultan, Élisabeth, Mathilde, Nadjib, Mélanie, Barbara et Alexandre.

Je souhaite également remercier mes ami.es en France pour m'avoir soutenu malgré la distance.

Enfin, à Dishani, à qui je pense pouvoir adresser mille merci pour tout, tous les jours, et à toi mon petit Léo d'être là. À nous trois, la suite promet d'être belle.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xii
RÉSUMÉ	xvi
CHAPITRE I: INTRODUCTION	1
1.1 Ligands peptidiques des récepteurs couplés aux protéines G de la classe B	1
1.1.1 Membres et structure primaire	1
1.1.2 Récepteurs couplés aux protéines G de la classe B	4
1.1.3 Fonctions biologiques des RCPG de la classe B	7
1.1.4 Structure secondaire des ligands peptidiques	10
1.1.5 Auto-assemblage et structure quaternaire des ligands peptidiques	11
1.2 Amyloïdes	12
1.2.1 Amyloïdes fonctionnels	13
1.2.2 Amyloïdes pathologiques	16
1.2.3 Organisation supramoléculaire des assemblages amyloïdes	18
1.2.4 Mécanisme d'auto-assemblage des polypeptides amyloïdogéniques	21
1.3 Diabète de type II et dépôts amyloïdes	23
1.3.1 Caractéristiques du diabète de type II	23
1.3.2 Dépôts amyloïdes pancréatiques	24
1.4 Islet amyloid polypeptide	25
1.4.1 Expression, maturation et entreposage de l'IAPP	25
1.4.2 Phylogénie de l'IAPP	27
1.4.3 Structure secondaire de l'IAPP	29

1.4.4 Activités biologiques et rôle pathologique de l'IAPP	31
1.4.5 Structure des fibres amyloïdes d'IAPP	32
1.4.6 Mécanismes d'auto-assemblage de l'IAPP	35
1.4.7 Cytotoxicité de l'IAPP	36
1.4.7.1 Espèces cytotoxiques de l'IAPP	36
1.4.7.2 Mécanismes de cytotoxicité de l'IAPP	38
1.4.8 Rôle des glycosaminoglycanes dans l'auto-assemblage et la cytotoxicité de l'IAPP	41
1.4.9 Inhibiteurs de la formation des fibres amyloïdes	43
1.5 Sécrétine	45
1.5.1 Activités biologiques de la sécrétine	45
1.5.2 Modèle de la catalyse membranaire	47
1.6 Glycosaminoglycanes	49
1.7 Problématique et hypothèse	51
1.8 Objectifs	53
CHAPITRE II: ARTICLE I: KINETIC AND CONFORMATIONAL INSIGHTS INTO ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE SELF-ASSEMBLY USING A BIARSENICAL FLUOROGENIC PROBE	54
Contributions des auteurs	55
2.1 Résumé	56
2.2 Abstract	57
2.3 Introduction	58
2.4 Experimental section	61
2.4.1 Peptides Synthesis	61
2.4.2 IAPP Sample Preparation	61
2.4.3 Fluorescence Measurement	62
2.4.4 Circular Dichroism Spectroscopy	62
2.4.5 Dynamic light scattering	63
2.4.6 Atomic force microscopy	63
2.4.7 Transmission Electron Microscopy	64
2.4.8 Preparation of Large Unilamellar Vesicles	64

2.4.9 Kinetics of Self-Assembly	64
2.4.10 Photochemical-Induced Cross-Linking (PICUP)	65
2.5 Results and discussion	66
2.5.1 FIAsh detects IAPP amyloid fibrils but not prefibrillar species	66
2.5.2 Kinetics of IAPP self-assembly with FIAsh detection	70
2.5.3 Cys-Cys motif at the C-terminus allows FIAsh detection of prefibrillar species	74
2.5.4 IAPP oligomerization can be monitored by introducing a Cys-Cys motif at the C-terminus	78
2.5.5 Stability of the tetra-Cys motif within prefibrillar species	81
2.5.6 FIAsh detection of oligomers assembled from the non-amyloidogenic rodent IAPP	83
2.5.7 Detection of ThT-negative amyloid fibrils with FIAsh	86
2.5.8 Monitoring self-assembly with FIAsh detection in presence of biological co-factors and inhibitors	88
2.6 Conclusion	90
2.7 Acknowledgments.....	91
CHAPITRE III: ARTICLE II: CELL SURFACE GLYCOSAMINOGLYCANS EXACERBATE PLASMA MEMBRANE PERTURBATION INDUCED BY THE ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE	
Contribution des auteurs	93
3.1 Résumé	94
3.2 Abstract	95
3.3 Introduction	96
3.4 Materials and methods	99
3.4.1 Peptide Synthesis and sample preparation	99
3.4.2 Cell based assays	100
3.4.3 Enzymatic digestion of cell surface GAGs	101
3.4.4 Evaluation of IAPP sequestration by flow cytometry and confocal microscopy.....	101
3.4.5 Preparation of giant plasma membrane vesicles	102
3.4.6 Kinetics of amyloid self-assembly	103

3.4.7 Atomic Force Microscopy	104
3.4.8 Transmission electronic microscopy (TEM)	104
3.4.9 Photochemical-Induced Cross-Linking (PICUP)	104
3.4.10 Fluorescence spectroscopy	105
3.5 Results	105
3.5.1 Cell surface GAGs potentiate IAPP cytotoxicity	105
3.5.2 Cytotoxicity of IAPP quaternary proteospecies is independent of the presence of cell surface GAGs	109
3.5.3 Cell surface GAGs sequester IAPP	114
3.5.4 Preparation of giant vesicles derived from CHO plasma membrane ..	116
3.5.5 GAGs promote IAPP-induced membrane disassembly of GPMVs....	118
3.5.6 GPMV-embedded GAGs have a modest effect on IAPP amyloid self-assembly	121
3.6 Discussion	124
3.7 Acknowledgments.....	128
CHAPITRE IV: ARTICLE III: IDENTIFICATION OF A CONFORMATIONAL HEPARIN-RECOGNITION MOTIF ON THE PEPTIDE HORMONE SECRETIN: KEY ROLE FOR CELL SURFACE BINDING	
Contribution des auteurs	130
4.1 Résumé	131
4.2 Abstract	132
4.3 Introduction	133
4.4 Materials and methods	135
4.4.1 Peptide synthesis, purification and characterization	135
4.4.2 Cell culture	136
4.4.3 Evaluation of cell surface sequestration by flow cytometry	136
4.4.4 Confocal microscopy	137
4.4.5 Analytical heparin-affinity and ion-exchange chromatography	138
4.4.6 Circular dichroism spectroscopy	138
4.4.7 Isothermal titration calorimetry	138
4.4.8 Surface plasmon resonance	139

4.5 Results	140
4.5.1 GAGs mediate cell surface binding of secretin	140
4.5.2 Characterization of secretin–heparin interaction	142
4.5.3 Heparin binding stabilizes secretin α -helical structure	144
4.5.4 Identification of a conformational heparin-binding motif.....	146
4.5.5 Role of secretin secondary conformation for GAG-mediated cell surface binding	150
4.6 Discussion	151
4.7 Acknowledgments.....	154
CHAPITRE V: DISCUSSION	155
5.1 Utilisation d’une sonde fluorogénique pour étudier la cinétique et le mécanisme de l’auto-assemblage de l’IAPP	156
5.2 Contributions des glycosaminoglycanes dans la perturbation membranaire induite par l’IAPP	160
5.3 Identification d’un site de liaison conformationnel de l’héparine chez l’hormone peptidique sécrétine	164
5.4 Conclusions et perspectives	167
BIBLIOGRAPHIE	169

LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1.1	Représentation schématique d'un récepteur couplé aux protéines G..... 5
1.2	Représentation schématique du cycle d'activation et de désactivation de la protéine G..... 6
1.3	Comparaison des trois familles majeures de RCPG..... 7
1.4	Modèle de liaison des ligands peptidiques avec les RCPG de la classe B..... 11
1.5	Organisation des fibres amyloïdes 19
1.6	Modèles de structures moléculaires pour trois fibres amyloïdes de l'A β 20
1.7	Formation de fibres amyloïdes via le mécanisme de polymérisation nucléée..... 23
1.8	Processus de maturation de l'IAPP 26
1.9	Structures secondaires de l'IAPP 30
1.10	Composants du récepteur de l'IAPP 32
1.11	Modèles des fibres amyloïdes provenant de l'auto-assemblage de l'IAPP ... 34
1.12	Espèces toxiques de l'IAPP..... 37
1.13	Représentation schématique de la perméabilisation membranaire induite par l'IAPP..... 39
1.14	Structure primaire de la préprosecréatine 46
1.15	Représentation en ruban de la structure hélicoïdale de la sécrétine 46
1.16	Hypothèse de la catalyse membranaire 49
1.17	Répétition des unités de disaccharides présentes dans les différentes classes de GAGs..... 51
2.1	Résumé graphique 55
2.2	Schematic representation of the formation of a non-contiguous tetracysteine motif formed during IAPP self-assembly allowing FIAsh binding..... 60

2.3	Detection of IAPP amyloid fibrils by FIAsh	68
2.4	S2S7 fibrils are ThT positive.....	69
2.5	SDS-PAGE of photochemically cross-linked IAPP prefibrillar species.....	69
2.6	Dynamic light scattering analysis of IAPP prefibrillar species and amyloid fibrils	69
2.7	Representative kinetics of IAPP and S2S7 self-assembly monitored by ThT and FIAsh fluorescence	72
2.8	FIAsh binding to noncontiguous tetra-Cys tag without self-assembly.....	72
2.9	IAPP and S2S7 self-assembled in presence of FIAsh	73
2.10	Kinetics of IAPP self-assembly monitored by ThT, FIAsh and ThT-to-FIAsh Förster resonance energy transfer (FRET).....	73
2.11	Kinetics of IAPP and S2S7 self-assembly in presence or absence of BAL and/or TCEP monitored by ThT fluorescence	74
2.12	Detection of IAPP-CC prefibrillar species by FIAsh	76
2.13	Dynamic light scattering analysis of CC-IAPP and IAPP-CC.....	77
2.14	SDS-PAGE of CC-IAPP and IAPP-CC prefibrillar species photochemically cross-linked.....	77
2.15	CC-IAPP and IAPP-CC fibrils display a characteristic β -sheet secondary structure and are ThT positives	78
2.16	Representative kinetics of self-assembly of CC-IAPP and IAPP-CC monitored by ThT and FIAsh fluorescence	79
2.17	Kinetics of CC-IAPP and IAPP-CC self-assembly in presence or absence of BAL and/or TCEP monitored by ThT fluorescence	80
2.18	CC-IAPP and IAPP-CC self-assembled in presence of FIAsh.....	80
2.19	Competition assay for FIAsh binding	82
2.20	Competition assay for FIAsh binding with WCGGPK.....	83
2.21	FIAsh detection of rIAPP oligomers	85
2.22	Dynamic light scattering analysis of rIAPP-CC	85
2.23	rIAPP and the Cys-Cys derivatives oligomerization monitored by FIAsh in presence or absence of BAL.....	86
2.24	FIAsh detection of ThT negative pIAPP fibrils	87
2.25	CD spectra of CC-pIAPP prefibrillar species and fibrils.....	87

2.26	Kinetics of IAPP self-assembly monitored by ThT and FIAsh detection.....	89
3.1	Cell surface GAGs potentiate IAPP cytotoxicity	107
3.2	hIAPP mediated cytotoxicity at high concentration is independent of the presence of GAGs and cell density	108
3.3	Enzymatic digestion of cell surface GAGs protects against IAPP cytotoxicity	109
3.4	Cell surface GAGs do not affect the toxicity of IAPP quaternary species .	112
3.5	Membrane perturbation is not induced by amyloid fibrils	113
3.6	Treatment of exogenous monomeric rIAPP is not associated with cytotoxicity	113
3.7	Photochemically cross-linked of pre-incubated rIAPP	113
3.8	Cell surface GAGs sequester IAPP	116
3.9	Preparation of giant plasma membrane vesicles	118
3.10	GAGs contribute to the disassembly of GPMVs mediated by IAPP	120
3.11	Disassembly of GPMVs by IAPP quaternary proteospecies is independent of GAGs	121
3.12	GPMVs have a negligible effect on the kinetics of IAPP self-assembly	123
3.13	IAPP self-assembly is drastically increased by the presence of soluble heparin and LUVs	124
3.14	IAPP self-assembly is independent of the presence of GAGs at the GPMVs surface	124
4.1	GAGs mediate cell surface binding of secretin	141
4.2	Soluble heparin inhibits cell surface binding of secretin	142
4.3	Characterization of secretin-heparin interaction	144
4.4	Binding of secretin to heparin stabilizes α -helical conformation	146
4.5	Destabilization of secretin α -helix inhibits binding to sulfated GAGs	148
4.6	Conformational transition of secretin derivatives induced by heparin	148
4.7	Binding of secretin derivatives to heparin by isothermal titration calorimetry	149
4.8	Contribution of individual Arg residues in binding to heparin	150
4.9	Role of secretin α -helical structure in cell surface binding	151

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Sous-familles, membres et structure primaire de la famille sécrétine/glucagon/GHRH	3
1.2 Membres et structure primaire de la famille calcitonine	4
1.3 Rôle(s) biologique(s) des RCPGs de la classe B	8
1.4 Classification et exemples d'amyloïdes fonctionnels	15
1.5 Exemples de précurseurs protéiques impliqués dans la formation de dépôts amyloïdes associés à des pathologies	17
1.6 Phylogénie de l'IAPP	28
1.7 Phylogénie de la sécrétine	46

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ACN	Acétonitrile
AFM	Microscopie à force atomique
AMD	Adrénomédulline
ANS	<i>anilino-1-naphtalensulfonic acid</i>
ARN	Acide ribonucléique
Atg7	<i>Autophagy-related genes 7</i>
A β	Amyloïde- β
BD-oligo	<i>BoDipy-Oligomer</i>
CALC	Calcitonine
CD	Dichroïsme circulaire
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
CPP	Peptide de penetration cellulaire
Da	<i>Dalton</i>
DAP	<i>Diabetes-associated peptide</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DIEA	Diisopropylethylamine
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)
DPC	Dodécylphosphocholine
DTII	Diabète de type II
DTT	Dithiothreitol
ECL	Boucles extracellulaires

ECM	Matrice extracellulaire
EDT	Ethanedithiol
EGCG	Flavanol de gallate d'épigallocatechine
FAST DiO	3,3'-dilinoleyloxacarboyanine perchlorate
FBS	Sérum de veau fœtal
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FlAsH	<i>Fluorescein arsenical hairpin</i>
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
GCG	Glucagon
GHRH	Hormone de libération de l'hormone de croissance
GIP	Peptide insulino-trope dépendant du glucose
GLP1	<i>Glucagon-Like Peptide 1</i>
GLP2	<i>Glucagon-Like Peptide 2</i>
GPMV	Vésicule géante de la membrane plasmique
HCTU	2-(6-chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HS	Héparane sulfate
HSPG	Protéoglycanes d'héparane sulfate
IAP	<i>Insulinoma amyloid peptide</i>
IAPP	<i>Islet amyloid polypeptide</i>
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
ICL	Boucles intracellulaires
ITC	Titrage calorimétrique isotherme
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
K _d	Constante de dissociation
LDH	Lactate déshydrogénase
LUV	Larges vésicules unilamellaires
MRE	Ellipticité moyenne des résidus

NEM	N-ethyl maleimide
PACAP	<i>Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide</i>
PAM	<i>Peptidyl amidating mono oxygenase</i>
PBS	Tampon phosphate salin
PFA	Paraformaldéhyde
p-FTAA	4',3'''-bis(carboxymethyl) [2,2';5',2'';5'',2''';5''',2'''''] quinquethiophene-5,5''''-dicarboxylic acid
PG	Protéoglycanes
PHM	Peptide histidine methionine
PICUP	<i>Photochemical-Induced Cross-Linking</i>
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine
POPS	1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phospho-L-serine
PRP	<i>PACAP Related Peptide</i>
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RAMP	<i>Receptor activity-modifying protein</i>
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
Res	Resvératrol
REMD	<i>Replica exchange molecular dynamics</i>
rIAPP	Isoforme de l'IAPP retrouvé chez le rat
Rif	Rifampicine
RIP	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPE	Résonance paramagnétique électronique
RP-HPLC	Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse
SCT	Sécrétine
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

SPR	Résonnance des plasmons de surface
T2DM	<i>Type II diabetes mellitus</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEA	Triéthylamine
TEM	Microscopie à transmission électronique
tetra-Cys	Motif tetra-cystéine
TFA	Acide trifluoroacétique
TFE	Trifluoroéthanol
ThT	Thioflavine T
TM	Domaine transmembranaire hélicoïdal
UPR	Réponse aux protéines mal-repliées
VIP	<i>Vasoactive Intestinal Peptide</i>

RÉSUMÉ

Les ligands peptidiques des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de la classe B présentent un large ensemble conformationnel et la modulation de celui-ci régule non seulement leur fonction physiologique, mais peut également conduire à des complications pathologiques. D'une part, la liaison et l'activation d'un RCPG impliquent que le ligand peptidique adopte une structure tridimensionnelle précise. Des études employant des membranes modèles ont suggéré que l'environnement de la membrane plasmique facilite l'adoption de la structure bioactive. Toutefois, ces modèles ne représentent pas la complexité membranaire, car ils omettent les glycosaminoglycanes (GAGs), qui sont des polysaccharidiques sulfatés linéaires retrouvés en abondance à la surface des cellules eucaryotes. Ainsi, la contribution des GAGs dans les transitions structurales secondaires des ligands peptidiques induites par l'environnement membranaire demeure à étudier. D'autre part, les réarrangements conformationnels quaternaires de ces ligands peptidiques peuvent conduire à la formation de dépôts amyloïdes, ces derniers étant associés à des pathologies, telles que le carcinome médullaire de la thyroïde ou le diabète de type II (DTII), ainsi qu'à des complications de formulations thérapeutiques. Par conséquent, la compréhension des mécanismes d'auto-assemblage et de la toxicité sous-adjacente est cruciale afin de prévenir les pathologies associées à l'agrégation de peptides. Parmi les mécanismes de cytotoxicité des peptides amyloïdogéniques caractérisés à ce jour, la perturbation membranaire demeure le plus partagé au sein de la communauté. Or, celle-ci est généralement étudiée à l'aide de modèles de bicouches lipidiques simples, soit en absence de la complexité et de l'hétérogénéité de la membrane plasmique, incluant la présence de GAGs. Nonobstant que les GAGs soient reconnus pour accélérer l'auto-assemblage amyloïde *in vitro* et pour moduler la cytotoxicité des peptides

amyloïdogéniques, leur rôle dans la perturbation membranaire reste à déterminer. Dans ce contexte, le premier objectif de cette thèse est de développer un nouvel outil chimique afin d'étudier les modulations conformationnelles de l'hormone peptidique *islet amyloid polypeptide* (IAPP), dont le dépôt au niveau des îlots de Langerhans pancréatiques est associé au DTII. Cet outil qui consiste en un essai basé sur la fluorescence, a conduit à l'obtention de nouvelles informations sur la cinétique et le mécanisme d'auto-assemblage de l'IAPP. Le second objectif vise à élucider le rôle des GAGs présents à la surface de la membrane plasmique sur les modulations conformationnelles quaternaires de l'IAPP et la perturbation membranaire associée. En employant des lignées cellulaires déficientes en GAGs, il a été observé que les GAGs exacerbent la perturbation membranaire et la cytotoxicité induites par l'IAPP, en favorisant sa séquestration à la surface cellulaire. L'utilisation de vésicules géantes dérivées de membrane plasmique a permis d'observer que les polysaccharides associés à la membrane ne modulent pas l'agrégation du peptide. Le troisième objectif consiste à évaluer le rôle des GAGs dans l'adsorption à la membrane plasmique de l'hormone peptidique sécrétine et leur contribution dans l'atteinte de la conformation bioactive. Nos résultats montrent que les GAGs participent activement à l'adsorption de la sécrétine. Le design de dérivés de la sécrétine affichant un ensemble conformationnel restreint a permis de montrer la formation d'un motif de reconnaissance spatiale spécifique aux GAGs suite au repliement hélicoïdal de la sécrétine. En conclusion, les GAGs à la surface cellulaire favorisent une augmentation de la concentration locale des hormones peptidiques sécrétine et IAPP. Dans un contexte physiologique, cette interaction induit une transition conformationnelle secondaire du peptide vers sa structure bioactive. En revanche, dans un contexte pathologique associé à l'agrégation amyloïde, cette interaction participe à la perturbation membranaire et à la mort cellulaire sous-adjacente.

Mots clés: Hormones peptidiques, Glycosaminoglycanes, Transition conformationnelle, Fibres amyloïdes, *Islet amyloid polypeptide*, Sécrétine.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Ligands peptidiques des récepteurs couplés aux protéines G de la classe B

Chez les organismes vivants pluricellulaires, de nombreux processus physiologiques essentiels sont régulés par les interactions entre des ligands et des récepteurs membranaires. Ces interactions spécifiques permettent la transduction de signaux extracellulaires vers des voies biochimiques intracellulaires, déclenchant ainsi une réponse cellulaire précise et finalement, des effets biologiques chez l'organisme. Il existe trois grandes familles de récepteurs membranaires, soit (i) les récepteurs à activité enzymatique, (ii) les canaux ioniques et (iii) les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Chez les vertébrés, les RCPG constituent la plus grande famille de récepteurs transmembranaires (Civelli *et al.*, 2013). Par exemple, chez l'homme on dénombre plus de 800 RCPG différents, en considérant les récepteurs olfactifs (Fredriksson *et al.*, 2003). Il existe une grande variété de ligands des RCPG comme les photons, les molécules olfactives et gustatives, les ions, les neurotransmetteurs, ainsi que les peptides. Ces derniers constituent le cœur de ce travail de recherche.

1.1.1 Membres et structure primaire

Les ligands peptidiques des RCPG de la classe B regroupent 17 (neuro)hormones divisées en deux familles (Foord *et al.*, 2002). D'une part, la famille sécrétine/glucagon/GHRH comprend 11 hormones peptidiques. Par comparaison de

séquence et analyse phylogénétique au sein des vertébrés, il a été possible de mettre en évidence que cette famille est subdivisée en deux sous-familles (Cardoso *et al.*, 2010). La première sous-famille correspond à la famille d'hormones peptidiques de type *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide* (PACAP), qui comprend le PACAP27, le PACAP38, le *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP), le *Peptide Histidine Methionine* (PHM), la sécrétine (SCT), la *Growth Hormone-Releasing Hormone* (GHRH) et le *PACAP Related Peptide* (PRP), tel que répertorié dans le tableau 1.1. La deuxième sous-famille correspond aux hormones de type glucagon (GCG) et comprend en plus du GCG, le *Glucagon-Like Peptide 1* (GLP1), le *Glucagon-Like Peptide 2* (GLP2) et le *Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide* (GIP). Ces hormones peptidiques sont constituées d'au moins 27 acides aminés, incluant de nombreux résidus basiques. De plus, l'histidine en position 1 et la phénylalanine en position 6 sont hautement conservées au sein des deux sous-familles. À la position 4, on retrouve soit une alanine, soit une glycine, et une thréonine est hautement conservée en position 7. Un résidu de type aromatique (histidine ou tyrosine) se situe à la position 1 et un groupement carboxylate en position 3 est hautement conservé. Ces similarités de séquence ciblant principalement le domaine N-terminal suggèrent que celui-ci jouerait un rôle crucial pour l'activité biologique de ces hormones peptidiques.

Tableau 1.1. Sous-familles, membres et structure primaire de la famille sécrétine/glucagon/GHRH

Peptides	Séquences - Sous-famille PACAP	IS
PACAP27	- H SDGI F TDSY ¹⁰ SRYRKQMAVK ²⁰ KYLA AVL ²⁷	
PACAP38	- H SDGI F TDSY ¹⁰ S RYRKQMAVK ²⁰ K YLA AVL G KR ³⁰ YKQRVKNK ³⁸	100 %
VIP	- H SDAV F TDNY ¹⁰ TRLRKQMAVK ²⁰ KYLNSILN ²⁸	70 %
PHM	- H ADGV F TSDF ¹⁰ SKLLGQLSAK ²⁰ KYLES LM ²⁷	41 %
SCT	- H SDGT F TSEL ¹⁰ SRLREGARLQ ²⁰ RLLQGLV ²⁷	37 %
GHRH	-YADAI F TNSY ¹⁰ RKVLGQLSAR ²⁰ K LLQDIMSRQ ³⁰ QGESNQERGA ⁴⁰ RARL ⁴⁴	33 %
PRP	DVAHGILNEAY ¹¹ RKVLDQLSAG ²¹ K HLSLVA ²⁹	22 %
Peptides	Séquences - Sous-famille GCG	IS
GCG	- H SQGT F TSDY ¹⁰ SKYLDSRRAQ ²⁰ DVFQWLMNT ²⁹	
GIP	-YAEGT F ISDY ¹⁰ SIAMDKIHQQ ²⁰ DFNWLLAQK ³⁰ GKKNW KHNI ⁴⁰ TQ ⁴²	52 %
GLP1	- H AEGT F TSDV ¹⁰ SSYLEGQAAK ²⁰ EFLAWLVKGR ³⁰	52 %
GLP2	- H ADGS F SDEM ¹⁰ NTILDNLAAR ²⁰ DFINWLIQT ³⁰ ITD	41 %

Les acides aminés indiqués en rouge correspondent à ceux retrouvés chez le PACAP ou le GCG, au sein de chaque sous-famille. Le pourcentage d'identité de séquence (IS) se rapporte aux 27 premiers acides aminés comparativement au PACAP ou au GCG. En gras, les acides aminés conservés au sein des deux familles. Adapté de (Cardoso et al., 2010).

D'autre part, la famille calcitonine constitue le deuxième groupe des ligands peptidiques des RCPG de la classe B. Cette famille regroupe 6 ligands peptidiques comprenant la calcitonine (CALC), l'*islet amyloid polypeptide* (IAPP), la *calcitonin gene related peptide* (CGRP) α et β et l'adrénomédulline (AMD), tel qu'indiqué dans le tableau 1.2. Au niveau de leur structure primaire, ces hormones affichent une extrémité C-terminale amidée ainsi que deux cystéines hautement conservées dans la région N-terminale (Naot *et al.*, 2019).

Tableau 1.2. Membres et structure primaire de la famille calcitonine

Peptides	Séquences
CALC	C GNLST C MLG ¹⁰ TYTQDFNK F H ²⁰ T-----FPQTAIGVG ³⁰ AP ³²
IAPP	K C -NTAT C ATQ ¹⁰ RLANFLVHSS ²⁰ N N FGAILSS T ³⁰ NVGSNTY ³⁷
α -CGRP	A C -DTAT C VTH ¹⁰ RLAGLLSRSG ²⁰ G V VK N FVPT ³⁰ NVGS K A F ³⁷
β -CGRP	A C -NTAT C VTH ¹⁰ RLAGLLSRSG ²⁰ G M V K S N FVPT ³⁰ NVGS K A F ³⁷
AMD	YRQSMNNFQ G ¹⁰ LRS F G -R F G T C TVQ ²⁴ KLAHQIYQ F T ³⁴ DKDKDNVAPR ⁴⁴ SKIS P QGY ⁵²
IMD	V G C - V L G T C QVQ ¹¹ NLSHRLWQLM ²¹ GPAGRQDSAP ³¹ VDPSSPHSY ⁴⁰

Les acides aminés indiqués en rouge correspondent à ceux retrouvés chez la calcitonine. En gras, les cystéines conservées au sein de la famille calcitonine. Adapté de (Naot et al., 2019).

1.1.2 Récepteurs couplés aux protéines G de la classe B

Les RCPG partagent une architecture moléculaire commune, ainsi que des mécanismes de transduction du signal similaires, impliquant entre autres l'intervention d'une protéine G (GTPase hétérotrimérique) (Bridges et Lindsley, 2008; Martin *et al.*, 2005). Les RCPG sont des protéines transmembranaires caractérisées par un domaine extracellulaire N-terminal, trois boucles extracellulaires (ECL), sept domaines transmembranaires hélicoïdaux (TM), trois boucles intracellulaires (ICL), et une région C-terminale intracellulaire (Figure 1.1) (Lefkowitz, 2004).

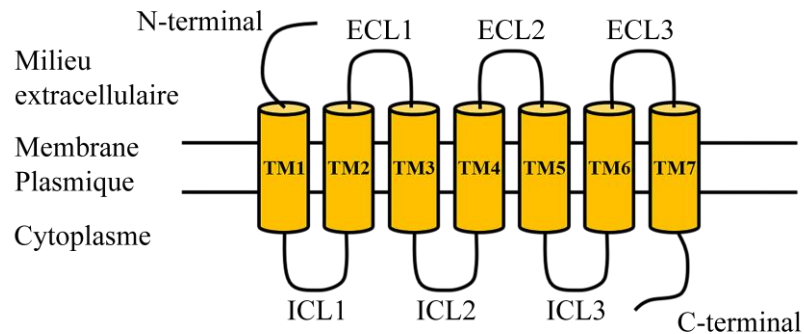


Figure 1.1. Représentation schématique d'un récepteur couplé aux protéines G. TM : domaine transmembranaire hélicoïdal, ECL : boucle extracellulaire, ICL : boucle intracellulaire.

La liaison d'un ligand au récepteur induit un réarrangement conformationnel des domaines transmembranaires et intracellulaires, modulant l'interaction du récepteur avec une protéine G hétérotrimérique cytoplasmique (Gether, 2000). Cette interaction induit la libération de GDP par la sous-unité $G\alpha$ et permet la liaison du GTP. Les sous-unités activées $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ peuvent alors s'associer à des effecteurs de différentes voies de signalisation intracellulaire (Figure 1.2) (Ritter et Hall, 2009). Ainsi, l'activation des RCPG permet la transduction du signal par la régulation intracellulaire de seconds messagers qui induisent l'activation de cascades de signalisation et entraînent une réponse cellulaire (Martin *et al.*, 2005). De plus, les voies de signalisation intracellulaire peuvent être déclenchées indépendamment des protéines G, notamment par une famille de protéines cytosoliques nommée β -arrestin (Jean-Charles *et al.*, 2017). Cette famille fut initialement découverte pour leur rôle dans l'inhibition de la signalisation induite par les RCPG via la protéine G. Cependant, il est maintenant reconnu que ces protéines peuvent déclencher des voies de signalisation spécifiques par l'activation de kinases et ce, de façon indépendante de l'activation des protéines G.

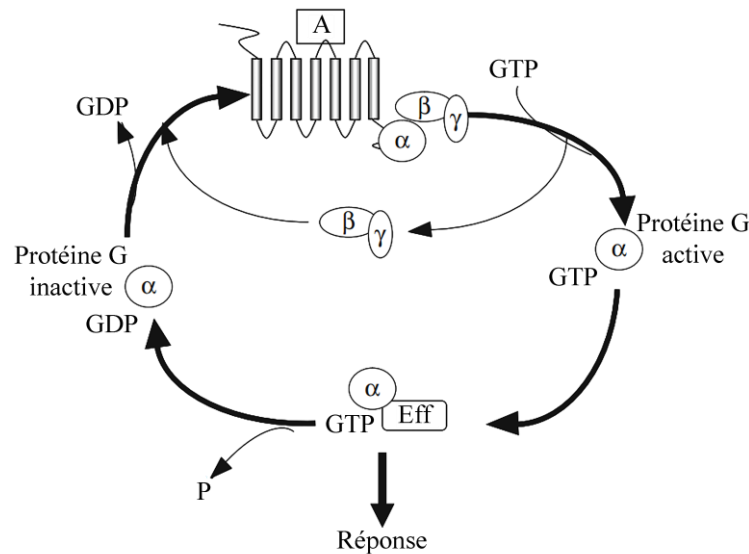


Figure 1.2. Représentation schématique du cycle d'activation et de désactivation de la protéine G. La liaison d'un agoniste (A) induit un changement conformationnel du récepteur, facilitant son interaction avec la protéine G hétérotrimérique. Cette interaction induit une diminution de l'affinité de la sous-unité $G\alpha$ pour le GDP qui est libéré. Par la suite, le GTP se lie et active la sous-unité α et se dissocie du récepteur et des sous-unités $\beta\gamma$. La sous-unité α active interagit avec des effecteurs protéiques spécifiques et change ainsi la concentration de molécules signales intracellulaires, telles que l'adénosine monophosphate cyclique et le Ca^{2+} . L'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité α hydrolyse la GTP en GDP et se dissocie des effecteurs protéiques. La sous-unité α inactivée s'associe de nouveau avec les sous-unités $\beta\gamma$ et le cycle peut recommencer. Adapté de (Williams et Hill, 2009).

En fonction des identités de séquence et des analyses phylogénétiques, les RCPG sont classés en trois familles majeures (Figure 1.3) (Fredriksson *et al.*, 2003). Premièrement, la famille rhodopsine, aussi nommée classe A ou 1, est la plus importante avec 284 membres. Deuxièmement, la famille sécrétine, classe B ou 2, est constituée de 15 membres. Troisièmement, la famille glutamate, classe C ou 3, regroupe 22 membres (Civelli *et al.*, 2013). Plus particulièrement, les RCPG de la classe B partagent entre eux 30 et 50 % d'identité de séquence, mais moins de 12 % avec les autres familles de RCPG (Pham et Sexton, 2004). Les récepteurs de la classe B présentent un large domaine N-terminal extracellulaire comportant environ 120 résidus (Culhane *et al.*,

2015). De plus, la structure tertiaire de ce domaine N-terminal est conservé au sein de la classe B, dû à la présence de six cystéines qui permettent la formation de trois ponts disulfures (Culhane *et al.*, 2015; Pham et Sexton, 2004). L'organisation tridimensionnelle favorisée par ces ponts disulfures est essentielle pour le fonctionnement du récepteur (Vilardaga *et al.*, 1997). Ce domaine N-terminal contient également plusieurs sites de N-glycosylation (Pham et Sexton, 2004). Cette modification post-traductionnelle joue un rôle dans la liaison à haute affinité et la spécificité des ligands peptidiques (Ho *et al.*, 1999).

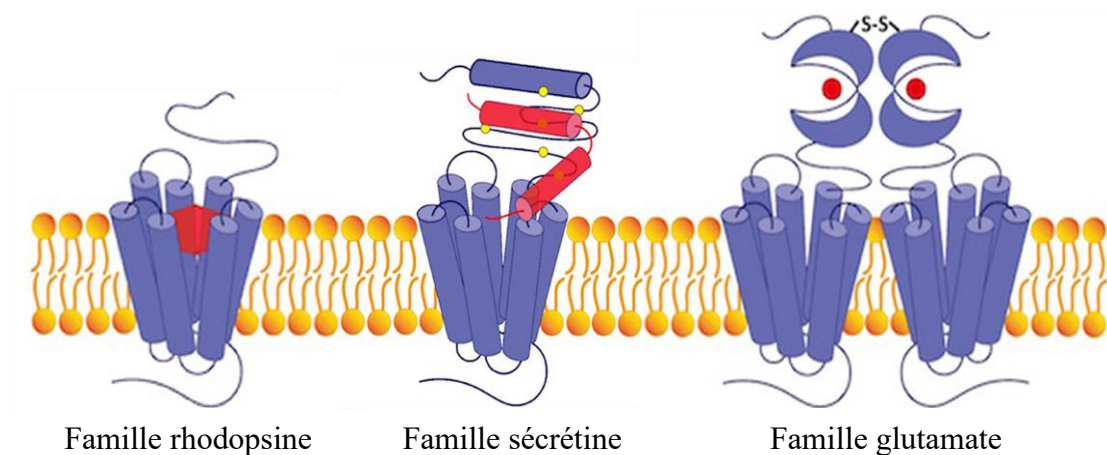


Figure 1.3. Comparaison des trois familles majeures de RCPG. Les RCPG de la famille rhodopsine lient une large diversité de ligands au niveau du domaine transmembranaire et présentent un court domaine extracellulaire. Les RCPG de la famille sécrétine lient des hormones peptidiques et présentent un large domaine N-terminal, d'environ 120 acides aminés, avec une structure conservée et stabilisée par des ponts disulfures. Les RCPG de la famille glutamate lient des ions et des petites molécules et présentent un large domaine extracellulaire avec un pont disulfure conservé pour la dimérisation. En rouge sont indiqués les ligands. Adapté de (Culhane *et al.*, 2015).

1.1.3 Fonctions biologiques des RCPG de la classe B

Bien que la diversité des ligands des RCPG de la classe B soit limitée en comparaison aux autres familles de RCPG, l'expression de ces récepteurs au sein de nombreux organes permet de réguler un grand nombre de processus physiologiques. Par exemple,

les hormones peptidiques issues de la famille sécrétine/glucagon/GHRH peuvent réguler l'homéostasie de l'énergie via un contrôle hypothalamique (Sekar et Chow, 2013) et sont impliqués dans le contrôle du comportement alimentaire (Sekar *et al.*, 2017). Au sein de la famille calcitonine, les hormones jouent un rôle sur la physiologie squelettique impliquant la résorption osseuse, l'augmentation de la masse osseuse ou encore l'accélération du taux de remodelage osseux (Naot *et al.*, 2018). Bien que certaines de ces hormones partagent des rôles physiologiques communs au sein de la physiologie squelettique, chaque hormone présente une activité biologique spécifique. Par exemple, la calcitonine et l'IAPP inhibent l'activité des ostéoclastes, soit une inhibition de la résorption osseuse (Cornish *et al.*, 2001). Ces deux peptides montrent des activités spécifiques, telle la régulation de l'homéostasie du calcium pour la calcitonine et la régulation de la satiété pour l'IAPP. Un court résumé des fonctions physiologiques impliquant les RCPG de la classe B est présenté dans le tableau 1.3 (Culhane *et al.*, 2015).

Tableau 1.3. Rôle(s) biologique(s) des RCPG de la classe B

Récepteurs	Ligands	Rôle(s) biologique(s)	Références
Récepteur CALC	CALC	Homéostasie Ca ²⁺	(McDermott et Kidd, 1987)
Récepteur IAPP (AMY1/AMY2/AMY3)	IAPP	Régulation satiété Homéostasie glucose post-prandiale	(Bower et Hay, 2016; Morfis <i>et al.</i> , 2003; Poyner <i>et al.</i> , 2002)
Récepteur CGRP	α -CGRP β -CGRP	Vasodilatation Nociception	(Morfis <i>et al.</i> , 2003; Poyner <i>et al.</i> , 2002)
Récepteur AM1/AM2	AM1 AM2	Vasodilatation	(Morfis <i>et al.</i> , 2003; Poyner <i>et al.</i> , 2002)

Récepteur GCG	GCG	Régulation glucose sanguin	(Mayo <i>et al.</i> , 2003; Sherwood <i>et al.</i> , 2000)
Récepteur GLP 1	GLP 1	Sécrétion insuline et glucagon	(Mayo <i>et al.</i> , 2003; Sherwood <i>et al.</i> , 2000)
Récepteur GLP 2	GLP 2	Croissance des muqueuses intestinales	(Mayo <i>et al.</i> , 2003; Sherwood <i>et al.</i> , 2000)
Récepteur GIP	GIP	Sécrétion insuline et métabolisme acide gras	(Mayo <i>et al.</i> , 2003; Sherwood <i>et al.</i> , 2000)
Récepteur VPAC 1	VIP PACAP	Vasodilatation, neurotransmission, fonctions neuroendocrines	(Harmar <i>et al.</i> , 1998; Sherwood <i>et al.</i> , 2000)
Récepteur VPAC 2	VIP PACAP	Vasodilatation, neurotransmission, fonctions neuroendocrines	(Harmar <i>et al.</i> , 1998; Sherwood <i>et al.</i> , 2000)
Récepteur PAC 1	PACAP	Neurotransmission, fonctions neuroendocrines	(Harmar <i>et al.</i> , 1998; Sherwood <i>et al.</i> , 2000)
Récepteur GHRH	GHRH	Libération de l'hormone de croissance	(Mayo <i>et al.</i> , 2003; Sherwood <i>et al.</i> , 2000)
Récepteur SCT	SCT	Sécrétion pancréatique	(Mayo <i>et al.</i> , 2003; Sherwood <i>et al.</i> , 2000)

Adapté de (Hoare, 2005) et (Culhane et al., 2015).

1.1.4 Structure secondaire des ligands peptidiques

Les ligands peptidiques des RCPG de la classe B affichent majoritairement une structure secondaire désordonnée en solution aqueuse, avec la formation locale et transitoire d'hélice(s)- α (Hoare, 2005; Watkins *et al.*, 2012). Ces conformations hélicoïdales sont stabilisées sous des conditions qui miment l'environnement de la membrane plasmique, telles que la présence de micelles de dodécylsulfate de sodium (SDS), de trifluoroéthanol (TFE), ou de lipides (Parthier *et al.*, 2009). Par exemple, l'adrénomédulline qui est sous forme aléatoire en solution, présente une formation hélicoïdale en présence de micelles de SDS (Perez-Castells *et al.*, 2012). Pour le PACAP, la présence de 50% TFE induit la formation d'une hélice- α de la position 9 à 20 (Wray *et al.*, 1998), tandis que la présence de micelles de dodécylphosphocholine (DPC) induit une hélice- α qui s'étend de la position 5 à l'extrémité C-terminale (Bourgault *et al.*, 2009b; Inooka *et al.*, 2001). De façon similaire pour le VIP, la présence de 30% TFE induit une hélice- α de la position 7 à 24 (Tan *et al.*, 2006), tandis que l'incorporation dans des micelles de DPC induit une transition hélicoïdale qui s'étend de la position 6 à 26 (Umetsu *et al.*, 2011). La liaison de ces hormones peptidiques au domaine N-terminal des récepteurs favorise également l'adoption d'une structure secondaire hélicoïdale, suggérant que cette structure serait la conformation bioactive (Hoare, 2005; Watkins *et al.*, 2012). Ainsi formée, cette conformation hélicoïdale est stabilisée par des résidus dans la région N-terminale à l'aide d'un motif N-cap (Neumann *et al.*, 2008). Dans ce motif, l'acide aminé côté N-terminal qui précède l'hélice- α voit son groupement carbonyle former un pont hydrogène avec le groupement NH du résidu $i+3$ ou $i+4$, permettant de stabiliser l'hélice- α . Ce motif est conservé au sein des ligands peptidiques des RCPG de la classe B, notamment avec les acides aminés conservés comme la phénylalanine en position 6 et la thréonine en position 7 (Neumann *et al.*, 2008). La sous-famille de la calcitonine fait figure d'exception avec la présence d'un pont disulfure au niveau du domaine N-terminal, induisant un réarrangement du squelette peptidique similaire à celui présentant un motif

N-cap (Poyner *et al.*, 2002). Ces réarrangements structuraux sont cruciaux pour l'activation des RCPG de la classe B. Dans un premier temps, les segments C-terminal et central hélicoïdal des hormones peptidiques lient le domaine N-terminal du récepteur. Dans un second temps, le domaine N-terminal des ligands peptidiques se lie aux domaines transmembranaires du RCPG et favorise des changements conformationnels au sein du récepteur qui conduisent à son activation. Ce mécanisme d'activation des RCPG de la classe B par les ligands peptidiques est connu sous le nom de *two-domain model* (Figure 1.4) (Hoare, 2005).

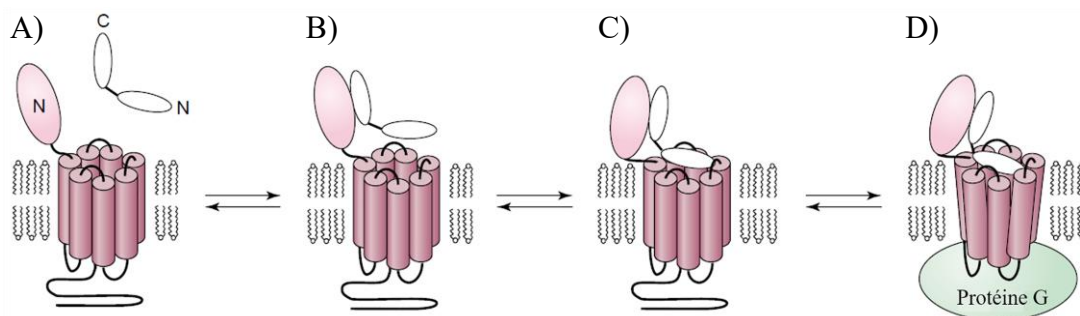


Figure 1.4. Modèle de liaison des ligands peptidiques avec les RCPG de la classe B. A) Proximité du ligand peptidique et du récepteur avant l'interaction entre les deux partenaires. B) La région C-terminale des ligands peptidiques lie le domaine N-terminal extracellulaire du récepteur. C) La région N-terminale du ligand peptidique se lie au domaine transmembranaire du récepteur. D) Cette interaction induit un changement conformationnel du récepteur. Adapté de (Hoare, 2005).

1.1.5 Auto-assemblage et structure quaternaire des ligands peptidiques

Les ligands peptidiques des RCPG de la classe B affichent une propension élevée à s'auto-assembler en diverses structures, ou assemblages, quaternaires et ce, en fonction du microenvironnement. L'une de ces structures quaternaires consiste en des assemblages amyloïdes, une suprastructure moléculaire hautement organisée et souvent associée à diverses fonctions physiologiques ou pathologiques (Chiti et Dobson, 2017; Otzen et Riek, 2019). En outre, une étude a montré que plusieurs ligands

des RCPG de la classe B, tels que le PACAP ou le VIP, sont entreposés sous forme d'assemblages quaternaires de type amyloïde dans les vésicules de sécrétion (Maji *et al.*, 2009). D'autre part, l'auto-assemblage de certaines de ces hormones peptidiques en dépôts amyloïdes extracellulaires insolubles peut conduire à des lésions tissulaires, en plus d'une perte de fonction du peptide. Par exemple, il est connu que, chez les personnes atteintes de diabète de type II (DTII), l'auto-assemblage de l'IAPP résulte en dépôts amyloïdes dans les îlots de Langerhans pancréatiques (Westermarck *et al.*, 2011). De plus, l'expression élevée de la calcitonine associée au carcinome médullaire de la thyroïde favorise l'auto-assemblage du polypeptide et la formation de fibres amyloïdes au niveau de cette glande endocrine (Arvinte *et al.*, 1993). Dans un contexte pharmaceutique, la forte propension à l'agrégation représente un défi majeur pour la formulation de médicaments à base de ces peptides (Frokjaer et Otzen, 2005). Particulièrement, le glucagon, qui est utilisé en tant que médicament pour traiter l'hypoglycémie sévère, forme très rapidement des fibres amyloïdes suite à sa mise en solution, induisant ainsi une perte d'activité de l'hormone et une injection d'assemblage amyloïde chez le patient (Beaven *et al.*, 1969; Gelenter *et al.*, 2019). Cet obstacle est également rencontré avec la calcitonine, utilisée dans le traitement de diverses formes d'hypercalcémie, qui est hautement prône à l'agrégation (Arvinte *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 2019). Ainsi, dans les cas de patients atteints d'ostéoporose et de la maladie osseuse de Paget, la calcitonine de saumon qui est moins prône à l'agrégation (Diociaiuti *et al.*, 2011) est utilisée lors de traitements thérapeutiques (Gennari et Agnusdei, 1994; Hay *et al.*, 2018).

1.2 Amyloïdes

Le terme amyloïde, qui signifie littéralement « comme de l'amidon » (amylon en grecque et *amylum* en latin), a initialement été utilisé par les pathologistes pour décrire des dépôts retrouvés dans des tissus et des organes *post mortem* marqués positivement à l'iode (Benson *et al.*, 2018). Avec l'avancée des techniques biochimiques et

biophysiques, il a été montré que ces dépôts amyloïdes étaient majoritairement constitués d'agrégats protéiques insolubles hautement structurés (Iadanza *et al.*, 2018). Bien que ces dépôts aient été historiquement associés à des pathologies, il a été démontré que la majorité des protéines globulaires solubles peuvent former des fibres amyloïdes et ce, sous des conditions environnementales spécifiques, telles une augmentation de la température ou un changement de pH (Chiti et Dobson, 2009; Sunde et Blake, 1998). Ces observations suggèrent que la formation de fibres amyloïdes est inhérente au squelette peptidique et que ces auto-assemblages sont susceptibles de se former en dehors d'un contexte pathologique. Il est maintenant également reconnu que les structures amyloïdes sont impliquées dans des processus physiologiques essentiels et vitaux chez de nombreux organismes vivants, allant des bactéries aux insectes et aux mammifères. Ces assemblages sont connus sous le nom d'amyloïde fonctionnel (Fowler *et al.*, 2007).

1.2.1 Amyloïdes fonctionnels

Les structures amyloïdes dites fonctionnelles présentent différentes fonctions physiologiques (Fowler *et al.*, 2007). Récemment, il a été proposé que ces amyloïdes fonctionnels peuvent être divisés en 5 groupes en lien avec leur activité biologique : (i) stockage, (ii) structure, (iii) information, (iv), perte de fonction et (v) signal/gain de fonction (Tableau 1.4) (Otzen et Riek, 2019). Le groupe 1 inclut par exemple les hormones peptidiques réarrangées sous forme d'amyloïdes dans les granules de sécrétion, permettant leur stockage à haute concentration dans un espace restreint (Maji *et al.*, 2009). Dans le groupe 2, on retrouve des amyloïdes fonctionnels dont les propriétés structurales remplissent des fonctions biologiques. Chez la bactérie *Escherichia coli*, la composante amyloïde CsgA de la protéine Curli est impliquée dans la formation de biofilms qui permettent l'adhésion et l'invasion de la bactérie (Blanco *et al.*, 2012). Chez l'humain, le réarrangement de la protéine Pmel17 en fibres amyloïdes accélère la polymérisation covalente de molécules hautement réactives en

mélanine (Fowler *et al.*, 2006). Ce biopolymère est crucial pour la protection contre les rayonnements ultra-violets et les dommages oxydatifs. Au sein du groupe 3, information, les amyloïdes sont impliqués dans l'héritage épigénétique. Ainsi, le réarrangement en assemblages amyloïdes de la protéine Sup35 chez *Saccharomyces cerevisiae* induit de nouveaux phénotypes qui peuvent être transmis de génération en génération. Par conséquent, l'information transmise est contenue dans la structure protéique et non dans les acides nucléiques, ce qui constitue ainsi l'héritage épigénétique (Shorter et Lindquist, 2005). Les groupes 4 et 5 comprennent des protéines dont la régulation de leur(s) fonction(s) biologique(s) est modulée par l'auto-assemblage amyloïde. Par exemple, la protéine basique majeure cytotoxique (groupe 4) contenue dans les éosinophiles exerce sa toxicité contre les agents pathogènes une fois libérée. Le stockage de cette protéine sous forme amyloïde permet donc d'inactiver son activité toxique (Soragni *et al.*, 2015). À l'opposé, dans le groupe 5, la formation en fibres amyloïdes induit un gain d'une fonction biologique. On peut citer le processus de formation hétéro-amyloïde des kinases RIP1 et RIP3 qui permet l'induction de la mort cellulaire programmée (Li *et al.*, 2012).

Tableau 1.4. Classification et exemples d'amyloïdes fonctionnels

Précurseur protéique	Organisme	Fonction protéine soluble	Fonction amyloïde	Références
Groupe 1 - Stockage				
Hormones peptidiques	Mammifères	Signalisation hormonale	Stockage et libération hormones	(Maji <i>et al.</i> , 2009)
Groupe 2 - Structure				
Curli (composant amyloïde: CsgA)	<i>Escherichia coli</i>	-	Composant de la matrice extracellulaire; formation biofilm, implication adhésion et invasion	(Blanco <i>et al.</i> , 2012)
Pmel17	Mammifères	-	Matrice pour la synthèse de mélanine dans les mélanosomes	(Fowler <i>et al.</i> , 2006)
Groupe 3 – Information				
Sup35	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Facteur d'arrêt de la traduction	Forme prion inactive	(Shorter et Lindquist, 2005)
Groupe 4 – Perte de fonction				
Major Basic Protein (MBP)	<i>Mammifères</i>	Déstabilisation de membrane, toxique à l'état oligomérique contre intrus et hôte	Stockage inerte	(Soragni <i>et al.</i> , 2015)
Groupe 5 – Gain de fonction				
RIP1/RIP3	Mammifères	Kinases	Signalisation et mort cellulaire par nécrose	(Li <i>et al.</i> , 2012)

Adapté de (Otzen et Riek, 2019).

1.2.2 Amyloïdes pathologiques

Actuellement, on dénombre plus de 30 précurseurs protéiques ayant la capacité de former des dépôts amyloïdes et dont l'accumulation tissulaire est associée à des pathologies, telles que la maladie d'Alzheimer avec le peptide amyloïde- β et l'amyloïdose à chaînes légères avec les chaînes légères des immunoglobulines (Tableau 1.5) (Benson et al., 2018). Parmi ces pathologies, on distingue deux formes : (i) les formes systémiques, dans lesquelles les dépôts amyloïdes se retrouvent dans plusieurs organes et (ii) les formes locales où les dépôts amyloïdes se situent au niveau de l'organe qui exprime majoritairement le précurseur protéique (Chiti et Dobson, 2017). Notamment, on retrouve dans la première catégorie l'amyloïdose à chaîne légère qui implique la formation de fibres amyloïdes à partir des chaînes légères d'immunoglobulines, lors d'une sécrétion anormalement élevée de ces dernières, pouvant affecter de nombreux organes (Martin et Ramirez-Alvarado, 2010). En outre, la transthyrétine est une protéine plasmatique homotétramérique dont la déstabilisation peut entraîner la formation de fibres amyloïdes à partir d'une unité monomérique pouvant mener à diverses polyneuropathies et amyloïdoses systémiques (Johnson *et al.*, 2012). Ainsi, les dépôts amyloïdes peuvent être localisés au niveau du système nerveux périphérique, du cœur, des reins, de la thyroïde et/ou des intestins. Parmi les formes locales, on retrouve la formation de fibres amyloïdes par le peptide amyloïde- β ($A\beta$) au niveau du système nerveux central qui est associé à une dégénérescence neuronale (Chiti et Dobson, 2017). Chez les personnes atteintes de DTII, l'hormone peptidique IAPP forme des fibres amyloïdes au niveau du pancréas, induisant une perte de masse des cellules- β pancréatiques (Westermarck *et al.*, 2011). De plus, l'insuline qui est utilisée comme traitement thérapeutique chez les personnes atteintes de DTII peut former des dépôts amyloïdes au niveau du site d'injection (Nilsson, 2016).

Tableau 1.5. Exemples de précurseurs protéiques impliqués dans la formation de dépôts amyloïdes associés à des pathologies.

Précurseurs protéiques	Systémique ou local	Organes ciblés	Maladies associées	Références
Transthyrétine	Systémique	Système nerveux périphérique, cœur, reins, thyroïde et intestin	Polyneuropathie familiale, amyloïdose systémique sénile	(Johnson <i>et al.</i> , 2012)
Chaînes légères d'immunoglobulines	Systémique et local	Tous les organes, excepté le système nerveux central	Amyloïdose à chaîne légère	(Martin et Ramirez-Alvarado, 2010)
Amyloïde- β	Local	Système nerveux central	Maladie d'Alzheimer	(Chiti et Dobson, 2017)
<i>Islet amyloid polypeptide</i>	Local	Pancréas	Diabète de type II	(Westermarck <i>et al.</i> , 2011)
Insuline	Local	Site d'injection	Diabète de type II	(Nilsson, 2016)
Calcitonine	Local	Thyroïde	Carcinome médullaire de la thyroïde	(Thomas <i>et al.</i> , 2019)
Médine	Local	Aorte thoracique	Anévrisme aorte thoracique	(Westermarck et Westermarck, 2011)

Adapté de (Benson *et al.*, 2018).

1.2.3 Organisation supramoléculaire des assemblages amyloïdes

Les fibres amyloïdes, qu'elles soient formées *in vivo* (pathologiques ou fonctionnelles) ou *in vitro*, partagent des caractéristiques structurales communes, indépendamment de la structure primaire des précurseurs protéiques. D'un point de vue morphologique, il est possible d'observer par microscopie électronique à transmission (TEM) ou microscopie à force atomique (AFM), que les fibres amyloïdes forment de longs filaments non ramifiés linéaires ou torsadés de 0,5 à 10 μm de longueur avec un diamètre de 7 à 13 nm (Figure 1.5A) (Makin et Serpell, 2005; Paravastu *et al.*, 2008; Wasmer *et al.*, 2008). Les fibres amyloïdes sont constituées de 2 à 8 sous-unités, appelées protofilaments, dont le diamètre varie entre 2 et 7 nm et qui s'associent de façon torsadée ou latéralement. Au niveau moléculaire, les brins- β sont orientés perpendiculairement à l'axe de la fibre. Ainsi l'empilement des unités monomériques résulte en la formation de feuillets- β parallèles à l'axe de la fibre. Par diffraction aux rayons X, ces feuillets- β -croisés présentent un patron de diffraction caractéristique avec des distances de 4,7 Å et 10 Å (Figure 1.5B) (Eisenberg et Sawaya, 2017; Sunde *et al.*, 1997). Le signal méridional à 4,7 Å, dans le même sens que la fibre et provenant de l'empilement des brins- β , correspond à l'espace occupé par les ponts hydrogènes des groupements N-H et C=O du squelette peptidique. Le signal équatorial à 10 Å, perpendiculaire à l'axe de la fibre, correspond à l'espacement entre les feuillets beta adjacents. Ces derniers sont stabilisés par diverses interactions entre les chaînes latérales des acides aminés, telles que des interactions hydrophobes ou électrostatiques, des liaisons hydrogène, des forces de van der Waals et/ou des empilements π - π .

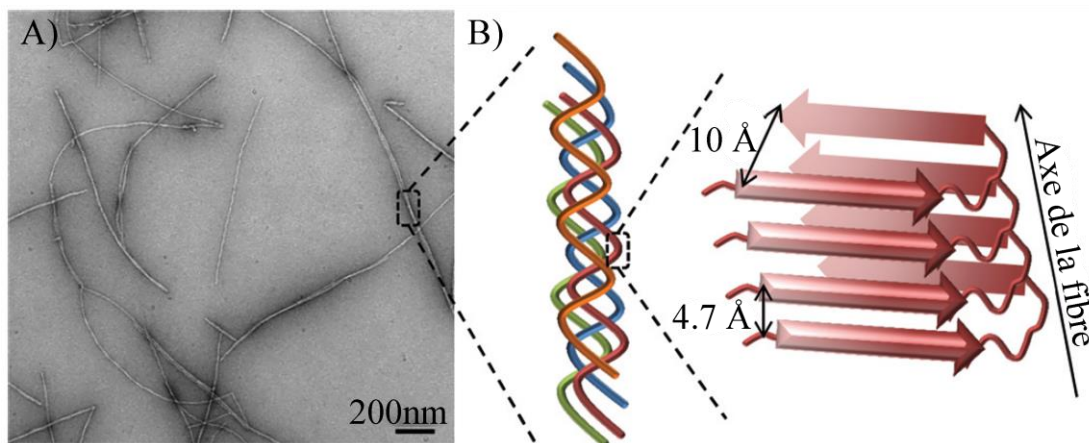


Figure 1.5. Organisation des fibres amyloïdes. A) Image représentative par microscopie électronique de la morphologie des fibres amyloïdes obtenue par l'auto-assemblage de l'IAPP. B) Représentation schématisée de l'organisation hiérarchique des fibres amyloïdes et de la structure quaternaire en feuillets- β -croisés. Adapté de (Quittot et al., 2017).

Les fibres amyloïdes peuvent lier certains colorants, tels que le rouge de Congo (Puchtler et Sweat, 1965) ou la thioflavine T (ThT) (LeVine, 1993). Dans le premier cas, la liaison du rouge de Congo aux fibres amyloïdes déplace le maximum d'absorption de la sonde et induit une biréfringence verte au microscope polarisé. Dans le deuxième cas, la ThT est une molécule peu fluorescente lorsqu'elle est libre en solution, tandis que sa fluorescence augmente drastiquement suite à sa liaison aux structures quaternaires en feuillets- β -croisés, caractéristiques des fibres amyloïdes.

Bien que les fibres amyloïdes affichent des caractéristiques structurales communes, elles présentent une grande variété d'arrangement (supra)moléculaire, traduisant un polymorphisme morphologique (Nelson *et al.*, 2005). En effet, il a été montré par diffraction aux rayons X sur des microcristaux formés par l'auto-assemblage de courts peptides amyloïdogéniques que les brins- β formant les feuillets peuvent être parallèles ou antiparallèles (Sawaya *et al.*, 2007). De plus, un polypeptide peut présenter plusieurs brins- β pouvant participer à plusieurs feuillets- β (Tycko, 2015). Ainsi, selon les conditions d'assemblage, trois modèles de fibres ont été proposés pour l' $A\beta_{(1-40)}$

(Figure 1.6) (Tycko, 2015). Dans deux de ces modèles, le monomère présente un domaine N-terminal désordonné et deux segments en brin- β reliés par une boucle. Les monomères sont empilés le long de l'axe des fibres menant à la formation de deux feuillets- β orientés parallèlement (Paravastu *et al.*, 2008; Petkova *et al.*, 2006). Le troisième modèle a été proposé à partir de fibres formées en présence de fibres amyloïdes extraites du cerveau d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Ce modèle est composé d'une symétrie de rotation triple (Lu *et al.*, 2013). De plus, deux modèles ont été proposés pour les fibres amyloïdes $A\beta_{(1-42)}$ dans lesquelles les monomères adoptent une forme en S et sont composés de 4 brins- β courts (Colvin *et al.*, 2016; Wälti *et al.*, 2016). Ainsi, ces études soulignent que l'addition de deux acides aminés supplémentaires à l'extrémité C-terminale peut entraîner des modifications drastiques de la structure amyloïde, indiquant que la morphologie des fibres est très sensible aux modifications de la structure primaire. Récemment, la structure de fibres amyloïdes extraites de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a été résolue par cryo-microscopie électronique (Kollmer *et al.*, 2019). Ces fibres sont polymorphiques et présentent une structure différente de celles formées *in vitro*, soulignant l'importance de l'environnement sur la morphologie finale des assemblages amyloïdes.

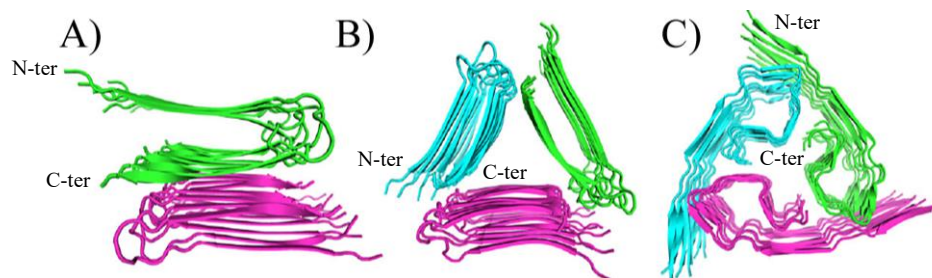


Figure 1.6. Modèles structuraux pour trois fibres amyloïdes de l' $A\beta_{(1-40)}$. Dans chacune de ces représentations, la structure des fibres est vue en coupe transversale, avec l'axe de la fibre perpendiculaire à la page. Les couleurs indiquent les différentes sous-unités en feuillets- β -croisés comprises dans une symétrie double (A) ou triple (B-C). A) Fibres formées *in vitro* et représentées en morphologie ruban strié, (PDB : 2LMN). B) Fibres formées *in vitro* et représentées en morphologie torsadée (PDB : 2LMP). C) Fibres dérivées du tissu cérébral d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (PDB :2M4J).

1.2.4 Mécanisme d'auto-assemblage des polypeptides amyloïdogéniques

Les précurseurs protéiques menant à la formation de fibres amyloïdes peuvent être divisés en deux catégories avec d'une part, les protéines ayant une structure native ordonnée/globulaire et d'autre part, des précurseurs protéiques nativement ou partiellement désordonnés. Dans la première catégorie, les précurseurs protéiques doivent se dénaturer, du moins partiellement, pour déclencher le processus d'amyloïdogénèse. On peut citer par exemple la transthyrétine (Bourgault *et al.*, 2011b), la β 2-microglobuline (Stoppini et Bellotti, 2015) ou encore les chaînes légères d'immunoglobulines (Wolwertz *et al.*, 2016). D'autre part, on retrouve des précurseurs protéiques nativement ou partiellement désordonnés comme l'IAPP, l'A β ou l' α -synucléine dont les réarrangements conformationnels en une structure ordonnée précise, généralement oligomérique, permettent de déclencher la formation de fibres amyloïdes (Abedini et Raleigh, 2009; Chiti et Dobson, 2017). La formation de fibres amyloïdes est un processus généralement décrit comme un mécanisme de polymérisation nucléée (Bemporad et Chiti, 2012; Gillam et MacPhee, 2013). Ce mécanisme peut être divisée en trois étapes : (i) phase de latence, (ii) phase d'élongation et (iii) phase d'équilibre, régies par différentes cinétiques (Figure 1.7) (Karamanos *et al.*, 2015). Lors de la phase de latence, les précurseurs protéiques monomériques s'assemblent jusqu'à la formation d'un noyau oligomérique à haute énergie ayant la bonne conformation pour mener à la formation de protofilaments. La phase de latence est thermodynamiquement défavorable dû aux interactions non efficaces, *off-pathway*, pour la formation de ce noyau et constitue donc l'étape limitante (Arosio *et al.*, 2015). Une fois le noyau oligomérique formé, qui est l'espèce à plus haute énergie, les étapes qui suivent lors de la phase d'élongation sont thermodynamiquement favorables (Johnson *et al.*, 2012; Knowles *et al.*, 2009). Lors de la phase d'élongation, l'ajout de monomères, ou d'oligomères compétents, aux extrémités libres des protofilaments permet l'élongation rapide de ces derniers (Knowles *et al.*, 2009). Au cours de cette phase, la fragmentation des protofilaments

forme de nouveaux noyaux induisant des nucléations secondaires et accélérant le processus de formation des fibres (Grigolato *et al.*, 2017). La troisième phase est atteinte lorsque la vaste majorité des précurseurs monomériques sont intégrés aux fibres amyloïdes et que l'équilibre est atteint. De façon intéressante, ce mécanisme peut être suivi via la sonde fluorogénique ThT dont le signal de fluorescence au cours du temps décrit une courbe sigmoïdale (Figure 1.7) (Biancalana et Koide, 2010). En effet, lors de la phase de latence, la fluorescence de la ThT est minimale en raison de l'absence de fibres amyloïdes. Lors de la phase d'élongation, le réarrangement moléculaire en feuillets- β -croisés induit la formation de sites liaisons pour la ThT, entraînant une amplification de la fluorescence. Une fois en état d'équilibre, le signal de fluorescence atteint un plateau.

Il existe d'autres mécanismes qui ont été proposés, comme le mécanisme de conversion conformationnelle nucléée (Johnson *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011; Serio *et al.*, 2000). Ce mécanisme décrit une oligomérisation spontanée des monomères, suivi d'une lente conversion conformationnelle des oligomères en noyau(x) compétent(s) par un processus qui nécessite de passer une barrière énergétique élevée. Finalement, le mécanisme de polymérisation *down-hill*, est un mécanisme où toutes les étapes menant à la formation des fibres amyloïdes sont thermodynamiquement favorables (Hurshman *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2012). Par exemple, la protéine tétramérique transthyréine peut subir une dissociation, pouvant mener à une dénaturation partielle d'une unité monomérique. Par la suite, le monomère mal replié s'agrège efficacement étant donné que le dimère néoformé est plus stable que le monomère, puis le trimère est plus stable que le dimère et ainsi de suite jusqu'à la formation de fibres amyloïdes.

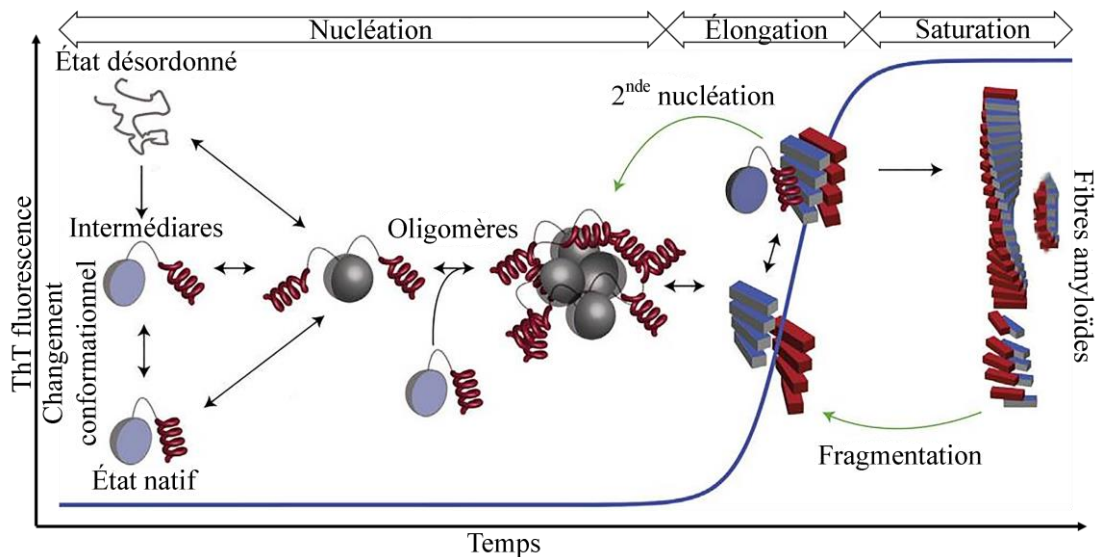


Figure 1.7. Formation de fibres amyloïdes via le mécanisme de polymérisation nucléée. Représentation schématisée des voies de formation de fibres amyloïdes via la nucléation primaire (flèches noires) et/ou la nucléation secondaire (flèche verte). Adapté de (Karamanos et al., 2015).

1.3 Diabète de type II et dépôts amyloïdes

1.3.1 Caractéristiques du diabète de type II

Le DTII est une maladie métabolique caractérisée par une dérégulation de l'homéostasie du glucose menant à une hyperglycémie chronique (DeFronzo, 2004). Sous conditions physiologiques normales, l'augmentation de la glycémie entraîne la sécrétion d'insuline qui stimule la consommation du glucose sanguin par les cellules musculaires et hépatiques et qui inhibe également la production de glucose endogène. Chez les personnes atteintes du DTII, deux principaux facteurs induisent le dérèglement de l'homéostasie du glucose, soit la résistance à l'insuline et la perturbation de la sécrétion d'insuline (DeFronzo, 2004; Westermark *et al.*, 2011). Si l'augmentation de la glycémie est prolongée, l'insuline sera sécrétée en grande quantité pouvant mener à une diminution de l'efficacité de l'insuline sur ses récepteurs (résistance à l'insuline) (Kahn, 2003). Afin de palier à cette diminution d'activité, les

cellules β -pancréatiques augmentent le niveau de sécrétion d'insuline (Hebda et Miranker, 2009). Cette surproductivité induit un stress métabolique local, altérant le fonctionnement des cellules- β sécrétrices d'insuline et diminuant la sécrétion de cette hormone peptidique (Roden et Shulman, 2019). Il en résulte donc une hyperglycémie chronique, c'est-à-dire un taux de glucose sanguin élevé qui persiste au cours du temps. Les complications dû à l'hyperglycémie sont nombreuses, telles que des problèmes cardiovasculaires, des rétinopathies, une insuffisance rénale et une circulation sanguine altérée (Roden et Shulman, 2019). Notamment, chez les personnes atteintes du DTII, des dépôts amyloïdes sont retrouvés au niveau du pancréas et la présence de ces agrégats protéiques insolubles corrèle avec la sévérité et la durée de la maladie (Westermarck *et al.*, 2011). Ces dépôts amyloïdes peuvent également être observés chez des individus non diabétiques, cependant ceux-ci affectent moins d'îlots et avec un degré de sévérité inférieur (Westermarck *et al.*, 2011). Ainsi, la composante amyloïdogénique constitue un facteur important de la pathogénicité du DTII et dont la caractérisation revêt un intérêt crucial pour la compréhension de la maladie.

1.3.2 Dépôts amyloïdes pancréatiques

En 1901, des coupes histologiques du pancréas provenant de patients atteints du DTII révèlent la présence de lésions et de tissus fibreux (Opie, 1901). Cependant, l'absence de réponse au marquage à l'iode sème le doute sur la nature de ces lésions qui seront nommées hyalinisation des îlots (Westermarck, 2011). Ces dépôts ont pu être histologiquement identifiés comme des dépôts amyloïdes par différents marquages, tels que le cristal violet et le rouge de Congo (Ahronheim, 1943; Ehrlich et Ratner, 1961). En raison de l'insolubilité du matériel amyloïdogénique, la caractérisation des dépôts a été complexe et il a d'abord été suggéré que le constituant majoritaire était de l'insuline ou des fragments d'insuline (Young, 2005). En 1986, Westermarck *et al.* ont identifié à partir de fibres amyloïdes provenant d'insulinome du pancréas, la séquence partielle d'un polypeptide, qu'ils ont nommé *insulinoma amyloid peptide* (IAP)

(Westermarck *et al.*, 1986). En 1987, deux équipes de recherche déterminent la séquence complète de ce peptide de 37 acides aminés qui sera identifié comme le constituant majoritaire des dépôts amyloïdes pancréatiques (Cooper *et al.*, 1987; Westermarck *et al.*, 1987). À la suite de leurs travaux, l'équipe de Westermarck *et al.* nomme le peptide *islet amyloid polypeptide* (IAPP), remplaçant la précédente dénomination IAP (Westermarck *et al.*, 1987). D'autre part, l'équipe de Cooper *et al.* nomme dans un premier temps le peptide *diabetes-associated peptide* (DAP) (Cooper *et al.*, 1987), qui sera remplacé par amylin (Cooper *et al.*, 1988). Actuellement, les deux dénominations IAPP et amylin sont toujours utilisées.

1.4 Islet amyloid polypeptide

1.4.1 Expression, maturation et entreposage de l'IAPP

L'IAPP est exprimé par un gène situé sur le bras court du chromosome 12 (Mosselman *et al.*, 1989; Mosselman *et al.*, 1988). Ce gène est composé de trois exons et deux introns, précédés par un promoteur de type boîte TATA (TATAA). La transcription du premier exon mène à un ARN non codant qui sert de coiffe, tandis que les deux derniers exons contiennent la prépromolécule complète. L'IAPP est une hormone peptidique de 37 acides aminés, bien qu'initialement traduite sous la forme d'un précurseur proIAPP de 89 acides aminés (Cao *et al.*, 2013b). Une séquence peptide signal de 22 résidus est clivée suite à l'entrée de la protéine dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) par la peptidase *signal*, résultant en la formation d'un proIAPP de 67 résidus (Figure 1.7) (Mosselman *et al.*, 1989). Dans la lumière du RE, la formation du pont disulfure entre les résidus Cys2 et Cys7 est catalysée par une disulfure isomérase (Asthana *et al.*, 2018). Le proIAPP de 67 acides aminés est par la suite transporté dans l'appareil de Golgi puis entreposé dans les vésicules de sécrétion. Dans les vésicules de sécrétion, le proIAPP est clivé par deux endoprotéases, la prohormone convertase 2 (PC 2) et la prohormone convertase 1/3 (PC 1/3) (Cao *et al.*, 2013b). Au

niveau de la région N-terminale du proIAPP, la PC 2 clive la séquence peptidique au côté C-terminale du motif dibasique Lys-Arg en positions 10 et 11, libérant ainsi le résidu N-terminal de l'IAPP mature. Dans la région C-terminale de proIAPP, la PC 1/3 clive du côté C-terminal du motif dibasique Lys-Arg aux positions 50 et 51, libérant ainsi une séquence de 16 résidus. Le motif dibasique Lys-Arg est par la suite clivé par la carboxypeptidase E. Le résidu glycine restant à l'extrémité C-terminale est utilisé comme donneur d'azote pour l'amidation de la tyrosine grâce au complexe *peptidyl amidating mono oxygenase* (PAM), résultant en une hormone peptidique mature de 37 acides aminés (Cao *et al.*, 2013b).

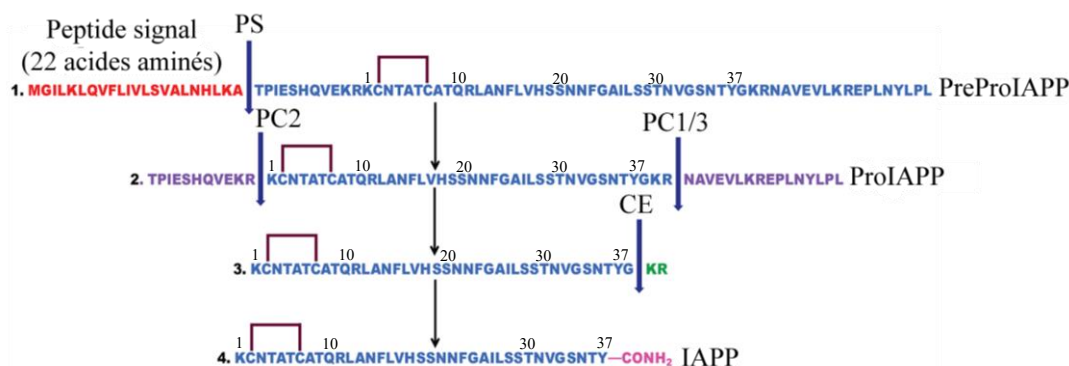


Figure 1.8. Processus de maturation de l'IAPP. 1. Clivage du peptide signal par la peptidase signal (PS) et formation du pont disulfure. 2. Clivage des régions N-terminale (11 résidus) et C-terminale (16 résidus) par les prohormones convertases PC2 et PC1/3 respectivement. 3. Clivage Lys-Arg par la carboxypeptidase CE. 4. Amidation de la tyrosine par le complexe peptidyl amidating mono oxygenase (PAM). Les numéros de 1 à 37 indiquent les résidus de l'IAPP mature. Adapté de (Asthana *et al.*, 2018).

Bien que la concentration de l'IAPP dans les vésicules de sécrétion soit suffisamment élevée pour induire son auto-assemblage *in vitro*, les conditions présentes dans les vésicules inhibent l'agrégation du peptide. Notamment, l'environnement acide des vésicules (pH 5.5) ralentit l'agrégation du peptide (Khemtmourian *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). En effet, à pH acide le groupe imidazole de l'histidine en position 18 est protoné, induisant localement une répulsion électrostatique entre les monomères. De

plus, dans les vésicules de sécrétion, l'IAPP est co-entreposé et co-sécrété avec l'insuline à un ratio de 1:100. L'insuline est située au cœur des vésicules de sécrétion sous une forme hexamérique microcristalline, tandis que l'IAPP est entreposé dans la région halo (Akter *et al.*, 2016; Westermark *et al.*, 2011). De façon intéressante, il a été montré *in vitro* que les formes solubles et cristallines de l'insuline inhibent l'agrégation de l'IAPP (Brender *et al.*, 2010; Knight *et al.*, 2008; Larson et Miranker, 2004), suggérant que l'insuline joue un rôle dans la prévention de l'agrégation *in vivo*. Suite à leur libération dans le milieu extracellulaire, l'insuline soluble permettrait de réduire l'agrégation de l'IAPP au niveau local. De plus, lorsque les granules de sécrétion fusionnent avec la membrane plasmique pour larguer leur contenu, le pH se neutralise rapidement tandis que le temps de relargage des hormones peut varier entre quelques secondes à une minute. Sous ces conditions favorables à l'agrégation (pH neutre, haute concentration d'IAPP, environnement membranaire), la présence de Zinc à haute concentration, de l'ordre du mM, permettrait d'inhiber la formation de fibres en se liant à l'histidine en position 18 (Brender *et al.*, 2010). De façon intéressante, une mutation délétère du gène SLC30A8 codant pour le transporteur de zinc ZnT8, qui permet l'entrée de cet ion dans les granules de sécrétion (Chimienti *et al.*, 2004), augmente les risques de développer le DTII (Nicolson *et al.*, 2009).

1.4.2 Phylogénie de l'IAPP

L'IAPP est retrouvé chez de nombreux organismes supérieurs, mammifères et poissons, tel qu'indiqué au tableau 1.6 (Wong *et al.*, 2016). Les régions N-terminale et C-terminale sont hautement conservées, suggérant que ces régions soient importantes pour l'activité biologique de cette hormone, et que l'activité de celle-ci soit importante pour les organismes vivants. En revanche, la région 20-29 varie beaucoup d'une espèce à l'autre. Notamment, on peut remarquer chez l'humain que ce segment est hautement hydrophobe, rendant l'IAPP hautement prône à l'agrégation. De plus, un court peptide dérivé de la séquence 20-29 peut former des fibres amyloïdes en absence des autres

domaines du peptide (Madine *et al.*, 2008). La région 20-29 des isoformes de primates, de chats et de chiens présentent 1 à 2 substitutions par rapport à celle de l'humain, dont un remplacement d'une phénylalanine pour une leucine, conservant ainsi l'hydrophobicité élevée de ce segment et la capacité de former des amyloïdes (O'Brien *et al.*, 1990; Wong *et al.*, 2016). En revanche, l'IAPP de rat diffère de 6 acides aminés par rapport à la séquence retrouvée chez l'humain, dont 5 dans la région 20-29, comprenant trois prolines aux positions 25, 28 et 29. Bien qu'il ait été montré que l'IAPP de rat puisse s'agréger et former des oligomères (Abedini *et al.*, 2016), cet isoforme est faiblement amyloïdogénique et non cytotoxique (Westermarck *et al.*, 2011). En effet, la présence de prolines implique la perte d'un donneur potentiel de pont H et présente un angle ϕ fixe à -65° , incompatible avec celui des feuillets- β à environ -135° (Li *et al.*, 1996). Ainsi, la présence de trois prolines diminue la stabilité des feuillets- β , qui est la structure secondaire majeure des fibres amyloïdes, soulignant l'importance de la structure primaire dans la capacité à former des fibres amyloïdes.

Tableau 1.6. Phylogénie de l'IAPP, adapté de (Wong *et al.*, 2016).

Espèce	Structure primaire				
	1	10	20	30	37
Humain	KCNTATCAT	QLANFLVHS	SNNFGAILSS	TNVGSNTY	
Rat	KCNTATCAT	QLANFLVRS	SNNLGPVLPP	TNVGSNTY	
Macaque	KCNTATCAT	QLANFLVRS	SNNFGTILSS	TNVGSDTY	
Porc	KCNMATCAT	QHLANFLDRS	RNNLGTIFSP	TKVGSNTY	
Chat	KCNTATCAT	QLANFLIRS	SNNLGAILSP	TNVGSNTY	
Chien	KCNTATCAT	QLANFLVRT	SNNLGAILSP	TNVGSNTY	
Poisson globe	KCNTATCVT	QLADFLVRS	SNTIGTVYAP	TNVGSTTY	

Les résidus indiqués en rouge diffèrent de ceux retrouvés chez l'humain.

1.4.3 Structure(s) secondaire(s) de l'IAPP

Sous sa forme monomérique et soluble, l'IAPP présente un ensemble conformationnel majoritairement désordonné, bien que des segments puissent adopter des structures ordonnées de façon transitoire (Brender *et al.*, 2012; Williamson et Miranker, 2007; Yonemoto *et al.*, 2008). Par résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution, à 4°C et à pH acide (5.3), conditions employées pour ralentir l'agrégation, et sous condition oxydante pour favoriser la formation du pont disulfure, il a été montré que l'IAPP forme une hélice alpha de la position Ala-8 à Val-17 (Figure 1.9A) (Rodriguez Camargo *et al.*, 2017). En outre, la structure transitoire hélicoïdale de l'IAPP est stabilisée en présence de solvants connus pour induire la formation en hélice- α , tels le TFE ou l'hexafluoroisopropanol (HFIP), révélant la propension du peptide à former une structure en hélice (Hubbard *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2014).

Par RMN en solution, il a été montré que la présence de micelle de SDS en condition acide (pH 4.6) induit la formation d'une hélice alpha qui s'étend de la position 5 à 28 avec une discontinuité entre les segments 5-17 et 18-28 formant un angle de 30° (Figure 1.9B) (Patil *et al.*, 2009). Les 4 premiers acides aminés sont contraints par la formation d'une boucle induite par le pont disulfure impliquant les cystéines aux positions 2 et 7. Au-delà de la position 28, les 9 résidus de la région C-terminale présentent une conformation principalement désordonnée. Avec un modèle similaire, soit la présence de micelles SDS, mais à un pH physiologique, la formation d'une hélice- α s'étend de Cys-7 à Val-17, puis de Asn-21 à Ser-28 avec un angle de 80° entre les deux segments (Figure 1.9C) (Nanga *et al.*, 2011). Par résonance paramagnétique électronique (RPE), la présence de larges vésicules unilamélaires composées à 80% de 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycéro-3-phospho-L-sérine (POPS) et 20% de 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycéro-3-phosphocholine (POPC), mène à la formation d'une hélice- α qui s'étend de la position 9 à 22 (Apostolidou *et al.*, 2008). Dans cette étude, l'absence de formation hélicoïdale de la région N-terminale pourrait être la conséquence de la substitution des

cystéines 2 et 7 par des alanines. Ces substitutions impliquent la perte du pont disulfure et un réarrangement du squelette peptidique similaire à celui du motif N-cap déstabilisant ainsi l'hélice- α .

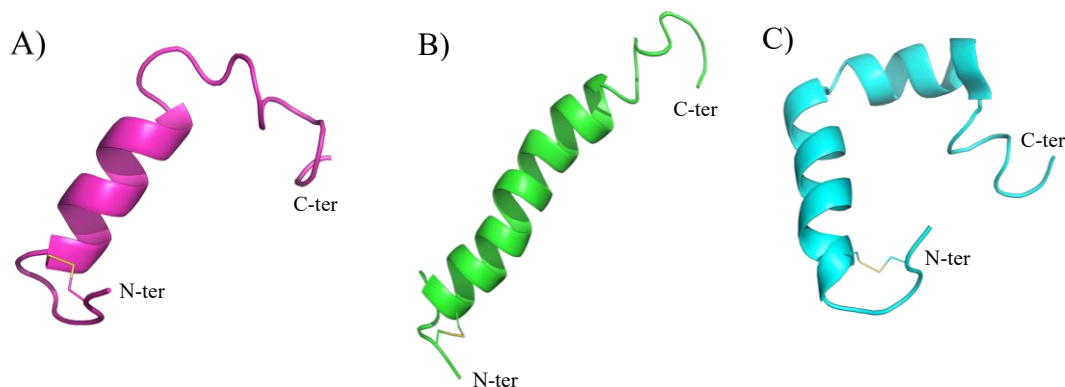


Figure 1.9. Structures secondaires de l'IAPP. A) En solution aqueuse à 4°C et pH 5.3 (PDB: 5MGQ). B) En présence de micelles SDS à 100 mM, pH 4.6 (PDB: 2KB8). C) En présence de micelles SDS à 200 mM, pH 7.3 (PDB: 2L86).

Tel que mentionné précédemment, la majorité des ligands peptidiques des RCPG de la classe B affichent un large ensemble conformationnel en solution aqueuse. Cependant, une structure secondaire hélicoïdale peut être induite en présence de solvant et de milieu mimant les membranes biologiques, et également en présence de leur récepteur (Watkins *et al.*, 2012). Les similarités structurales au sein de cette famille peptidique suggèrent fortement que la conformation hélicoïdale de l'IAPP serait essentielle pour son activité biologique (Watkins *et al.*, 2012). Toutefois, en absence de données structurales de l'IAPP lié à son récepteur, la structure bioactive de l'IAPP demeure hypothétique (Bower et Hay, 2016).

1.4.4 Activités biologiques et rôle pathologique de l'IAPP

Les rôles physiologiques de l'IAPP demeurent encore aujourd'hui le sujet d'un vif débat, bien que plusieurs activités biologiques aient été proposées. En réponse à une augmentation de la glycémie ou à la stimulation de sécrétagogues non glycosidiques après un repas, les cellules β -pancréatiques sécrètent l'IAPP, augmentant ainsi la concentration sanguine de 4 pM à 25 pM (Young, 1997). Premièrement, l'IAPP semble impliqué indirectement dans le métabolisme du glucose en diminuant la sécrétion d'insuline par un mécanisme de signalisation autocrine, bien qu'il n'y ait pas de consensus sur ce mécanisme. L'IAPP régule la satiété et la vidange gastrique post prandiale en agissant sur les neurones de l'*aera postrema* (Lutz *et al.*, 1995; Sexton *et al.*, 1994). Finalement, l'IAPP pourrait avoir un effet vasodilatateur et partagerait avec les autres membres de la famille calcitonine une activité sur la physiologie squelettique (Naot *et al.*, 2018).

L'IAPP exerce son activité biologique via l'interaction avec le RCPG de la calcitonine, CTR. Bien que l'IAPP ait une faible affinité pour ce récepteur, cette affinité est augmentée suite à l'interaction d'une protéine *receptor activity-modifying protein* (RAMP) avec le récepteur CTR (Figure 1.10) (Bower et Hay, 2016). Les protéines RAMP, constituées de 148 acides aminés, régulent le transport des CTR à la surface cellulaire et leur glycosylation, modulant ainsi leur sélectivité. Les trois protéines RAMP disposent d'une topologie similaire avec une région N-terminale extracellulaire, un domaine transmembranaire et une région C-terminale intracellulaire. Il y a trois gènes codants pour trois protéines RAMP et dont l'expression relative diffère selon les tissus. L'affinité de l'IAPP envers le récepteur CT varie en fonction de la protéine RAMP associée (Bower et Hay, 2016).

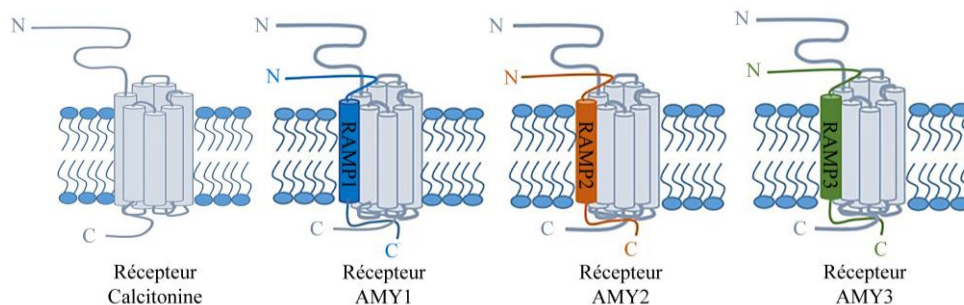


Figure 1.10. Composants du récepteur de l'IAPP. Le récepteur de l'IAPP comprend le RCPG de la classe B de la calcitonine (CT) qui interagit avec des protéines RAMP pour modifier l'affinité et la signalisation intracellulaire subséquente. Adapté de (Bower et Hay, 2016).

Outre ses activités biologiques, l'IAPP est principalement reconnu pour son implication dans le DTII. Tel que mentionné précédemment, les dépôts amyloïdes formés d'IAPP sont associés au DTII et participent à la dégénérescence des cellules β -pancréatiques (Westermarck *et al.*, 2011). La mutation S20G, retrouvée parmi les populations asiatiques, induit l'apparition précoce du DTII, impliquant donc un lien génétique entre l'IAPP et diabète (Cao *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2001). Cette mutation favorise la formation de fibres amyloïdes, pouvant aggraver la pathologie (Duan *et al.*, 2012). Finalement, une étude a révélé la possibilité que les dépôts amyloïdes et les anomalies associées au DTII résultent d'un mécanisme de propagation similaire au mécanisme de la protéine prion impliqué dans les encéphalopathies spongiformes (Mukherjee *et al.*, 2017).

1.4.5 Structure des fibres amyloïdes d'IAPP

En 2007, le modèle le plus détaillé de la structure des fibres amyloïdes de l'IAPP a été obtenu par RMN à l'état solide (Figure 1.11) (Luca *et al.*, 2007). Dans ce modèle, les monomères sont empilés les uns sur les autres en forme de U et sont composés de deux brins- β reliés par une boucle. Le premier brin- β s'étend du résidu 8 à 17, tandis que le

deuxième s'étend de la position 28 à 37. La boucle qui relie ces deux brins- β comprend les résidus 18 à 27. La région amyloïdogénique 20-29 chevauche la boucle et le début du second brin- β . La structure secondaire de la région 1 à 7, à l'intérieur des assemblages amyloïdes est désordonnée du fait de la restriction conformationnelle induite par le pont disulfure. Deux arrangements ont été proposés pour les différentes orientations des chaînes latérales, ce qui entraîne des interactions différentes entre les couches de feuillet- β . Dans le premier modèle, les chaînes latérales des résidus Gln-10, Leu-12, Asn-14 et Leu-16 sont en interaction avec le feuillet- β qui s'étend des positions 28 à 37 (Figure 1.11C). Les chaînes latérales des résidus Arg-11, Ala-13 et Phe-15 sont dirigées vers l'extérieur du protofilament. En raison de la structure du brin- β , les orientations latérales des résidus Leu-27, Ser-29 et Asn-31 alternent avec les chaînes latérales des résidus Leu-26, Ser-28, Thr-30 et Val-32. Alors que le premier ensemble de chaînes latérales est situé entre deux couches de monomères d'IAPP, le second ensemble de chaînes latérales est orienté vers l'intérieur de chaque couche. Dans le second modèle (Figure 1.11D), le feuillet- β formé par les résidus 28 à 37 interagit avec les chaînes latérales de Arg-11, Ala-13 et Phe-15, alors que les chaînes latérales de Gln-10, Leu-12, Asn-14 et Leu-16 sont dirigées vers l'extérieur du protofilament. De la même manière que le premier modèle, deux ensembles de chaînes latérales sont dirigés dans des directions opposées. Le premier ensemble composé de Leu-26, Ser-28, Thr-30 et Val-32 est situé entre deux couches de monomères d'IAPP. Le second ensemble de chaînes latérales composé de Leu-27, Ser-29 et Asn-31 est orienté vers l'intérieur de chaque couche. Ces deux modèles montrent que les fibres amyloïdes formées par l'IAPP sont stabilisées par un ensemble d'interactions hydrophobes, d'interactions électrostatiques et de liaisons hydrogènes.

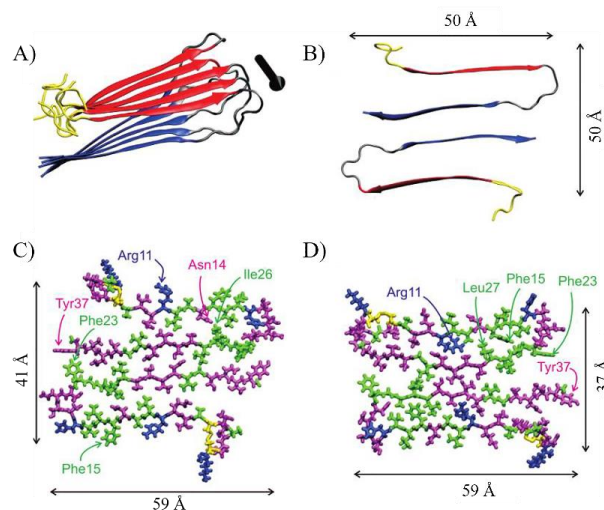


Figure 1.11. Modèles des fibres amyloïdes provenant de l'auto-assemblage de l'IAPP. A) Représentation en ruban d'un feuillet β -croisé. En rouge, le segment en brin- β côté N-terminal et en bleu, le segment en brin- β côté C-terminal. La flèche noire indique le sens de la fibre. B) Vue en coupe de deux molécules d'IAPP dans le protofilament. C-D) Représentation all-atoms pour les deux modèles possibles avec les résidus hydrophobes en vert, les résidus polaires en magenta, les résidus chargés positivement en bleu et les résidus cystéines liés par un pont disulfure en jaune. Adapté de (Luca et al., 2007).

D'autres modèles ont été proposés pour la structure des fibres amyloïdes de l'IAPP et ce, en employant différentes méthodes biophysiques. Étant donné l'incapacité de former des cristaux à partir de fibres amyloïdes hétérogènes, des chercheurs ont cristallisé des assemblages de courts segments de l'IAPP, *i.e.* NNFGAIL (21-27) et SSTNVG (28-33), et analysés ceux-ci par diffraction aux rayons X (Wiltzius *et al.*, 2008). Basé sur les structures obtenues par cristallographie, les auteurs ont modélisé une structure des fibres amyloïdes avec l'IAPP pleine longueur. Ce modèle révèle une structure supramoléculaire similaire à celle obtenue par RMN à l'état solide, composé 2 monomères espacés de 4.8 Å et également organisée en 4 feuillets. En revanche, la différence réside dans l'espacement des chaînes latérales. Par exemple, entre les résidus Asn-14 ou Tyr-15 et Ile-26 et Leu-27, il y a 6 Å d'espacement pour le modèle par RMN à l'état solide tandis qu'un espacement de 12 Å a été obtenu pour le modèle de Wiltzius

et al. Par conséquent, la cristallographie et la RMN à l'état solide décrivent une organisation similaire, mais des différences au niveau de l'emplacement des chaînes latérales sont observées. Un modèle en β -serpentine où le monomère d'IAPP est constitué de trois brins- β a été obtenu par modélisation *in silico* (Kajava *et al.*, 2005). Un autre modèle a été obtenu par RPE où les brins- β d'un même monomère sont espacés de trois positions le long de l'axe de la fibre (Bedrood *et al.*, 2012). Finalement, deux modèles ont récemment été obtenus par cryo-microscopie électronique. L'un de ces modèles suggère que les fibres sont constituées de protofilaments associés de façon symétrique et dont les résidus 14 à 37 forment le cœur amyloïde (Cao *et al.*, 2020). L'autre modèle suggère que les protofilaments décrivent une forme en S et s'entrelacent dans le sens de la fibre (Röder *et al.*, 2020).

1.4.6 Mécanismes d'auto-assemblage de l'IAPP

Le processus de formation de fibres amyloïdes par l'IAPP est généralement décrit comme un mécanisme de polymérisation nucléée (Arosio *et al.*, 2015). En présence de ThT, l'auto-assemblage de l'IAPP présente une courbe sigmoïdale typique en trois phases (Figure 1.6). Bien que le mécanisme ait souvent été étudié, il n'y a pas de consensus sur la nature des espèces intermédiaires menant à la formation des fibres amyloïdes de l'IAPP. Selon le mécanisme de polymérisation nucléée, seuls les monomères participent à la formation d'un noyau oligomérique compétent pour l'élongation en protofilament. Toutefois, plusieurs études ont montré la présence d'intermédiaires oligomériques en amont de la formation du noyau compétent menant à la phase d'élongation (Nagel-Steger *et al.*, 2016). Ainsi, de nombreuses espèces intermédiaires oligomériques pourraient participer à la nucléation primaire de l'auto-assemblage en fibres amyloïdes. Par exemple, la formation d'une structure hélicoïdale au niveau de la région N-terminale de l'IAPP, permettrait un rapprochement des unités monomériques via l'interaction des hélices- α et ce, de façon similaire au motif *coiled-coil* (Abedini et Raleigh, 2009). La formation de ce type d'assemblage permettrait une

augmentation de la concentration locale de la région C-terminale prône à la formation de brin- β , favorisant ainsi la formation de fibres amyloïdes. Contrairement à cette hypothèse, une étude de notre laboratoire suggère que la formation d'hélice- α serait en dehors de la voie de formation de fibres amyloïdes, *i.e. off-pathway* (De Carufel *et al.*, 2015). En effet, un dérivé conformationnellement contraint d'IAPP ne pouvant former d'hélice- α affiche une amyloïdogénèse accélérée. D'autres études suggèrent que les intermédiaires oligomériques précoces de l'IAPP forment des structures en épingle à cheveux (β -*hairpin*) (Buchanan *et al.*, 2013). Finalement, il a été montré que la nucléation secondaire était critique dans la formation de fibres d'IAPP (Padrick et Miranker, 2002; Patil *et al.*, 2011).

1.4.7 Cytotoxicité de l'IAPP

1.4.7.1 Espèces cytotoxiques de l'IAPP

Les dépôts amyloïdes pancréatiques sont retrouvés chez 95 % des personnes atteintes du DTII (Rocken *et al.*, 1992). La présence de ces dépôts corrèle avec une perte en masse des cellules β -pancréatiques, suggérant que les espèces fibrillaires sont impliquées dans la mort cellulaire (Jurgens *et al.*, 2011; Kahn *et al.*, 1999). Il a été montré que les assemblages fibrillaires ont la capacité d'induire un bourgeonnement de la membrane plasmique, une condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, indiquant des processus apoptotiques (Lorenzo *et al.*, 1994). De plus, il a été montré que les fibres amyloïdes induisent une perturbation des voies cellulaires en réponse au stress oxydatif et de l'homéostasie lipidique (Janciauskiene et Ahrén, 2000). Finalement, les dépôts amyloïdes situés entre les cellules β -pancréatiques et les cellules endothéliales capillaires pourraient perturber la circulation des nutriments, tel le glucose, menant à des interférences avec l'exocytose de l'insuline des vésicules de sécrétion (Clark et Nilsson, 2004). Cependant, la majorité des études récentes indiquent que les intermédiaires oligomériques seraient les espèces les plus cytotoxiques (Glabe,

2008; Haataja *et al.*, 2008; Kaye *et al.*, 2003; Kirkitadze *et al.*, 2002). En 1996, des souris transgéniques exprimant l'IAPP humain présentaient une perte rapide de masse cellulaire au niveau des îlots pancréatiques et ce, en absence de dépôts extracellulaires amyloïdes (Janson *et al.*, 1996). Sur des cellules isolées d'îlots pancréatiques en culture, il a été montré que les fibres amyloïdes n'induisaient pas l'apoptose, contrairement au traitement à l'IAPP fraîchement dilué (Janson *et al.*, 1999). Au cours de cette même étude, les auteurs ont montré par microscopie électronique des cellules viables décorées de fibres amyloïdes. En revanche, en présence de peptides fraîchement solubilisés et appliqués sur les cellules, il y avait présence d'agrégats amorphes de petite taille qui perturbent la membrane plasmique et pénètrent dans la cellule. Il a été identifié chez des personnes atteintes de diabète de type II, la présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre les espèces oligomériques de l'IAPP qui ont la capacité de neutraliser la cytotoxicité de ces espèces (Bram *et al.*, 2014). Une étude récente a montré que les espèces monomériques et fibrillaires exerçaient une faible cytotoxicité tandis que les espèces intermédiaires oligomériques induisaient une forte cytotoxicité sur des cellules β -pancréatiques en culture (Figure 1.12) (Abedini *et al.*, 2016). Finalement, et tel est le cas pour les protéines amyloïdogéniques associées à des pathologies, la question de savoir si la cytotoxicité est associée à une conformation oligomérique précise (Kayed *et al.*, 2003; Shankar *et al.*, 2008) et/ou au processus d'auto-assemblage reste à élucider (Jan *et al.*, 2011).

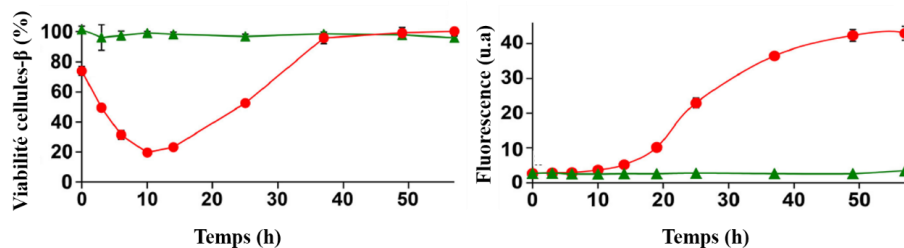


Figure 1.12. Espèces toxiques de l'IAPP. A) Viabilité cellulaire des cellules de rat β -pancréatiques après traitement avec l'IAPP humain (rouge) et de rat (vert) pré-incubé pour différentes périodes allant de 0 h (monomère) à 60 h (fibrillaire). B) Cinétique d'auto-assemblage de l'IAPP humain (rouge) ou de rat (vert) mesurée par la fluorescence de la ThT. Adapté de (Abedini *et al.*, 2016).

1.4.7.2 Mécanismes de cytotoxicité de l'IAPP

Parmi les mécanismes de cytotoxicité induits par les espèces pré-fibrillaires, la perturbation membranaire est le mécanisme le plus accepté par la communauté scientifique (Abedini et Schmidt, 2013; Caillon *et al.*, 2016; Engel, 2009). À ce jour, deux principales hypothèses permettent d'expliquer la perturbation membranaire induite par l'IAPP (Figure 1.13). La première hypothèse propose que l'IAPP sous sa forme monomérique, ou oligomérique, interagit avec la membrane plasmique et s'insère dans la bicouche lipidique. Dans cet environnement lipidique, la formation de fibres induit une perturbation membranaire en changeant la courbure de la membrane, ainsi qu'en recrutant des lipides. Ce mécanisme de perturbation est dit détergent étant donné que la formation de fibres amyloïdes induit la formation de « vésicules », comprenant des agrégats protéiques et des lipides (Domanov et Kinnunen, 2008; Engel *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012; Martel *et al.*, 2017). La deuxième hypothèse suggère que les espèces oligomériques forment des pores membranaires pouvant conduire à une mort cellulaire. Dans un premier temps, il a été montré sur des bicouches lipidiques planaires, que l'IAPP pouvait former des canaux cation-sélectif menant à une perturbation de la membrane (Mirzabekov *et al.*, 1996). Plusieurs mécanismes de formation des pores ont été proposés. En outre, la formation de ces pores serait induite par des oligomères pré-formés riches en feuillet- β qui s'insèrent dans la membrane (Kayed *et al.*, 2009; Kayed *et al.*, 2004). Des études par microscopie à force atomique suggèrent que des assemblages de 5 sous-unités s'intègrent dans la bicouche lipidique menant à la formation de pores (Quist *et al.*, 2005). Une autre voie a également été proposée et implique que l'IAPP, sous forme monomérique non-structurée, se lie aux lipides et subit un réarrangement conformationnel en oligomère riche en hélice- α , menant à une perturbation membranaire via la formation de canaux (Knight *et al.*, 2006). La formation des pores et/ou la perturbation membranaire induite par l'IAPP peut mener à une perte du contenu cellulaire et de l'osmolarité (Birol *et al.*, 2018; Last

et Miranker, 2013), ainsi qu'à de nombreux mécanismes en aval menant à la mort cellulaire (Abedini et Schmidt, 2013; Asthana *et al.*, 2018).

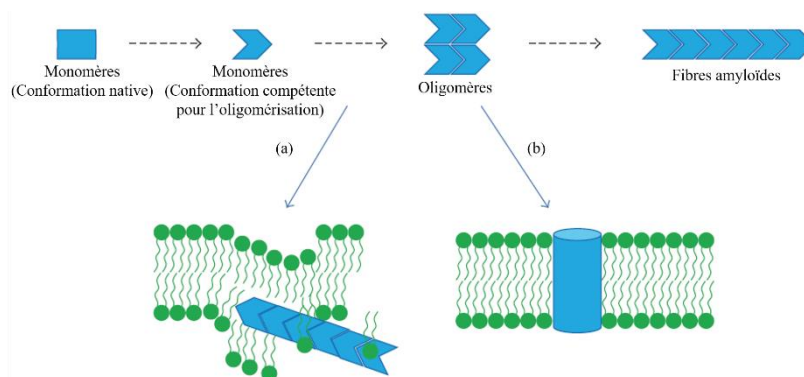


Figure 1.13. Représentation schématique de la perméabilisation membranaire induite par l'IAPP. La première hypothèse (a) propose que le peptide monomérique ou les petits oligomères interagissent avec la membrane et s'insèrent dans la bicouche lipidique. Par la suite, la formation de fibres modifie la courbure membranaire et recrute des lipides menant à la perméabilisation de la membrane plasmique. La deuxième hypothèse (b) suggère que les oligomères interagissent avec la membrane et forment des pores. Adapté de (Caillon *et al.*, 2016).

Par exemple, lors de traitements de cellules β -pancréatiques à des concentrations élevées en IAPP, la voie pro-apoptotique JNK est activée (Subramanian *et al.*, 2012). D'autre part, le récepteur FAS qui est connu comme un récepteur de mort cellulaire, peut interagir avec les oligomères d'IAPP, ce qui conduit à l'activation des voies pro-apoptotiques via les caspases 8 et 3 (Law *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2008). À cet effet, il a été observé que l'inhibition de la caspase 3 conduit à une inhibition de la toxicité cellulaire induite par l'IAPP (Law *et al.*, 2010). De plus, il a également été montré que l'IAPP peut activer l'inflammasome, menant à la production des cytokines pro-inflammatoires interleukine 1α et 1β , pouvant mener à la mort des cellules β (Masters *et al.*, 2010; Westwell-Roper *et al.*, 2011).

Le stress du réticulum endoplasmique (RE) constitue également une voie pouvant entraîner la mort cellulaire induite par l'IAPP (Eizirik *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2009). Sous conditions physiologiques normales, les protéines destinées à la sécrétion transitent du RE au trans-golgi puis dans les vésicules de sécrétion, où elles sont stockées avant leur sécrétion. Dans le cas du DTII, il y a une forte pression sur le système du RE dû à la co-expression importante d'insuline et d'IAPP (Westermarck *et al.*, 2011). L'augmentation de la demande en IAPP et en insuline entraîne une surcharge de l'organite, pouvant conduire à une incapacité à contribuer au bon repliement des protéines. En réponse à ce stress, il y a un déclenchement de la réponse aux protéines mal-repliées (UPR) qui permet d'augmenter l'expression de protéines chaperonnes du RE, et ainsi contribuer au bon repliement des protéines. Cependant, si le stress persiste et devient trop important, cela peut résulter au déclenchement de l'apoptose. Toutefois, le rôle du stress du RE dans la modulation de la toxicité de l'IAPP *in vivo* demeure controversé. En effet, chez des souris transgéniques surexprimant l'IAPP humain, il a été montré que le stress du RE joue un rôle important sur la toxicité induite à l'encontre des cellules- β (Gurlo *et al.*, 2010). De plus, sur des cellules en culture, le traitement avec de l'IAPP exogène sous forme monomérique induit un important stress du RE (Casas *et al.*, 2007). À l'opposé, il a été montré à l'aide d'îlots pancréatiques en culture exprimant l'IAPP à des concentrations supraphysiologiques, que le peptide n'induit pas l'activation du stress du RE (Hull *et al.*, 2009).

L'autophagie peut également être une voie modulant la cytotoxicité de l'IAPP. En effet, Masini *et al.* ont détecté une accumulation de vacuoles autophagiques et d'autophagosomes dans les îlots pancréatiques isolés de patients atteints du DTII (Masini *et al.*, 2009). De plus, ils ont observé que le nombre de cellules β -pancréatiques était diminué et que l'activité lysosomale y était réduite. En 2014, Shigihara *et al.* observent une augmentation de la toxicité de l'IAPP chez des souris transgéniques exprimant l'IAPP humain et *knock-down* pour l'*autophagy-related genes 7 (Atg7)*, inhibant l'autophagie (Shigihara *et al.*, 2014). En revanche, une étude réalisée sur des

cellules en culture montre que l'activation de l'autophagie par la rifampicine, protège contre la mort cellulaire apoptotique induite par l'IAPP (Rivera *et al.*, 2011). Les auteurs ont également montré que l'inhibition de la digestion autophagique lysosomale par des inhibiteurs de protéases, promeut la cytotoxicité induite de l'IAPP.

1.4.8 Rôle des glycosaminoglycanes dans l'auto-assemblage et la cytotoxicité de l'IAPP

Les dépôts amyloïdes d'IAPP sont principalement retrouvés dans la matrice extracellulaire qui est un environnement très hétérogène. Ainsi, de nombreuses (macro)molécules biologiques sont associées aux dépôts amyloïdes, telles que le composant du sérum amyloïde P, l'apolipoprotéine E, le collagène, des métaux, divers lipides, ainsi que les glycosaminoglycanes (GAGs) (Nguyen *et al.*, 2015). Bien qu'initialement considérés comme des contaminants, plusieurs études ont montré que ces cofacteurs peuvent moduler le processus amyloïdogénique et la cytotoxicité induite par l'IAPP.

Les GAGs sont de longues chaînes de polysaccharides composées par la répétition d'unités disaccharidiques (Handel *et al.*, 2005). Ceux-ci sont présents dans la matrice extracellulaire ou attachés à des corps protéiques transmembranaires pour former les protéoglycanes (PGs) (Theocharis *et al.*, 2016). Des analyses immunohistochimiques ont montré que les protéoglycanes d'héparane sulfate (HSPG) sont associées aux dépôts amyloïdes des îlots de Langerhans (Young *et al.*, 1992). Les îlots transgéniques de souris exprimant l'IAPP humain et incubés avec le composé WAS-406, un inhibiteur de HSPG, ont vu la quantité de dépôts amyloïdes diminuée (Hull *et al.*, 2007). En outre, les îlots isolés de souris transgéniques exprimant à la fois l'IAPP humain et l'héparanase, une enzyme qui catalyse le clivage de l'héparane sulfate à la surface des cellules, présentaient une réduction marquée de l'accumulation de dépôts amyloïdes (Oskarsson *et al.*, 2015). De plus, les auteurs ont montré à l'aide de cellules

en culture, que les HSPG étaient impliquées dans la cytotoxicité induite par l'IAPP. Une autre étude employant des îlots pancréatiques humains a montré que la quantité d'amyloïde diminue lorsque ces îlots sont traités avec l'héparanase (Potter *et al.*, 2015). Les cellules étaient protégées face à la toxicité induite par l'IAPP. De façon intéressante, la présence d'héparine, mimant les segments hautement sulfatés de l'héparane sulfate, dans le milieu de culture réduit également la cytotoxicité induite par l'IAPP exogène (De Carufel *et al.*, 2013; Jha *et al.*, 2011). À cet effet, de nombreuses études *in vitro* ont montré que les GAGs accélèrent drastiquement la formation de fibres amyloïdes (Castillo *et al.*, 1998; De Carufel *et al.*, 2013; Jha *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013), suggérant que les GAGs présents dans le milieu déplacent l'équilibre vers la conformation non cytotoxique fibrillaire.

D'un point de vue mécanistique, il a été montré que l'effet accélérateur de l'héparine sur la formation de fibres amyloïdes est fortement réduit lorsque l'héparine est enzymatiquement désulfatés, révélant ainsi l'importance des interactions électrostatiques entre l'IAPP et les GAGs (Castillo *et al.*, 1998). Cependant, à partir d'héparane sulfate isolé de cellules pancréatiques β -TC3, il a été montré que le degré de sulfatation ne détermine pas tous les aspects de l'interaction entre l'IAPP et les GAGs et sur la modulation de la formation de fibres amyloïdes qui en résulte (Hull *et al.*, 2012). Par titration isotherme calorimétrique, il a été observé que l'affinité de l'IAPP avec les GAGs sulfatés dépend de l'état de protonation de l'imidazole du résidu His18 et que la liaison GAG-peptide est principalement favorisée par l'enthalpie, *i.e.* via des interactions électrostatiques et liaisons hydrogènes (De Carufel *et al.*, 2013). Des études par RMN ont révélé que l'héparine, se lie à la région N-terminale chargée positivement de l'IAPP (Jha *et al.*, 2011). En plus des interactions électrostatiques, il a été montré que la longueur des chaînes et le squelette des GAGs modulent l'effet accélérateur sur la formation de fibres amyloïdes (Castillo *et al.*, 1998; Jha *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2007). Des analyses par FRET entre la sonde fluorogénique ThT et l'héparine marquée à la fluorescéine ont révélé que l'IAPP se lie aux GAGs sulfatés

avant la formation amyloïde, probablement sous une forme monomérique (Jha *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). De façon intéressante, il a été observé par dichroïsme circulaire que l'interaction des GAGs avec l'IAPP induit une transition conformationnelle d'une conformation partiellement désordonnée vers une conformation hélicoïdale, qui est rapidement convertie en feuillet- β (Abedini *et al.*, 2006; De Carufel *et al.*, 2013). Dans l'ensemble, ces études montrent que les GAGs accélèrent la formation des fibres amyloïdes *in vitro* et modulent la cytotoxicité induite par l'IAPP *in vivo*.

1.4.9 Inhibiteurs de la formation des fibres amyloïdes

Récemment, Asthana *et al.* ont récemment répertoriés 4 stratégies afin d'inhiber la formation de fibres amyloïdes, soit; (i) la stabilisation d'état(s) conformationnel(s) non-compétent(s) pour la formation de fibres amyloïdes, (ii) l'inhibition de la croissance fibrillaire ainsi que la déstabilisation et/ou le remodelage des fibres, (iii) l'inhibition de l'interaction entre les protéines amyloïdogéniques et les cofacteurs qui accélèrent l'amyloïdogénèse, et (iv) l'utilisation d'anticorps dirigés vers les précurseurs et/ou oligomères toxiques (Asthana *et al.*, 2018).

Dans la première catégorie, il est par exemple suggéré que la stabilisation de la conformation hélicoïdale de l'IAPP pourrait diminuer la conversion vers les conformations quaternaires en feuillets- β -croisés. Différentes stratégies ont été proposées pour stabiliser la structure hélicoïdale, notamment avec des polymères mimant l'hélice- α (Hassanpour *et al.*, 2014; Hebda *et al.*, 2009) et des foldamères oligoquinones chargés négativement (Kumar *et al.*, 2016). La deuxième catégorie regroupe un certain nombre de petites molécules connues pour inhiber l'auto-assemblage amyloïde. Par exemple, le flavanol de gallate d'épigallocatechine (EGCG) a montré un effet inhibiteur de la formation de fibres de l'IAPP *in vitro* ainsi qu'une inhibition de la cytotoxicité sur les cellules β -pancréatiques de rat INS-1 (Meng *et al.*,

2010). La liaison de l'EGCG avec les sites hydrophobes des fibres amyloïdes causerait un encombrement stérique interférant ainsi avec l'auto-assemblage protéique, probablement en empêchant la nucléation secondaire (Palhano *et al.*, 2013). De plus, cette molécule pourrait remodeler ou perturber la structure amyloïde (Cao et Raleigh, 2012). D'autres petites molécules polyphénoliques ont été proposées comme inhibiteurs de la formation de fibres amyloïdes, tels que le resvératrol ou le curcumin. Des études par dynamique moléculaire ont montré que ces molécules pourraient stabiliser des intermédiaires en dehors de la voie amyloïdogénique, via des interactions π - π ou des liaisons hydrogènes ainsi que des interactions hydrophobes, et donc inhiber la formation de fibres amyloïdes (Nedumpully-Govindan *et al.*, 2016). En outre, des analogues de l'IAPP non-amyloïdogéniques peuvent être utilisés comme inhibiteur. Tel que mentionné précédemment, la présence de proline perturbe les structures secondaires en feuillets- β , permettant d'inhiber la formation de fibres amyloïdes. Le pramlintide est un analogue de l'IAPP ayant 3 prolines au niveau du segment 20-29, permettant ainsi d'inhiber la formation de fibres amyloïdes (Wang *et al.*, 2015). Cet analogue non amyloïdogénique conserve une activité biologique et est administré aux personnes diabétiques pour pallier à la diminution de l'activité de l'IAPP (Kruger et Gloster, 2004). Comme il a été mentionné, les dépôts amyloïdes sont associés à de nombreux cofacteurs pouvant moduler la formation des fibres et donc, leur cytotoxicité. Par conséquent, les stratégies regroupées dans la troisième catégorie consistent à inhiber les interactions entre les précurseurs protéiques et ces cofacteurs pour diminuer la formation de fibres. Notamment, l'inhibition de l'interaction entre l'IAPP et les GAGs permettrait d'inhiber la cytotoxicité induite par l'IAPP. Ainsi, la présence d'héparine soluble a un effet protecteur sur la cytotoxicité induite par l'IAPP, probablement due à une compétition de liaison entre l'IAPP et les GAGs endogènes (Jha *et al.*, 2011; Saridaki *et al.*, 2012). De façon similaire, la présence de composé sulfaté comme l'acide fuschine ou le *fast green* FCF inhibent la formation de fibres amyloïdes ainsi que l'effet accélérateur des GAGs (Meng et Raleigh, 2011). Finalement, la dernière catégorie consiste en une stratégie d'immunisation contre les

dépôts amyloïdes avec la génération d'anticorps dirigés contre des conformations quaternaires précises de l'IAPP (Lee *et al.*, 2016).

1.5 Sécrétine

1.5.1 Activités biologiques de la sécrétine

En 1902, les biochimistes Bayliss et Sterling ont apporté la première preuve expérimentale d'une stimulation induite par des sécrétions pancréatiques via un mécanisme hormonal (Bayliss et Starling, 1902). En effet, ils ont identifié une substance provenant de la muqueuse du petit intestin ayant la capacité d'induire les sécrétions pancréatiques, qu'ils nommèrent sécrétine. Ce n'est qu'en 1961 que la sécrétine sera purifiée, à partir de la muqueuse intestinale porcine (Jorpes et Mutt, 1961). La structure primaire de la sécrétine est hautement conservée chez les vertébrés, suggérant un rôle physiologique important (tableau 1.7). Chez l'humain, il a été rapporté que la sécrétine est exprimée dans de nombreux organes, comprenant l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon, la valvule iléo-caecale, le côlon, la rate, les testicules, les ovaires, les poumons et diverses parties du cerveau (Chey et Chang, 2014). La sécrétine est initialement exprimée en préprohormone de 121 acides aminés comprenant un peptide signal en N-terminal, un espaceur, le peptide mature et une séquence C-terminale de 72 résidus (Figure 1.14) (Afroze *et al.*, 2013). Le peptide mature de 27 acides aminés contient une identité de séquence et de conformation avec les membres de la famille sécrétine/glucagon/GHRH (voir tableau 1.1). Le récepteur de la sécrétine est exprimé de façon endogène dans le cerveau, le pancréas, l'estomac, les reins et le foie (Afroze *et al.*, 2013). La sécrétine exerce de nombreuses activités biologiques, telles que la régulation de la sécrétion d'ions bicarbonate dans le duodénum à partir des épithéliums tapissant les canaux pancréatiques et biliaires, la modulation de l'homéostasie de l'eau et de la sécrétion d'acide gastrique (Afroze *et al.*, 2013). Au niveau de sa structure secondaire, ce peptide est principalement désordonné

en milieu aqueux et subit une conversion conformationnelle en présence de 40% TFE ou de diméthylsulfoxyde (DMSO), vers la formation de structure(s) hélicoïdale(s) (Figure 1.15) (Hofmann *et al.*, 1989).

MAPRLLLLL¹⁰ LLLGGSAAARP²⁰ APPRARRHSD³⁰ GTFTSELSRL⁴⁰
 REGARLQRL⁵⁰ QGLVGKRSEQ⁶⁰ DAENSMWTR⁷⁰ LSAGLLCP⁸⁰
 SNMPILQAWM⁹⁰ PLDGTWSPWL¹⁰⁰ PPGPMVSEPA¹¹⁰ GAAAEGTLRP¹²⁰ R

Figure 1.14. Structure primaire de la préprosecréline. Les acides aminés indiqués en vert correspondent à la séquence signal, en noir à l'espaceur, en rouge à la sécrétine mature et en bleu à l'extension C-terminale.

Tableau 1.7. Phylogénie de la sécrétine

Espèces	Structure primaire				IS (%)
	1	10	20	27	
Humain	HSDGTFTSE	LSRLREGARL	QRL ^L LQGLV		100
Chien	HSDGTFTSE	LSRLRE ^S ARL	QRL ^L LQGLV		96.4
Cochon, vache, chèvre	HSDGTFTSE	LSRLR ^D SARL	QRL ^L LQGLV		92.9
Rat	HSDGTFTSE	LSRLR ^D SARL	QRL ^L LQGLV		89.3
Souris	HSDG ^M F ^T TSE	LSRLR ^D SARL	QRL ^L LQGLV		89.3
Cochon d'inde	HSDGTFTSE	^K SRLR ^D SARL	QRL ^L LQGLV		89.3
Lapin	HSDGT ^L TSE	LSRLR ^D LARL	QRL ^L LQGL ^L		85.7
Poulet	HSDG ^L F ^T TSE	^Y SKMRG ^N A ^Q V	^Q K ^F L ^Q N ^L M		57.1

Les acides aminés indiqués en rouge diffèrent de ceux retrouvés chez l'humain. IS: identité de séquence. Adapté de (Chey et Chang, 2014).

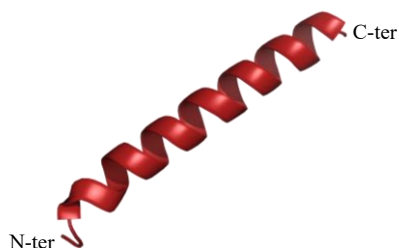


Figure 1.15. Représentation en ruban de la structure hélicoïdale de la sécrétine. Structure obtenue grâce au logiciel i-tasser (Roy et al., 2010; Zhang, 2008), adapté de (Afroze et al., 2013).

1.5.2 Modèle de la catalyse membranaire

Étant donné la difficulté d'obtenir précisément la conformation des ligands RCPG de la classe B lorsque les peptides sont complexés à leur récepteur respectif, les structures ont souvent été élucidées en employant des membranes modèles mimant la bicouche lipidique de la membrane plasmique. La justification d'une telle approche tient au fait que lorsqu'un ligand lie son récepteur membranaire, il a également interagit avec la bicouche lipidique environnante (Langelaan et Rainey, 2010). En conséquence, un peptide qui interagit avec un environnement mimant la membrane plasmique aura une probabilité d'acquérir une conformation proche de sa conformation bioactive (Langelaan et Rainey, 2010). De façon intéressante, Inooka *et al.* ont validé ce concept en étudiant le PACAP27, qui présente une hélice- α dans la région C-terminale suite à sa liaison au domaine N-terminal isolé du récepteur PAC1 et également en présence de milieu mimant la membrane plasmique (Inooka *et al.*, 2001). Des corrélations fonctionnelles peuvent également être déduites. Par exemple, en présence de micelles, la calcitonine présente une conformation hélicoïdale et perd cette structure lorsque le résidu F16 est délété, ce qui induit une perte de la fonction biologique (Findlay *et al.*, 1983; Motta *et al.*, 1998). D'autre part, il a été suggéré qu'un peptide aurait, en considérant la surface occupée par un récepteur à la surface cellulaire, plus de probabilité d'interagir avec la membrane avant d'interagir avec le récepteur. Cette hypothèse est connue sous le nom de la catalyse membranaire (Sargent et Schwyzer, 1986) et comprend 4 éléments (Figure 1.16). Premièrement, au vu de l'espace occupé par un récepteur, un ligand peptidique se liera probablement au feuillet externe de la membrane plasmique plutôt qu'à son récepteur en premier. Deuxièmement, la concentration locale de peptide se retrouve amplifiée permettant ainsi d'augmenter le taux de liaison au récepteur. Troisièmement, lors de l'adsorption, la diffusion du ligand devient bidimensionnelle au lieu de tridimensionnelle, augmentant ainsi les taux de liaison peptide-récepteur. Quatrièmement, l'environnement membranaire lipidique déclenche une conversion conformationnelle du ligand en une structure qui sera

reconnue par le récepteur. De ce fait, l'environnement adjacent à la membrane plasmique permet de diminuer la barrière énergétique de cette conversion conformationnelle vers la structure bioactive. Cependant, il est à noter que l'hypothèse de la catalyse membranaire simplifie la complexité de la membrane plasmique des cellules eucaryotes et ne prend pas en considération son hétérogénéité. En effet, la surface d'une cellule eucaryote est décorée d'une grande diversité de macromolécules, telles que des (glyco)protéines et des PGs (Theocharis *et al.*, 2016). Les PGs sont formés par un corps protéique transmembranaire lié avec des chaînes de GAGs qui sont chargées négativement et forment un réseau tridimensionnel à la surface des cellules (Handel *et al.*, 2005; Theocharis *et al.*, 2016). Ainsi, les peptides chargés positivement, et tel est le cas pour les ligands RCPG de la classe B, pourraient interagir électrostatiquement avec les GAGs et ce, préalablement à leur liaison à leur récepteur, de façon similaire à de nombreuses cytokines.

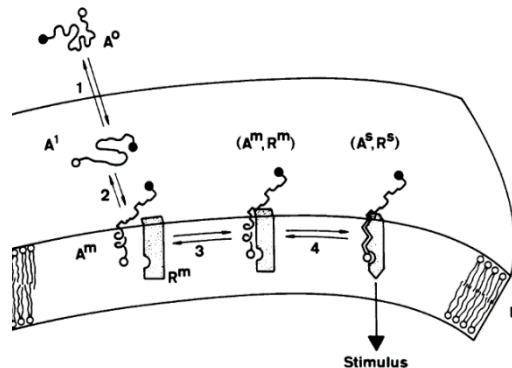


Figure 1.16. Hypothèse de la catalyse membranaire. L'étape 1 indique l'interaction du ligand peptidique avec la bicouche lipidique suivit par un changement conformationnel au niveau de l'étape 2. À l'étape 3, la diffusion du peptide sur un plan bidimensionnel permet l'interaction avec le récepteur. Finalement, le ligand peptidique adopte une conformation bioactive permettant d'activer le récepteur.

1.6 Glycosaminoglycanes

Les GAGs sont de longues chaînes hétéropolysaccharidiques négativement chargées que l'on retrouve dans la matrice extracellulaire, au niveau de la membrane basale, à la surface cellulaire et à l'intérieur des granules de sécrétion (Theocharis *et al.*, 2016). Certaines chaînes de GAGs peuvent être libres dans la matrice extracellulaire, ou attachées à un corps protéique transmembranaire pour former des PGs. Les GAGs sont formées par la répétition d'unité disaccharidique composé principalement d'hexosamine N-acétylé (N-acétylé-D-galactosamine ou N-acétylé-D-glucosamine) et d'acide hexuronique D ou L (acide D-glucuronique ou acide L-iduronique) (Theocharis *et al.*, 2016). On dénombre six types de GAGs; les galactosaminoglycanes avec le (i) chondroïtine sulfate et le (ii) dermatane sulfate, et les glucosaminoglycanes avec (iii) l'héparane sulfate, (iv) l'héparine, (v) le kératane sulfate et (vi) l'acide hyaluronique (Figure 1.17) (Theocharis *et al.*, 2016). Les GAGs sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques, incluant la modulation de signaux de transduction associés à des processus tels que l'adhésion, le développement et la prolifération cellulaire

(Handel *et al.*, 2005). Les GAGs se lient à une grande diversité de protéines, incluant des protéases (dont celles impliquées dans la coagulation du sang), des protéines de liaisons aux lipides (lipases), des récepteurs de surface cellulaire pour certains virus et des molécules de signalisation (chimiokines et facteurs de croissance) (Handel *et al.*, 2005). Plusieurs forces sont impliquées dans ses interactions; interactions électrostatiques, ponts hydrogènes et interactions hydrophobiques (Amand *et al.*, 2012). En outre, certaines interactions protéines-GAGs sont favorisées par la présence d'une séquence de liaison aux GAGs XBBXBX et XBBBXXBX, où B est un résidu basique et X un résidu hydrophobe, non chargé (Cardin et Weintraub, 1989). De façon intéressante de nombreuses hormones peptidiques, telles que le PACAP27, le VIP et le glucagon, se lient *in vitro* fortement à l'héparine, suggérant une possible interaction *in vivo* (Tchoumi Neree *et al.*, 2015; Tchoumi Neree *et al.*, 2014). De plus, la liaison des ligands peptidiques aux GAGs sulfatés induit une transition d'une conformation principalement aléatoire vers une structure secondaire en hélice- α , similaire à celle de la structure bioactive (Tchoumi Neree *et al.*, 2015; Tchoumi Neree *et al.*, 2014).

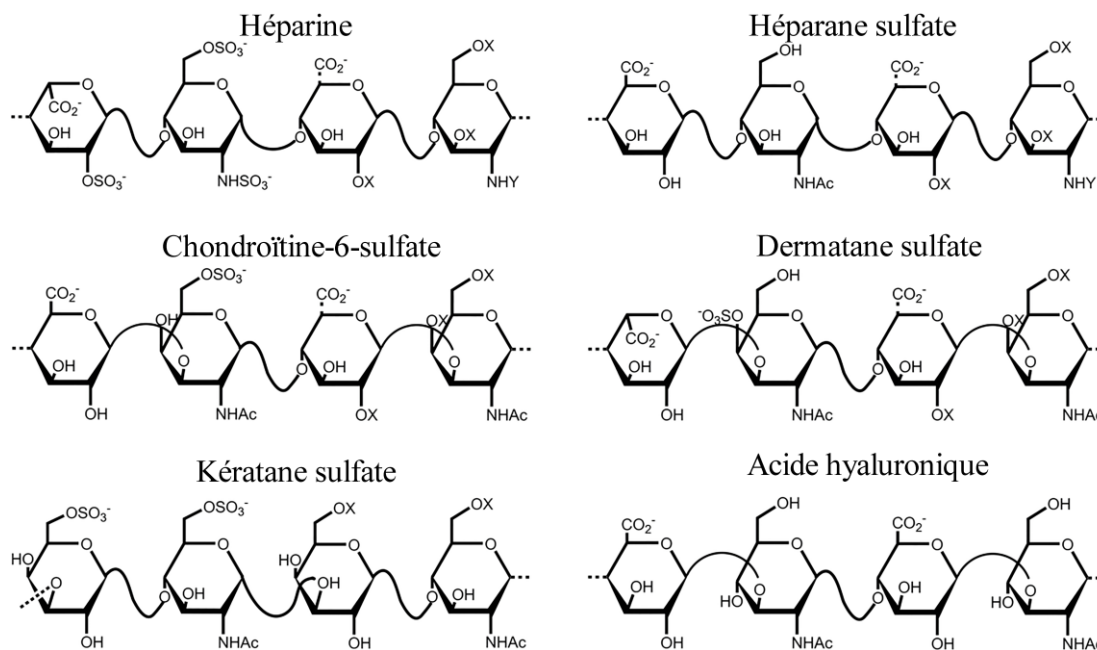


Figure 1.17. Répétition des unités de disaccharides présentes dans les différentes classes de GAGs. (X= -OH ou -OSO₃⁻; Y= -Ac ou -OSO₃⁻). Adapté de (Kowitsch et al., 2018).

1.7 Problématique et hypothèse

La modulation de l'ensemble conformationnel des ligands peptidiques des RCPG de la classe B est au cœur de leurs rôles physiologiques et pathologiques. D'une part, l'acquisition d'une structure secondaire bioactive précise permet aux hormones peptidiques d'exercer leur(s) activité(s) biologique(s). Le repliement en une structure bioactive est influencé par l'environnement des ligands peptidiques, tels que le pH, les interactions transitoires avec d'autres macromolécules ou encore l'environnement membranaire. Ainsi, de nombreuses études ont étudié la conversion conformationnelle d'hormones peptidiques avec des modèles membranaires simplifiés. Or, ces modèles ne représentent pas la complexité de la membrane plasmique et notamment, dû à l'absence de GAGs. Par conséquent, la contribution des GAGs sur les transitions structurales secondaires des hormones peptidiques dans un contexte membranaire reste

à élucider. D'autre part, la forte propension à l'agrégation des ligands peptidiques des RCPG de la classe B est associée à des pathologies et à des limitations au niveau de la formulation thérapeutique. Ainsi, la compréhension des mécanismes de l'auto-assemblage amyloïde et de la cytotoxicité associée, revêt un intérêt crucial pour la prévention de nombreuses pathologies. Parmi les nombreux mécanismes de cytotoxicité, la perturbation membranaire apparaît comme un mécanisme commun aux peptides et protéines amyloïdogéniques. Toutefois, les études *in vitro* évaluant la perturbation membranaire sont majoritairement réalisées avec des modèles de bicouches lipidiques simples et ce, en absence de GAGs. Or, il est connu d'une part que les GAGs modulent la cytotoxicité et d'autre part qu'ils influencent les réarrangements conformationnels secondaires et quaternaires. Par conséquent, la contribution des GAGs sur la perturbation membranaire induite par des hormones peptidiques à caractère amyloïdogénique reste à déterminer.

L'hypothèse globale de ce projet de thèse est que les GAGs joueraient un rôle dans les réarrangements conformationnels secondaires et quaternaires des ligands peptidiques des RCPG de la classe B, aussi bien dans un contexte physiologique, *i.e.* activation du récepteur, que pathologique, *i.e.* agrégation et toxicité cellulaire.

1.8 Objectifs

L'objectif principal de ce projet de thèse vise à déterminer l'impact des GAGs dans les réarrangements conformationnels secondaires et quaternaires des hormones peptidiques des RCPG de la classe B et ce, en utilisant deux peptides modèles, l'un amyloïdogénique, l'IAPP et l'autre non, la sécrétine. Les trois objectifs spécifiques suivants seront ciblés :

- 1- Développer des outils chimiques pour étudier les transitions conformationnelles quaternaires de l'IAPP associées à la formation de fibres amyloïdes.
- 2- Éclaircir la contribution des GAGs associés à la membrane plasmique dans les réarrangements conformationnels quaternaires de l'IAPP et la perturbation membranaire associée.
- 3- Évaluer le rôle des GAGs associés à la membrane plasmique dans le modèle de la catalyse membranaire des hormones peptidiques et ce, en utilisant la sécrétine.

CHAPITRE II

ARTICLE I

KINETIC AND CONFORMATIONAL INSIGHTS INTO ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE SELF-ASSEMBLY USING A BIARSENICAL FLUOROGENIC PROBE

Noé Quittot, Mathew Sebastiao, Soultan Al-Halifa and Steve Bourgault*

Department of Chemistry, University of Québec in Montreal, Montreal, C.P. 8888,
Succursale Centre-Ville, Montreal, H3C 3P8, Canada

Quebec Network for Research on Protein Function, Engineering and Applications,

PROTEO

Manuscrit publié dans ACS Bioconjugate Chemistry, 2018, 29, 2, 517–527

DOI : 10.1021/acs.bioconjchem.7b00827

Contribution des auteurs:

Noé Quittot: Conception du projet, exécution des expériences (synthèse et purification de peptides, spectrofluorimètre, microscopie à force atomique, diffusion dynamique de la lumière, cinétique d'auto-assemblage ThT et FIAsH), analyses des résultats, préparation des figures, rédaction de l'article.

Mathew Sebastiao: exécution des expériences (Microscopie électronique à transmission), analyses des résultats.

Soultan Al-Halifa: exécution et analyse des expériences de diffusion dynamique de la lumière

Steve Bourgault: Supervision du projet, rédaction et correction de l'article.

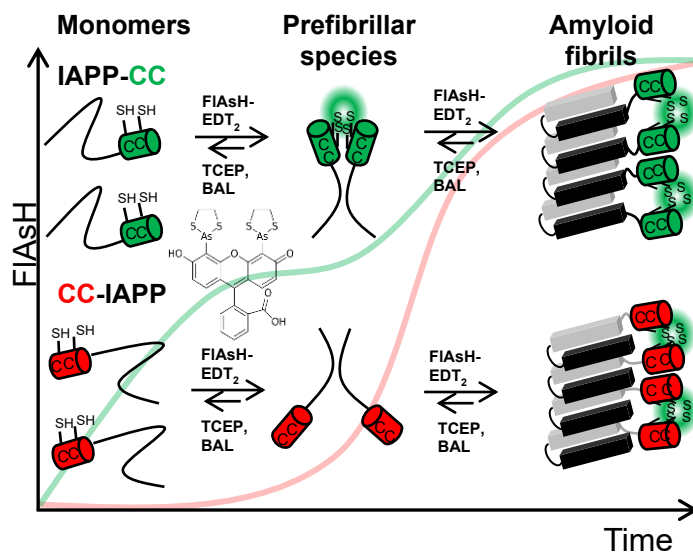


Figure 2.1. Résumé graphique de l'article I: Kinetic and conformational insights into islet amyloid polypeptide self-assembly using a biarsenical fluorogenic probe

2.1 Résumé

La formation de fibres amyloïdes et leur dépôt tissulaire sont associés à de nombreuses maladies. Des études ont montré que les intermédiaires préfibrillaires, tels que les oligomères, sont les espèces les plus toxiques de la cascade amyloïdogénique. Ainsi, la compréhension des mécanismes de formation et la caractérisation de l'ensemble conformationnel des espèces préfibrillaires est essentielle. En raison de leur nature transitoire et hétérogène, la détection et la caractérisation des espèces préfibrillaires restent difficiles. La sonde fluorogénique *fluorescein arsenical hairpin* (FAsH), qui reconnaît un motif tétracystéique, a été récemment utilisée pour détecter l'oligomérisation de peptides amyloïdogéniques présentant un motif Cys-Cys. Dans cette étude, nous avons appliqué la méthode de détection via la sonde FAsH pour obtenir de nouvelles informations cinétiques et conformationnelles sur l'auto-assemblage de *l'islet amyloid polypeptide* (IAPP), une hormone peptidique de 37 résidus dont le dépôt tissulaire est associé au diabète de type II. Par balayage positionnel du motif Cys-Cys, la stabilité des sites de liaison au FAsH formés par les motifs tétracystéiques non-contigus lors de l'auto-assemblage a été évaluée et a révélé un rapprochement rapide des monomères par la convergence des domaines C-terminaux. De plus, les domaines N-terminaux se rapprochent les uns des autres seulement lors de la formation des structures amyloïdes en feuillets- β -croisés. Nous avons démontré que la méthode FAsH est bien adaptée pour détecter les fibres amyloïdes négatives pour la thioflavine T, ainsi que pour cribler les inhibiteurs de la formation d'amyloïde. Cette étude souligne qu'avec le balayage positionnel du motif bicystéique (Cys-Cys), la méthode de détection via la sonde fluorogénique FAsH permet d'obtenir des informations conformationnelles uniques sur les espèces protéiques auto-assemblées en fonction du temps et ce, tout au long de la cascade amyloïdogénique.

2.2 Abstract

Amyloid fibril formation and tissue deposition are associated with many diseases. Studies have shown that prefibrillar intermediates, such as oligomers, are the most toxic proteospecies of the amyloidogenic cascade. Thus, understanding the mechanisms of formation and the conformational ensemble of prefibrillar species is critical. Due to their transient and heterogeneous nature, detection and characterization of prefibrillar species remain challenging. The fluorogenic probe fluorescein arsenical hairpin (FAsH), which recognizes tetracysteine motif, has been recently used to detect the oligomerization of amyloidogenic peptides encompassing a Cys-Cys tag. In this study, we extended the FAsH detection method to gain novel kinetic and conformational insights into the self-assembly of islet amyloid polypeptide (IAPP), a 37-residue peptide hormone whose deposition is associated with type II diabetes. By positional scanning of the Cys-Cys motif, the stability of the non-contiguous tetracysteine FAsH-binding sites formed during self-assembly was evaluated and revealed rapid monomer self-recognition through the convergence of C-terminal domains. On the other hand, the N-terminal domains come close to each other only upon the formation of the cross- β -sheet amyloid structure. We demonstrated that this method is well suited to detect thioflavin T-negative fibrils and to screen inhibitors of amyloid formation. This study highlights that with positional scanning of the split-tetracysteine motif (Cys-Cys), the FAsH detection method offers unique time-dependent conformational insights of the proteospecies assembled throughout the amyloidogenic pathway.

2.3 Introduction

Amyloid fibrils are highly ordered polypeptide aggregates, which are characterized by a quaternary structure rich in cross- β -sheets (Chiti et Dobson, 2017). Amyloid tissue deposition is closely associated with several diseases, such as Alzheimer's disease, type II diabetes mellitus (T2DM) and various systemic amyloidosis (Chiti et Dobson, 2017). Although mature fibrils can be associated with cell degeneration (Bucciantini *et al.*, 2012; Krotee *et al.*, 2017), compelling experimental evidences have suggested that intermediates of the amyloidogenic cascade are the most cytotoxic assemblies (Glabe, 2008; Kaye *et al.*, 2003; Mannini *et al.*, 2014). Unlike amyloid fibrils that share well-defined structural characteristics, characterization of prefibrillar assemblies is very challenging given that oligomers display wide secondary and quaternary conformational ensembles (Nagel-Steger *et al.*, 2016). Moreover, due to the transient nature of intermediate proteospecies, structural study often requires their chemical stabilization, impeding the fibrillization process (Nagel-Steger *et al.*, 2016). Therefore, it is quite challenging to concurrently obtain information on oligomer conformational ensembles and on the kinetics of their assembly. Above all, understanding the process of oligomer formation, both kinetically and mechanistically, is critical in order to develop (bio)chemical approaches to prevent their cytotoxicity (Fradinger *et al.*, 2008; Solomon, 2005).

The most common approach to study the kinetics of amyloid formation relies on the time-course measurement of thioflavin T (ThT) fluorescence (Ban *et al.*, 2003; Biancalana et Koide, 2010). ThT is a benzothiazole dye that exhibits a strong increase of its fluorescence quantum yield upon binding to the cross- β -sheet arrangement of amyloids (Biancalana et Koide, 2010; LeVine, 1993; Naiki *et al.*, 1989; Sebastiao *et al.*, 2017; Wolfe *et al.*, 2010). A major limitation of this dye is that this detection method is insensitive to prefibrillar species. In this context, alternative fluorescent probes were developed to detect oligomers, including BoDipy-Oligomer (BD-oligo),

which binds to exposed hydrophobic patches of A β oligomers, and 4',3'''-bis(carboxymethyl)[2,2';5',2'';5'',2''';5''',2''''']quinquethiophene-5,5''''-dicarboxylic acid (p-FTAA), which recognizes protein aggregates with repetitive β -sheet structures (Hammarstrom *et al.*, 2010; Hatai *et al.*, 2017; Teoh *et al.*, 2015). However, these fluorescence-based detection methods offer limited information regarding oligomer conformation(s) and stability. In 2011, an alternative strategy based on the dye fluorescein arsenical hairpin (FAsH) was developed to study amyloid- β (A β) peptide self-assembly (Lee *et al.*, 2011). The fluorescence quantum yield of FAsH is dramatically amplified upon its binding to a tetracysteic tag and this fluorogenic probe was initially developed for the labelling of proteins (Griffin *et al.*, 2000; Griffin *et al.*, 1998). By incorporating two non-native Cys at the N-terminus of A β peptide, oligomer formation could be monitored by FAsH fluorescence. As each monomeric unit displays a single Cys-Cys tag, the formation of the tetracysteine (tetra-Cys) FAsH-binding motif only occurred after self-recognition. This study suggested that A β amyloidogenesis is characterized by the formation of stable oligomers that undergo quaternary conformational conversion into amyloid fibrils. This split tetra-Cys motif approach has been recently extended to the study of α -synuclein (Dhavale *et al.*, 2017) and islet amyloid polypeptide (IAPP) (Wang *et al.*, 2017) self-assembly.

IAPP is a 37-residue C- α -amidated peptide hormone whose deposition as amyloid fibrils in pancreatic islets is associated with T2DM progression (Akter *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2015; Opie, 1901; Westermark *et al.*, 2011). As for other amyloidogenic polypeptides, the conformational nature of toxic oligomeric species is still the matter of active research and debates (Abedini et Schmidt, 2013; Nagel-Steger *et al.*, 2016). For instance, whereas oligomers derived from the human sequence are highly cytotoxic, the oligomers assembled from the non-amyloidogenic rodent variant (rIAPP) show low toxicity (Abedini *et al.*, 2016). Therefore, it is unclear whether the toxicity is associated with a specific oligomeric conformation and/or it arises from the fibrillization process in itself. IAPP amyloid self-assembly is often described as a

nucleated polymerization, characterized by sigmoidal growth kinetics with three distinctive phases (Arosio *et al.*, 2015). The formation of competent oligomeric nuclei constitutes the rate-limiting step (lag phase), which is followed by fibril elongation where competent monomers and/or oligomers add to protofilament growing ends.

It was recently reported that IAPP oligomer formation can be monitored by means of the FIAsh probe without the addition of non-native Cys residues (Wang *et al.*, 2017). Indeed, IAPP encompasses two Cys within its N-terminal domain, allowing the formation of a non-contiguous tetra-Cys binding motif upon oligomerization. However, in this previous study the authors omitted the critical addition of a thiolic competitor and, accordingly, FIAsh fluorescence signal did not detect the formation of a stable biarsenical binding motif. The present paper describes the use of the FIAsh biarsenical fluorogenic probe to gain mechanistic and conformational insights into IAPP amyloid self-assembly. By successively incorporating (non)native Cys-Cys motif at different regions of the peptide sequence, we evaluated the stability of the FIAsh recognition motif formed upon oligomerization (Figure 2.2). Our results indicate that the C-terminal domains of IAPP are in close contact during the lag phase, whereas the N-terminal domain come close to each other only upon the formation of the cross- β -sheet amyloid structure. This FIAsh-based method, which allows the detection of ThT-negative amyloids, can be applied to monitor IAPP self-assembly in the presence of biological co-factors and inhibitors.

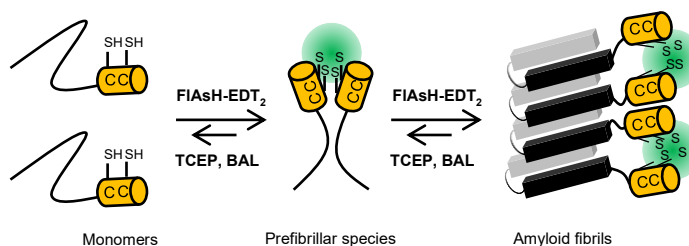


Figure 2.2. Schematic representation of the formation of a non-contiguous tetracysteine motif formed during IAPP self-assembly allowing FIAsh binding. TCEP: tris(2-carboxyethyl)phosphine, BAL: British Anti Lewisite.

2.4 Experimental section

2.4.1 Peptides Synthesis

Peptides were synthesized on solid support with Fmoc chemistry using 2-(6-chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium hexafluorophosphate and diisopropylethylamine coupling strategy, as previously described (De Carufel *et al.*, 2015). Oxazolidine pseudoproline dipeptide derivatives were incorporated to facilitate the synthesis (Abedini et Raleigh, 2005). Peptides were cleaved from the resin using a mixture of trifluoroacetic acid (TFA), ethanedithiol (EDT), phenol, and water. Peptides were purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). To increase solubility, crude peptides were dissolved in 35% (v/v) acetic acid before being injected on a preparative C18 column (Phenomenex) using a linear gradient of acetonitrile (ACN) in a H₂O/TFA mixture at (0.06% (v/v)). Collected fractions were analyzed by analytical RP-HPLC using an Aeris peptide XB C18 column (150 mm × 4.6 mm; 3.6 μm, Phenomenex) and by “time-of-flight” mass spectrometry using a LC/MS-TOF instrument (Agilent). Fractions corresponding to the desired peptide with a purity of >95% were pooled and lyophilized. For WT IAPP the formation of a disulfide bond between Cys-2 and Cys-7 was achieved by dimethyl sulfoxide (DMSO) oxidation under mild agitation overnight. Peptides were repurified by RP-HPLC as described above. The formation of disulfide bond was confirmed by treating the peptide with a mixture of dithiothreitol and β-mercaptoethanol, or not, and by comparative analyses of the treated and non treated samples by analytical RP-HPLC.

2.4.2 IAPP Sample Preparation

Aliquots of monomerized IAPP were prepared by dissolving the lyophilized and purified peptide in 100% hexafluoro-2-propanol (HFIP) at a concentration of 1 mg/mL. The solution was sonicated for 30 min and filtered through a 0.22 μm hydrophilic

PVDF filter before being lyophilized. The resulting peptide powder was solubilized for a second time in HFIP and sonicated for 30 min. The solution was aliquoted and lyophilized. Peptide concentration was validated by measuring the absorbance at 280 nm using a theoretical molar extinction coefficient of $1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Monomerized IAPP samples were kept dried at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until they were used, but not for longer than 4 weeks.

2.4.3 Fluorescence Measurement

Lyophilized and monomerized IAPP peptides were solubilized in 20 mM TrisHCl (pH 7.4) at a final concentration of 50 μM . After 30 min or 24 h at 25 $^\circ\text{C}$ without agitation, 10 μM ThT or 0.5 μM FAsH were added supplemented with 125 μM BAL and 500 μM TCEP. ThT and FAsH fluorescence were measured using a LS 45 Fluorescence Spectrometer (Perkin Elmer, Waltham, MA). The excitation wavelengths of ThT and FAsH were 440 and 508 nm respectively. Spectra from 460 to 540 nm for ThT and 520 to 600 nm for FAsH were collected with a scan rate of 100 nm/min.

2.4.4 Circular Dichroism Spectroscopy

Lyophilized aliquots of monomerized IAPP and its analogs were solubilized in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) at a concentration of 50 μM and incubated at 25 $^\circ\text{C}$ without agitation. At the desired time of incubation, samples were incorporated into a 2 mm path length quartz cell. Far-ultraviolet (far-UV) CD spectra were recorded from 260 to 190 nm using a J-815 CD spectropolarimeter (Jasco) at 25 $^\circ\text{C}$. The wavelength step was set at 0.5 nm with an average time of 10 s per scan at each wavelength step. Each collected spectrum was background subtracted with peptide-free buffer. The raw data were converted to mean residue ellipticity (MRE) using the following formula:

$$MRE \text{ (deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}\text{)}$$

$$= \frac{\text{Mean residue weight (g} \cdot \text{mol}^{-1}\text{)} \times \text{CD signal (deg)}}{10 \times \text{path length (cm)} \times \text{peptide concentration (g} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)}}$$

2.4.5 Dynamic light scattering

Measurements were performed at 25°C using a Malvern Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, UK) containing a 4 mW helium-neon laser with a wavelength of 633 nm and a scattering angle of 90°. Lyophilized and monomerized IAPP and its analogs were solubilized in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) at a concentration of 50 µM followed by a filtration through a 0.22 µm polyvinylidene fluoride (PVDF) filter and incubated at 25 °C without agitation for 30 min and 24 h, referred as prefibrillar species and amyloid fibrils, respectively. For each experiment, 3 measurements were recorded. Each measurement corresponds to 10 runs of 10 seconds. Data results are representative of 3 individual experiments. The experimental results were analyzed using the built-in Zetasizer software 7.11 and the results were plotted as number of distribution (%) of particles versus hydrodynamic diameter (nm).

2.4.6 Atomic force microscopy

Lyophilized and monomerized IAPP peptides were solubilized in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 at a final concentration of 50 µM. Solution was incubated for 30 minutes at 25°C without agitation before being diluted in 1% acetic acid and immediately applied to freshly cleaved mica. The mica was washed twice with deionized water and air-dried for 24 hours after blotting. Images were acquired on a Veeco/Bruker Multimode AFM using tapping mode with a silicon tip (2-12 nm tip radius, 0.4 N/m force constant) on a nitride lever. Images were taken at 0.2 Hz and 1024 scan/minute.

2.4.7 Transmission Electron Microscopy

Lyophilized and monomerized IAPP peptides were solubilized in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, at a final concentration of 50 μ M. The solution was incubated for 24 h at 25 $^{\circ}$ C without agitation before being diluted to a final concentration of 5 μ M in deionized water. Solutions were immediately applied to glow-discharged carbon films on 300 mesh copper grids. After adsorption for 1 min and air-blotting, samples were negatively stained with 1.5% uranyl formate for 1 min and air-dried for 15 min. Images were recorded using a FEI Tecnai 12 BioTwin microscope operating at 120 kV and equipped with an AMT XR80C CCD camera system.

2.4.8 Preparation of Large Unilamellar Vesicles

LUVs were formed of DOPC/DOPG (7:3; molar ratio). Lipids were solubilized in 100% chloroform in a glass tube and evaporated with a nitrogen gas stream. The lipid film was then rehydrated in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 for at least 30 minutes. The solution was freeze-thawed 5 times before being extruded through a 0.1 μ m nucleopore membrane for 15 cycles. Size and homogeneity of LUVs were confirmed by DLS.

2.4.9 Kinetics of Self-Assembly

Lyophilized and monomerized IAPP peptides were solubilized at 25 μ M in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4. The peptide solution was then diluted to 12.5 μ M with Tris-HCl, supplemented, or not, with 500 μ M TCEP and 125 μ M BAL. ThT, FlAsH or both (for FRET experiments), were added to a final concentration of 10 μ M and 0.5 μ M respectively. Assays were carried out with 100 μ L volumes in triplicate in sealed 96-well microplate (Corning, black walled, clear bottomed, non-binding surface). Using a Molecular Devices Spectramax i3 plate reader, the microplate was agitated for 5 seconds (linear shaking, 2 mm amplitude, 654 rpm) and the fibrillization kinetics were

performed at 25 °C under quiescent conditions. Self-assembly was monitored by ThT ($\lambda_{\text{excitation}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 485 \text{ nm}$), FIAsh ($\lambda_{\text{excitation}} = 508 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 533 \text{ nm}$) or FRET ($\lambda_{\text{excitation}} = 508 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 533 \text{ nm}$) fluorescence with measurements taken from the bottom of the plate every 10 minutes under quiescent conditions. For competition assays on oligomeric species, the same protocol was followed with different BAL concentrations. After 30 minutes spectra were recorded on a M1000 Pro plate reader (Tecan) with an excitation wavelength of 508 nm and an emission scan from 520 to 600 nm. Kinetic data from triplicates were averaged and fitted with a Boltzmann sigmoidal curve where t_{50} is the time to half-maximum intensity, k is the apparent first-order rate constant and F_0 and F_{max} are the minimum and maximum fluorescence intensities, respectively.

$$F = \frac{F_0 + (F_{\text{max}} - F_0)}{1 + e^{\frac{-(t - t_{50})}{k}}}$$

The lag time (t_{lag}) was defined as the time before the any detectable amyloid forms and was calculated from the sigmoidal model as: $t_{\text{lag}} = t_{50} - 2k$.

2.4.10 Photochemical-Induced Cross-Linking (PICUP)

IAPP peptides and its derivatives were solubilized at 50 μM in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, at 25°C for 30 minutes without agitation. Samples were centrifuged at 16,000 g for 30 min and aliquots from the supernatant were removed. Cross-linking solution was added to aliquots for final concentration of 70 μM Tris(bipyridyl)Ru(II) and 1.4 mM ammonium persulfate. Aliquots were illuminated with a 150 W incandescent bulb for 5s, as previously described (Abedini *et al.*, 2016). The reaction was quenched by the addition of 1M dithiothreitol (DTT). Oligomers were separated by SDS-PAGE electrophoresis using a 10% Tris-tricine gel and visualized by silver staining.

2.5 Results and discussion

2.5.1 FAsH detects IAPP amyloid fibrils but not prefibrillar species

According to the structural model of IAPP amyloid fibrils inferred from solid-state NMR (Luca *et al.*, 2007), monomers are stacked on each other with the same orientation along the fibril axis. The N-terminal domain, which encompasses two Cys residues at positions 2 and 7 (Figure 2.3A), displays a random coil conformation within these fibrils. This quaternary conformation should allow the formation of a FAsH tetra-Cys binding site by the convergence of Cys-(Xxx)₄-Cys motif of adjacent peptide monomers (Figure 2.2). To initially validate that the FAsH biarsenical probe specifically binds to this non-contiguous tetra-Cys motif, amyloid fibrils were prepared by incubating monomerized IAPP (50 μ M, pH 7.4) for 24 h under quiescent conditions at room temperature. FAsH binds to IAPP amyloid fibrils in presence of 125 μ M of the thiol competitor 2,3-dimercapto-1-propanol (British Anti Lewisite (BAL)), as reflected by the amplification of fluorescence intensity signal (Figure 2.3B). To confirm that the increase of FAsH fluorescence is not simply associated with a change of its surrounding environment, *i.e.* binding to the amyloid hydrophobic core, an IAPP analog in which both Cys were substituted by Ser was prepared (S2S7; Figure 2.3A). It was reported that the Cys-to-Ala substitution does not alter amyloid morphology and fibrillization kinetics (Jayasinghe et Langen, 2004). In the present study, replacement of Cys by Ser was preferred to preserve similar physicochemical properties. As shown by transmission electron microscopy (TEM), S2S7 amyloid fibrils have similar morphology as WT IAPP fibrils (Figure 2.3D, E) and are ThT positive (Figure 2.4). The β -sheet secondary structure of amyloids was validated by circular dichroism (CD) spectroscopy (Figure 2.3C). In the presence of S2S7 IAPP fibrils, no increase of fluorescence intensity was monitored (Figure 2.3B), confirming that FAsH fluorescence observed for WT IAPP fibrils is associated with a tetra-Cys binding motif formed upon amyloid assembly.

We next evaluated if IAPP prefibrillar species form a non-contiguous tetra-Cys motif, allowing FAsH recognition upon oligomerization. Prefibrillar species were assembled by incubating IAPP (50 μ M, pH 7.4) for 30 min. As observed by CD spectroscopy, these prefibrillar species displayed a random coil conformation (Figure 2.3C). By Photo-Induced Cross-Linking of Unmodified Proteins (PICUP) (Bitan *et al.*, 2001), we determined that these prefibrillar species include different oligomers, ranging from dimer to hexamer (Figure 2.5). As revealed by dynamic light scattering (DLS), incubation of IAPP for 30 min led to the formation of a somewhat heterogeneous mixture of small particles with hydrodynamic radius ranging between 1.5 to 30 nm (Figure 2.3F, Figure 2.6). In contrast, particles of over 1000 nm hydrodynamic diameter were detected after 24 h incubation, *i.e.* amyloid fibrils. Moreover, by atomic force microscopy (AFM), no fibrillary assemblies were observed and spherical aggregates could be detected for the IAPP sample incubated for 30 min (Figure 2.3G). Finally, these unstructured prefibrillar species were ThT negative (Figure 2.13). When the FAsH fluorogenic probe was incubated with these prefibrillar assemblies, no fluorescence signal was measured (Figure 2.3B). This result is somewhat surprising considering the recent work of Wang *et al.* reporting that WT IAPP prefibrillar species form a tetra-Cys binding motif and induce an increase of FAsH fluorescence (Wang *et al.*, 2017). However, the absence of a thiolic competitor (BAL) in this previous study most likely led to the binding of FAsH molecule to two separate monomeric units carrying a Cys-Cys motif, resulting in a low-specificity increase of fluorescence. The use of BAL in the present study confirms that the FAsH fluorescence amplification observed in presence of IAPP amyloid fibrils is specifically due to the formation of a stable and well-defined tetra-Cys motif (Hoffmann *et al.*, 2010; Krishnan et Gierasch, 2008). Taken together, these results indicate that the non-contiguous tetra-Cys motif formed upon amyloid formation allows the detection of amyloid assemblies by FAsH, whereas prefibrillar proteospecies do not encompass any stable FAsH recognition site involving residues Cys-2 and Cys-7.

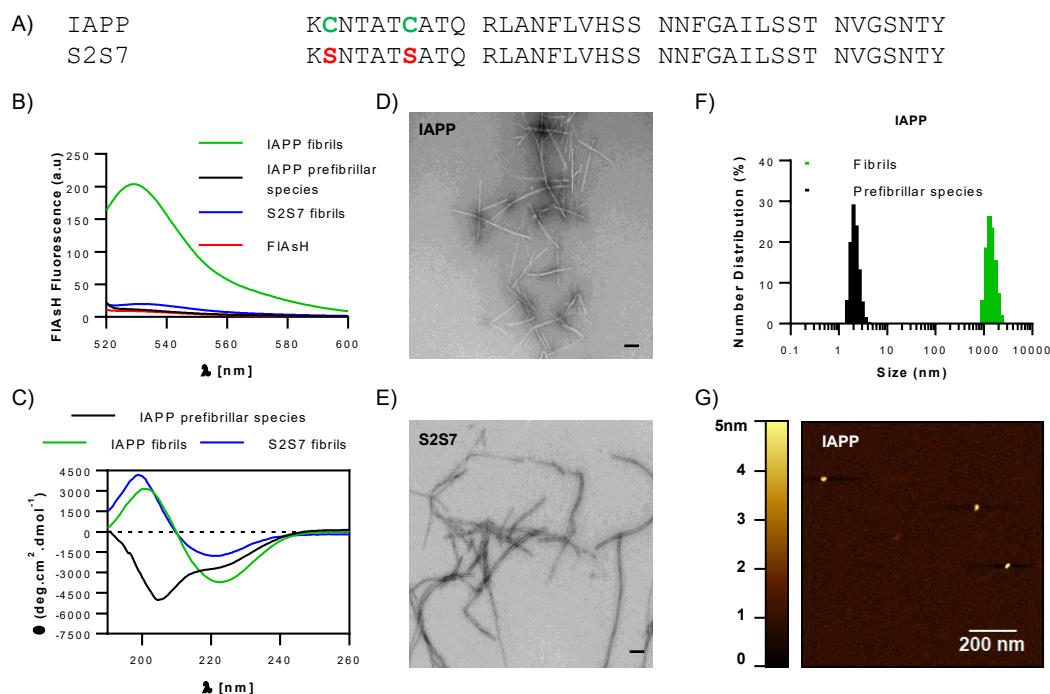


Figure 2.3. Detection of IAPP amyloid fibrils by FIAsh. A) Sequence of IAPP and S2S7 analog. Native Cys residues are indicated in green and non-native Ser are indicated in red. B-G) Peptides were incubated under quiescent conditions at 25°C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 50 μ M for 30 min and 24 h referred as prefibrillar species and fibrils, respectively. B) FIAsh (0.5 μ M), TCEP (500 μ M) and BAL (125 μ M) were added to prefibrillar species or fibrils and emission fluorescence spectra were recorded after excitation at 508 nm. C) Far-UV CD spectra of IAPP prefibrillar species, fibrils and S2S7 fibrils. D, E) Representative TEM images of IAPP and S2S7 amyloid fibrils. Scale bar is 100 nm. F) Dynamic light scattering analysis of IAPP prefibrillar species and fibrils. G) Representative AFM images of IAPP prefibrillar species.

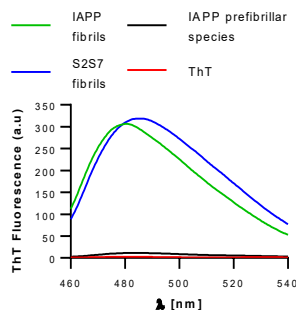


Figure 2.4. S2S7 fibrils are ThT positive. IAPP and S2S7 derivative were incubated under quiescent conditions at 25°C in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at 50 μ M in presence of TCEP (500 μ M) and BAL (125 μ M). ThT (10 μ M) was added after 30 min or 24 h of incubation, referred as prefibrillar species and amyloid fibrils respectively. ThT emission fluorescence spectra were recorded after excitation at 440 nm.

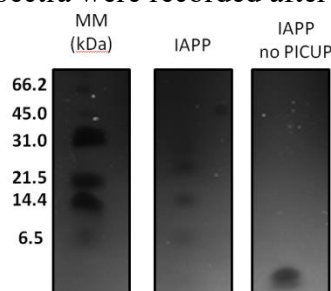


Figure 2.5. SDS-PAGE of photochemically cross-linked IAPP prefibrillar species. IAPP was incubated under quiescent conditions at 25°C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 50 μ M for 30 min before PICUP treatment. 1: Molecular weight marker (MM). 2: IAPP prefibrillar species with PICUP treatment. 3: IAPP prefibrillar species without cross linking.

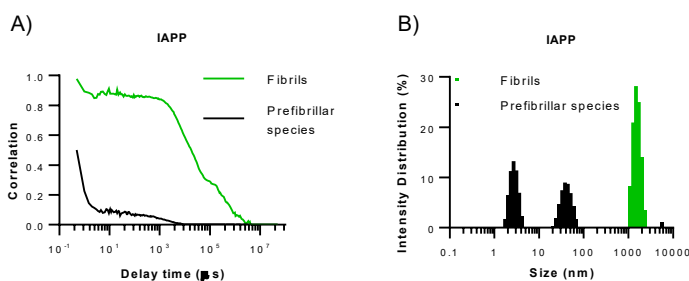


Figure 2.6. Dynamic light scattering analysis of IAPP prefibrillar species and amyloid fibrils. IAPP was solubilized in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) at 50 μ M immediately followed by a filtration through a 0.22 μ m polyvinylidene fluoride (PVDF) filter. The peptide was incubated for 30 min (prefibrillar species) and 24 h (fibrils). A) Correlation. B) Intensity distribution.

2.5.2 Kinetics of IAPP self-assembly with FAsH detection

We then evaluated if the kinetics of self-assembly can be monitored with the FAsH-based approach. Monomerized IAPP was solubilized at 12.5 μM in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) in the presence of BAL and tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) and the fluorescence of ThT or FAsH was measured every 10 min. Strikingly, kinetics of IAPP self-assembly monitored by ThT and FAsH both revealed a sigmoidal growth with three distinctive phases, whereas no FAsH signal was monitored for the S2S7 analog (Figure 2.7). Initially, a lag phase with no fluorescence preceded a rapid increase of fluorescence before reaching a plateau. FAsH fluorescence signal increased immediately after the increase of ThT fluorescence with lag times of 4.3 ± 0.5 h and 3.6 ± 0.3 h, respectively (Figure 2.7A). This result suggests that there is no stable tetra-Cys motif formed during the lag phase of IAPP amyloid formation. This observation is in sharp contrast with the recent work of Wang *et al.* reporting a rapid and constant amplification of FAsH fluorescence after IAPP solubilization (Wang *et al.*, 2017). However, again, their assays were performed in the absence of a thiolic competitor. We reproduced a FAsH-based kinetic assay under the same conditions, *i.e.* IAPP in the presence of TCEP without BAL, and we observed an equivalent rapid increase of fluorescence (Figure 2.8). Accordingly, the increase of FAsH fluorescence during the ThT-lag phase could be associated with FAsH binding to distinct IAPP proteospecies (diffusion), and/or to a poorly defined and unstable tetra-Cys motif. To validate this hypothesis, IAPP was solubilized in 70% hexafluoroisopropanol (HFIP), which is known to abrogate IAPP self-recognition (Yanagi *et al.*, 2011), and FAsH fluorescence was measured over time. Under these conditions, a linear increase of FAsH fluorescence over time was observed in absence of BAL (Figure 2.14). Similarly, FAsH incubation with a short soluble and non-amyloidogenic peptide model in absence of BAL (WCGGPKK, encompassing two Cys residues) also induced a time-dependent increase of fluorescence (Figure 2.8). These results indicate that in

the absence of any thiolic competitor, FAsH binding to non-contiguous tetra-Cys tag can occur even without self-assembly.

It was reported that the removal of the intramolecular disulfide bond does not significantly alter the overall timescale of IAPP fibril formation. This was revealed by using the N-terminally truncated fragment 8-37 and an IAPP derivative with a carboxyamidomethyl unit on Cys-2 and Cys-7 side chains (Koo et Miranker, 2005). In contrast, in the present study, the concurrent substitution of residues Cys-2 and Cys-7 by Ser led to an extension of the lag phase measured by ThT fluorescence (Figure 2.7). This dissimilarity could be ascribed either to the difference in the chemical modifications and/or to the presence of HFIP as co-solvent in the previous study (Koo et Miranker, 2005). It is worth mentioning that the presence of FAsH, which binds covalently up to four Cys side chains, did not affect the kinetics of IAPP fibrillization measured by ThT fluorescence (Figure 2.9). The lower intensity of ThT fluorescence at the end-point is attributed to the Förster resonance energy transfer (FRET) between ThT and FAsH (Figure 2.10) (Lee *et al.*, 2011). Moreover, FAsH had no observable effect on fibril morphology, as revealed by TEM (Figure 2.9). While BAL had no effect on the kinetics of fibrillization, the presence of TCEP in the aggregation mixture accelerated IAPP amyloid formation (Figure 2.11). Although it has recently been reported that reducing environment could accelerate IAPP fibrillization (Rodriguez Camargo *et al.*, 2017), TCEP could also act as a multivalent anion that promotes self-assembly (De Carufel *et al.*, 2013; Nespovitaya *et al.*, 2016). Overall, the kinetic assays revealed that IAPP amyloid formation can be monitored using FAsH, whereas this detection method is insensitive to the formation of oligomers and non-amyloid prefibrillar species assembled from the WT peptide.

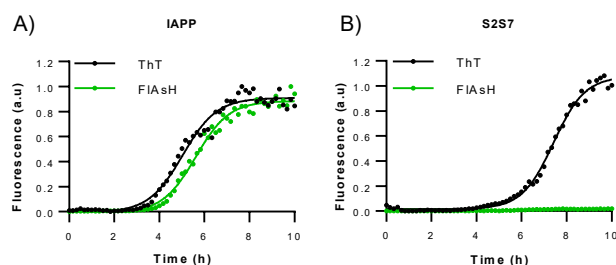


Figure 2.7. Representative kinetics of A) IAPP and B) S2S7 self-assembly monitored by ThT and FIAsh fluorescence. Peptides were incubated at 12.5 μM under quiescent conditions at 25°C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with TCEP (500 μM) and BAL (125 μM). Fluorescence of ThT (10 μM) and FIAsh (0.5 μM) was measured every 10 min with excitation at 440 nm and emission at 485 nm and with excitation at 508 nm and emission at 533 nm, respectively.

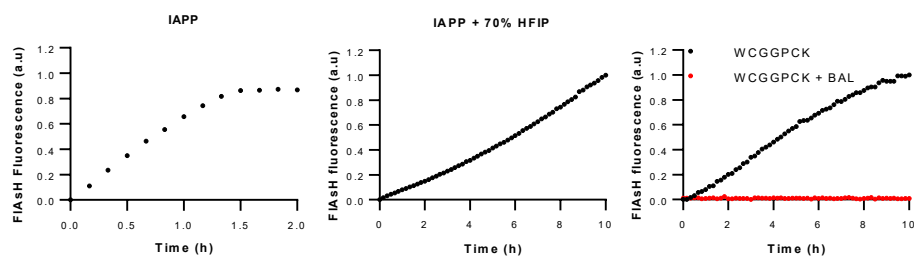


Figure 2.8. FIAsh binding to noncontiguous tetra-Cys tag without self-assembly. A, B) IAPP was incubated at 12.5 μM under quiescent conditions at 25 °C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with A) 500 μM TCEP, B) 500 μM TCEP and 70% hexafluoroisopropanol (HFIP). The fluorescence of FIAsh (0.5 μM) was measured every 10 min with excitation at 508 nm and emission at 533 nm. C) WCGGPCK was incubated at 12.5 μM under quiescent conditions at 25 °C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with 0.5 μM FIAsh, 500 μM TCEP and 125 μM BAL, if indicated. Fluorescence was measured every 10 min with excitation at 508 nm and emission at 533 nm.

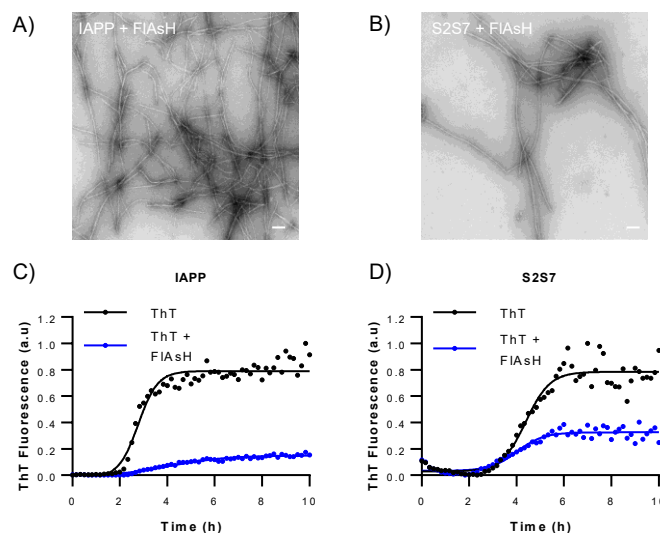


Figure 2.9. IAPP and S2S7 self-assembled in presence of FIAsh. A) IAPP and B) S2S7 were incubated under quiescent conditions at 25°C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 50 μ M in presence of 0.5 μ M FIAsh prior TEM analysis. Scale bar is 100 nm. C, D) Kinetics of self-assembly of IAPP (C) and S2S7 (D) monitored by ThT fluorescence. Peptides were incubated at 12.5 μ M under quiescent conditions at 25 °C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with 0.5 μ M FIAsh, 500 μ M TCEP and 125 μ M BAL. Fluorescence of ThT (10 μ M) was measured every 10 min with excitation at 440 nm and emission at 485 nm.

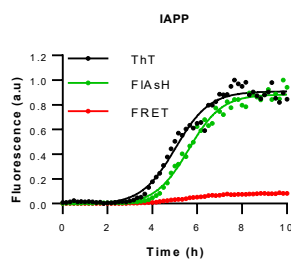


Figure 2.10. Kinetics of IAPP self-assembly monitored by ThT, FIAsh and ThT-to-FIAsh Förster resonance energy transfer (FRET). IAPP was incubated at 12.5 μ M under quiescent conditions at 25 °C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) in presence of 10 μ M ThT and/or 0.5 μ M FIAsh supplemented with 500 μ M TCEP and 125 μ M BAL. ThT, FIAsh or ThT-to-FIAsh fluorescence was measured every 10 min.

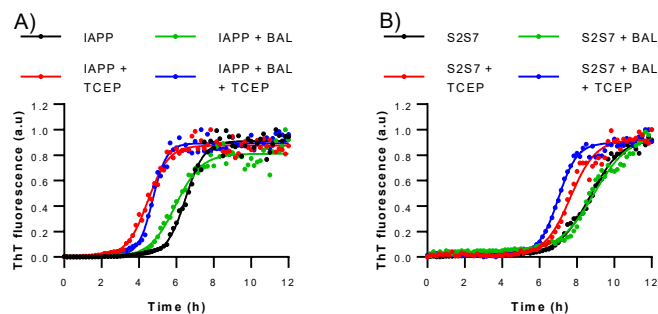


Figure 2.11. Kinetics of A) IAPP and B) S2S7 self-assembly in presence or absence of BAL and/or TCEP monitored by ThT fluorescence. Peptides were incubated at 12.5 μM under quiescent conditions at 25 $^{\circ}\text{C}$ in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with 500 μM TCEP and/or 125 μM BAL as indicated. Fluorescence of ThT (10 μM) was measured every 10 min with excitation at 440 nm and emission at 485 nm.

2.5.3 Cys-Cys motif at the C-terminus allows FIAsh detection of prefibrillar species

The absence of any positive FIAsh signal during the *so-called* lag phase is somewhat surprising considering the fact that we observed the rapid oligomerization of IAPP, as previously reported by numerous studies (Buchanan *et al.*, 2013; Dupuis *et al.*, 2011a; Laghaei *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2014). The absence of a FIAsh signal during the lag phase could be either ascribed to the transient nature of the proteospecies and/or to an unfavorable positioning of Cys-2 and Cys-7 side chain. For efficient protein labelling, the preferred contiguous tetra-Cys sequence is CCPGCC, which results in an optimal geometry for the binding of the two arsenic separated by 5 \AA (Scheck et Schepartz, 2011; Zürn *et al.*, 2010). Such configuration involving Cys-2 and Cys-7 might not be accessible within WT IAPP prefibrillar aggregates. Accordingly, two S2S7 IAPP derivatives in which a Cys-Cys motif was subsequently inserted at the N- and C-terminus were prepared (Figure 2.12A). As their WT counterpart, CC-IAPP and IAPP-CC assembled into a mixture of small particles after 30 min incubation (Figure 2.12B, 2.12C, Figure 2.13). Using AFM, small spherical aggregates were observed (Figure 2.12D, 2.12E). PICUP revealed similar oligomer size distribution for both analogs,

ranging from dimer to hexamer (Figure 2.14). Addition of a Cys-Cys motif at the C- or N-terminus led to the formation of amyloid fibrils with similar morphology (Figure 2.12F, 2.12G). CD spectroscopy revealed that prefibrillar species of both Cys-Cys derivatives displayed a random coil conformation while amyloids were characterized by a β -sheet secondary structure (Figure 2.15). Moreover, amyloids assembled from these two analogs led to an increase of ThT fluorescence similar to WT IAPP fibrils (Figure 2.15). CC-IAPP and IAPP-CC amyloid fibrils allowed the formation of a stable non-contiguous tetra-Cys motif, as observed by FAsH fluorescence intensity (Figure 2.12H, 2.12I). However, ThT-negative prefibrillar species of IAPP-CC led to a significant increase of FAsH fluorescence, in contrast to those assembled from CC-IAPP (Figure 2.12H, 2.12I). This result suggests that in the early steps of IAPP self-assembly, an oligomeric conformation allows the formation of a stable FAsH recognition motif within adjacent C-terminal domains, whereas N-terminal domains are distant in these prefibrillar assemblies.

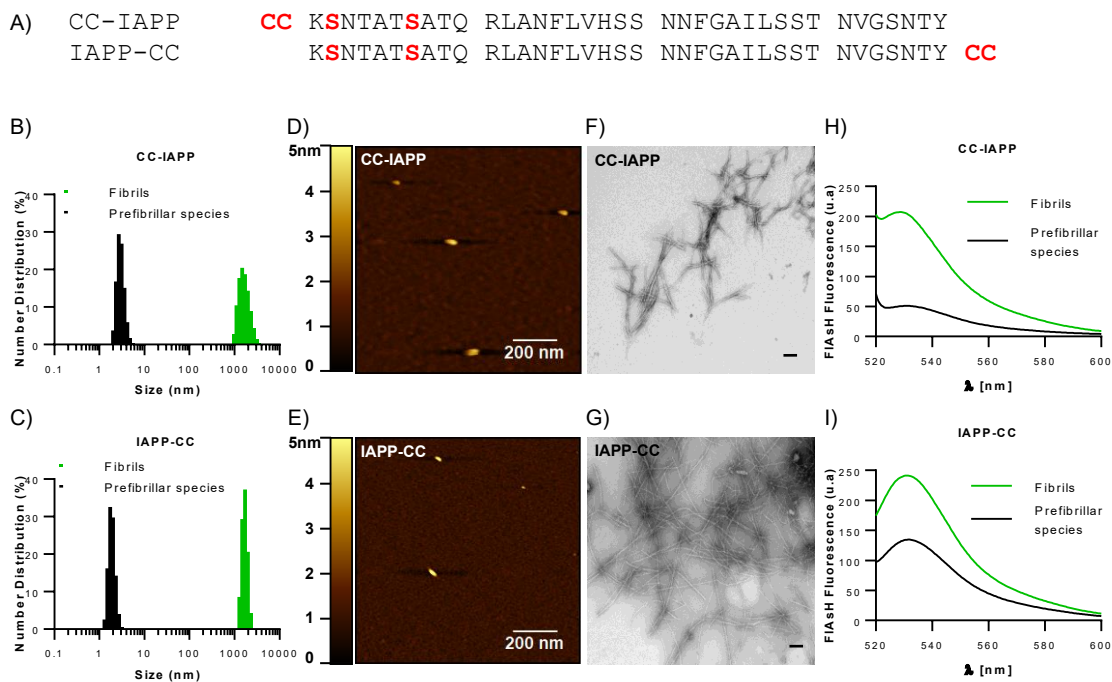


Figure 2.12. Detection of IAPP-CC Prefibrillar Species by FIASH. A) Sequence of IAPP encompassing Cys-Cys motif; non-native residues are indicated in red. B, C) Dynamic light scattering analysis of CC-IAPP and IAPP-CC after 30 min (prefibrillar species) and 24 h incubation (fibrils). D, E) Representative AFM images of CC-IAPP and IAPP-CC prefibrillar species. F, G) Representative TEM images of CC-IAPP and IAPP-CC amyloid fibrils. Scale bar is 100 nm. H, I) Peptides (50 μ M) were incubated for 30 min (prefibrillar species) or for 24 h (fibrils) and FIASH, TCEP and BAL were added. Emission fluorescence spectra were recorded with an excitation at 508 nm.

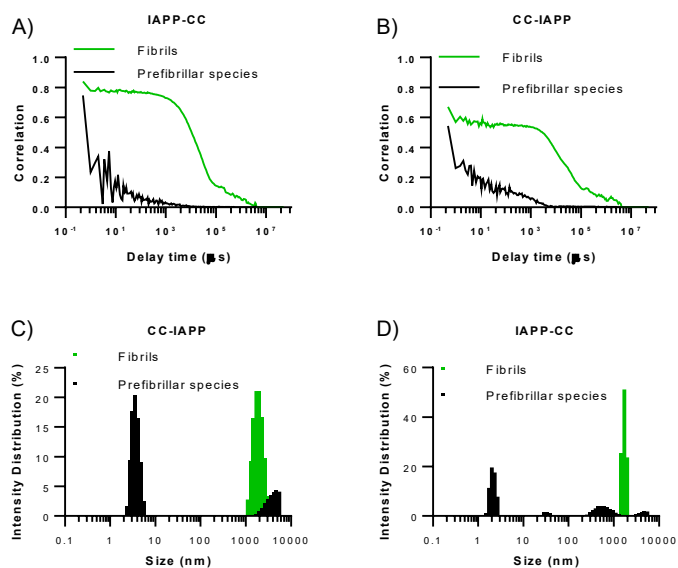


Figure 2.13. Dynamic light scattering analysis. CC-IAPP and IAPP-CC were solubilized in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) at 50 μ M followed by a filtration through a 0.22 μ m polyvinylidene fluoride (PVDF) filter. CC-IAPP and IAPP-CC were incubated for 30 min (prefibrillar species) and 24 h (amyloid fibrils) before DLS measurements. A, B) Correlation. C, D) Intensity distribution.

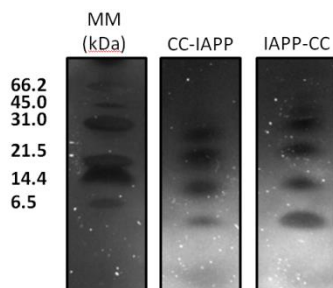


Figure 2.14. SDS-PAGE of CC-IAPP and IAPP-CC prefibrillar species photochemically cross-linked. Both analogs were incubated under quiescent conditions at 25°C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 50 μ M for 30 min prior to cross-linking. 1: Molecular weight marker (MM: kDaltons). 2: CC-IAPP cross-linked prefibrillar species. 3: IAPP-CC cross-linked prefibrillar species.

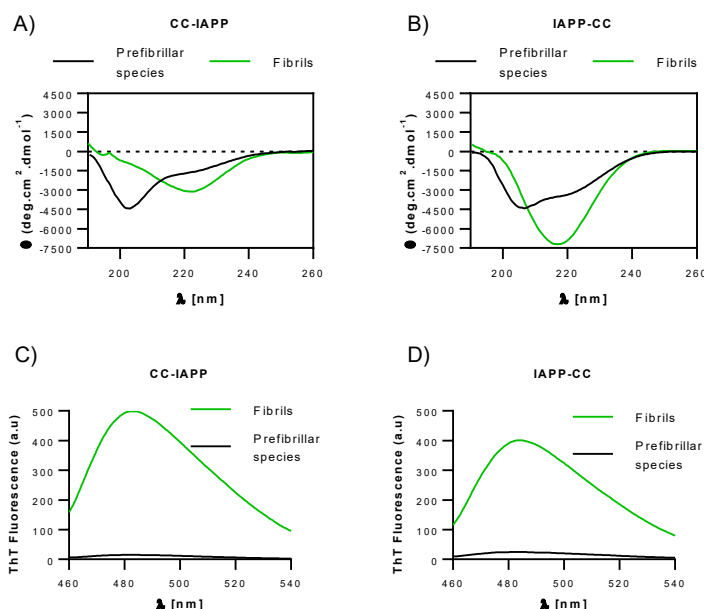


Figure 2.15. CC-IAPP and IAPP-CC fibrils display a characteristic β -sheet secondary structure and are ThT positives. Peptides were incubated under quiescent conditions at 25°C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at a final concentration of 50 μ M. A, B) Far-UV CD spectra were collected after 30 min (prefibrillar species) and 24 h (amyloid fibrils). C, D) ThT (10 μ M), TCEP (500 μ M) and BAL (125 μ M) were added after 30 min or 24 h of incubation. Emission fluorescence spectra were recorded after an excitation at 440 nm.

2.5.4 IAPP oligomerization can be monitored by introducing a Cys-Cys motif at the C-terminus

We next evaluated if the self-assembly of Cys-Cys analogs can be monitored using FIAsh detection. As noticed in Figure 2.16A, the IAPP derivative containing a Cys-Cys tag at the N-terminus (CC-IAPP) showed a sigmoidal growth in both the ThT and the FIAsh kinetic assays, as observed for WT IAPP. In contrast, by detecting the self-assembly of IAPP-CC using FIAsh, a biphasic growth characterized by a rapid increase of fluorescence was observed. ThT detection revealed a standard sigmoidal growth curve (Figure 2.16B). Particularly, the second increase of FIAsh signal closely coincided with the end of the ThT-lag phase (Figure 2.16B). It is worth mentioning

that, as observed for WT IAPP, BAL and FIAsh did not affect the kinetics of fibrillization of both CC analogs whereas TCEP accelerated amyloid formation, as revealed by ThT (Figure 2.17, 2.18). The kinetics of IAPP-CC self-assembly detected by FIAsh validates the rapid oligomerization of IAPP during the so-called lag phase, as previously reported (Dupuis *et al.*, 2009; Dupuis *et al.*, 2011a). The regions implicated in IAPP self-recognition and oligomerization are still the matter of active debates (Chen *et al.*, 2013; Tu *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2011). While many studies have pointed towards initial self-recognition involving the 20-29 segment, our data also suggest that the C-terminal domain of IAPP could be associated with oligomer formation. As exemplified with WT IAPP and CC-IAPP, the N-terminal domains of cognate monomers would be distant within prefibrillar assemblies. Interestingly, the conformational conversion of IAPP-CC oligomers into amyloid fibrils preserves the tetra-Cys motif, which is consistent with the NMR model of amyloid fibrils (Luca *et al.*, 2007). The mechanism of IAPP self-assembly has often been described as a nucleated polymerisation. However, similar to what has been proposed for A β ₍₁₋₄₀₎ peptide, it also responds to some characteristics of a nucleated conformational conversion (Kayed *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2011).

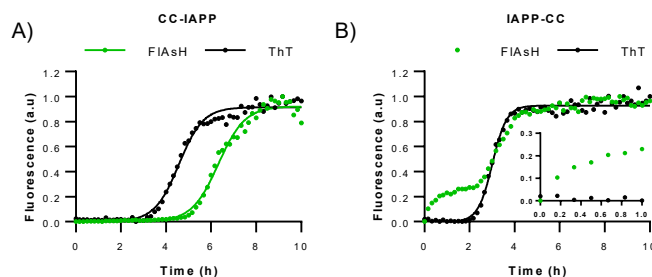


Figure 2.16. Representative kinetics of self-assembly of A) CC-IAPP and B) IAPP-CC monitored by ThT and FIAsh fluorescence. Peptides were incubated at 12.5 μ M under quiescent conditions in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with TCEP (500 μ M) and BAL (125 μ M). Fluorescence of ThT (10 μ M) and FIAsh (0.5 μ M) was measured every 10 min.

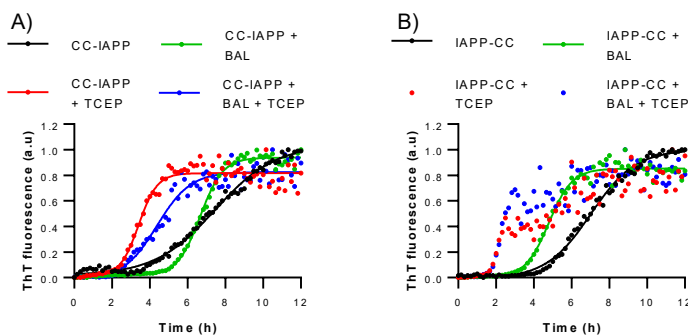


Figure 2.17. Kinetics of A) CC-IAPP and B) IAPP-CC self-assembly in presence or absence of BAL and/or TCEP monitored by ThT fluorescence. Peptides were incubated at $12.5 \mu\text{M}$ under quiescent conditions at 25°C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with $500 \mu\text{M}$ TCEP and/or $0.125 \mu\text{M}$ BAL, as indicated. ThT fluorescence was measured every 10 min with excitation at 440 nm and emission at 485 nm .

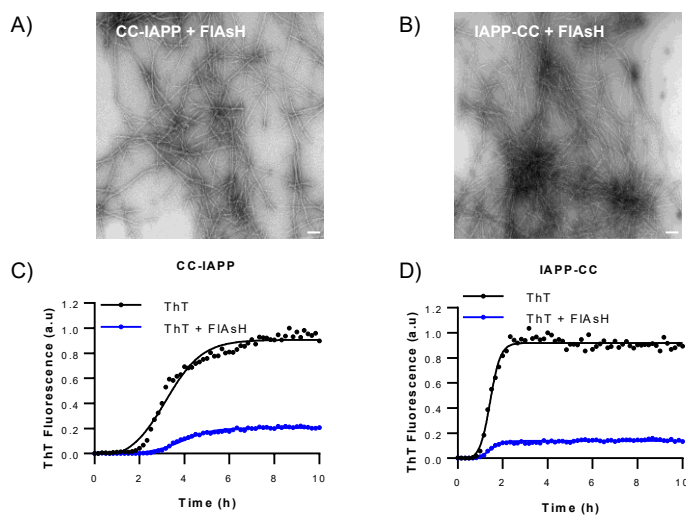


Figure 2.18. CC-IAPP and IAPP-CC self-assembled in presence of FIAsh. A) CC-IAPP and B) IAPP-CC were incubated under quiescent conditions at 25°C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at $50 \mu\text{M}$ in presence of $0.5 \mu\text{M}$ FIAsh prior to TEM analysis. Scale bar is 100 nm . C, D) Kinetics of CC-IAPP (C) and IAPP-CC (D) self-assembly monitored by ThT fluorescence. Peptides were incubated at $12.5 \mu\text{M}$ under quiescent conditions at 25°C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with $0.5 \mu\text{M}$ FIAsh, $500 \mu\text{M}$ TCEP and $125 \mu\text{M}$ BAL. Fluorescence of ThT ($10 \mu\text{M}$) was measured every 10 min with excitation at 440 nm and emission at 485 nm .

2.5.5 Stability of the tetra-Cys motif within prefibrillar species

Taking advantage of the fact that BAL competes with tetra-Cys tag for FAsH binding (Zürn *et al.*, 2010), the stability of the non-contiguous tetra-Cys motifs formed during oligomerization was evaluated using a competition experiment. Prefibrillar species were assembled under the same conditions of the kinetic assays for 1 h in the presence of increasing BAL concentrations and fluorescence signals were measured (Figure 2.19A, B, C). To obtain competition curves, FAsH emission at 533 nm of each scan was normalized to the fluorescence obtained in the presence of the lowest BAL concentration (0.1 μM). Using a nonlinear least-square regression, apparent IC_{50} values (*i.e.* concentration of BAL needed to displace 50% of FAsH fluorescence) were obtained, reflecting the affinity of FAsH to the corresponding non-contiguous tetra-Cys motif. It is important to mention that a high IC_{50} value of BAL reflects a high stability of the FAsH-recognition motif. Interestingly, prefibrillar assemblies from IAPP-CC exhibited a competition curve with two phases and two different IC_{50} could be extrapolated; 10.7 μM and 6.3 mM of BAL (Figure 2.19D). This competition curve suggests the presence of two, or more, populations of prefibrillar species with different stability of their tetra-Cys motif. WT IAPP and CC-IAPP displayed a competition curve with comparable IC_{50} values of 1.5 μM and 6.9 μM of BAL, respectively. This indicates the formation of a low stability tetra-Cys motif within these non-amyloid proteospecies. As a negative control and to evaluate the contribution of peptide diffusion under these conditions, we used the peptide WCGGPK, which encompasses two Cys in an appropriate FAsH-binding geometry. In the absence of BAL, this peptide induces a time-dependent increase of FAsH fluorescence (Figure 2.20). Using the competition assay, we determined that the WCGGPK peptide displays an IC_{50} of 0.15 μM BAL (Figure 2.20). Accordingly, the non-contiguous tetra-Cys FAsH-binding motif of WT IAPP and CC-IAPP prefibrillar species is not simply due to peptide diffusion, but most likely reflects the fact that in IAPP oligomeric quaternary conformation, the N-terminal domain of adjacent monomeric peptides remains distant.

Overall, these competition curves indicate that the C-terminal domains of neighbouring IAPP are in close contact in the initial phase of self-recognition, as previously suggested (Cheng *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2014).

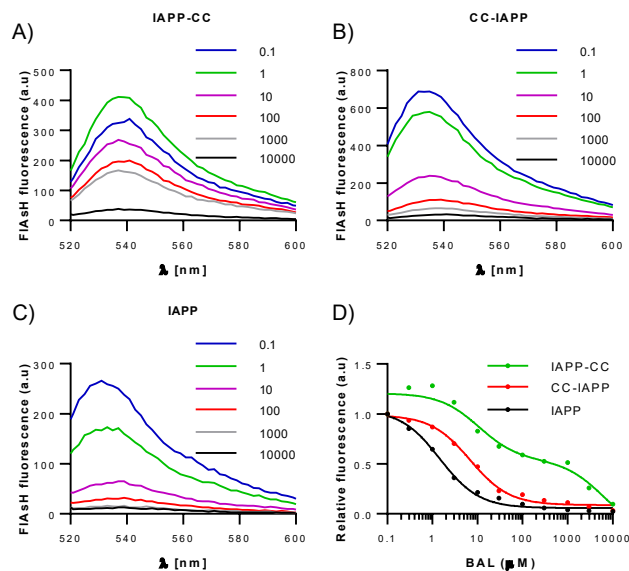


Figure 2.19. Competition assay for FIAsh binding. A, B, C) Prefibrillar species were assembled by incubating the peptide at 12.5 μM under quiescent conditions at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) in presence of 500 μM TCEP, 0.5 μM FIAsh and increasing BAL concentrations (μM). Emission fluorescence spectra were recorded after excitation at 508 nm. D) Decrease of FIAsh binding by increasing BAL concentrations.

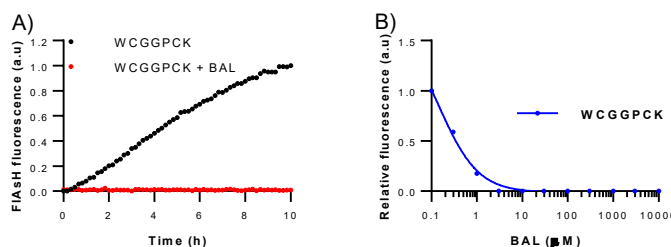


Figure 2.20. Competition assay for FIAsh binding with WCGGPCK. A) WCGGPCK was incubated at 12.5 μM under quiescent conditions at 25 $^{\circ}\text{C}$ in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with 0.5 μM FIAsh, 500 μM TCEP and in presence of 125 μM of BAL, if indicated. Fluorescence was measured every 10 min with excitation at 508 nm and emission at 533 nm. B) WCGGPCK was incubated at 12.5 μM under quiescent conditions at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with 0.5 μM FIAsh, 500 μM TCEP and increasing BAL concentrations. Emission fluorescence spectra from 520 to 600 nm were recorded after an excitation at 508 nm. The maximum emission at 533 nm was used to determine the relative fluorescence, i.e. with a ratio between each spectrum and fluorescence intensity in presence of the lowest BAL concentration.

2.5.6 FIAsh detection of oligomers assembled from the non-amyloidogenic rodent IAPP

Rodent IAPP (rIAPP), which encompasses 3 Pro residues within the 20-29 segment (Figure 2.21A), is known to be poorly amyloidogenic (Akter *et al.*, 2016; Nishi *et al.*, 1989; Westermark *et al.*, 2011; Westermark *et al.*, 1990). Nonetheless, rIAPP has been shown to form oligomers with a similar size distribution to human IAPP, ranging from dimer to hexamer (Abedini *et al.*, 2016; Young *et al.*, 2014). To evaluate if rIAPP oligomerization can be detected with FIAsh, two derivatives in which a non-native Cys-Cys motif was successively introduced at the N- and C-terminus were prepared (Figure 2.21A). Upon incubation for 24 h at 50 μM , no ThT signal was measured for rIAPP and its CC-motif derivatives (Figure 2.21B). Proteospecies generated from rIAPP-CC after 24 h incubation led to the formation of a FIAsh binding motif, as revealed by the increase of fluorescence (Figure 2.21C). In contrast, when the Cys-Cys motif is located within the N-terminal domain (rIAPP, CC-rIAPP), no significant

increase of FAsH fluorescence could be measured. By AFM and DLS, small spherical aggregates were detected for all three rIAPP derivatives, as exemplified with rIAPP-CC (Figure 2.21D, Figure 2.22). Strikingly, monitoring the kinetics of self-assembly with FAsH detection revealed an increase of FAsH fluorescence overtime for rIAPP-CC, while in the case of WT rIAPP and CC-rIAPP, no FAsH signal was detected. Kinetic assays were performed in presence of the thiolic competitor BAL, since its absence can lead to an increase of FAsH fluorescence not necessarily related to the formation of stable tetra-Cys binding sites (Figure 2.8, Figure 2.23). The increase of FAsH fluorescence observed for rIAPP-CC in the first 2 hours of self-assembly was similar to the one recorded for human IAPP-CC, whereas rIAPP-CC did not show the second phase associated with amyloid fibril formation (Figure 2.21D). These results indicate that the C-terminal domains are in close contact within rIAPP oligomeric assemblies, as observed for human IAPP. By positional scanning of the Cys-Cys motif, the FAsH detection method appears as an appropriate strategy to observe the oligomerization of poorly amyloidogenic peptides.

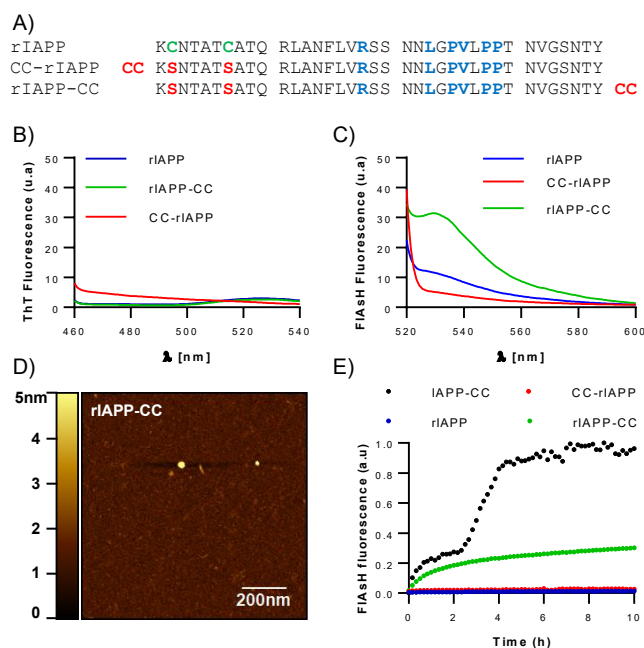


Figure 2.21. FIAsH detection of rIAPP oligomers. A) Sequence of rIAPP and derivatives. Native Cys are indicated in green, non-native residues are in red and residues that differ from human IAPP are in blue. B, C) Peptides were incubated at 12.5 μ M for 24 h and ThT (B) or FIAsH (C) fluorescence was measured. D) Representative AFM images of rIAPP-CC incubated for 24 h. E) Peptides were incubated at 12.5 μ M under quiescent conditions in presence of FIAsH (0.5 μ M), TCEP (500 μ M) and BAL (125 μ M). Fluorescence was measured every 10 min with excitation at 508 nm and emission at 533 nm.

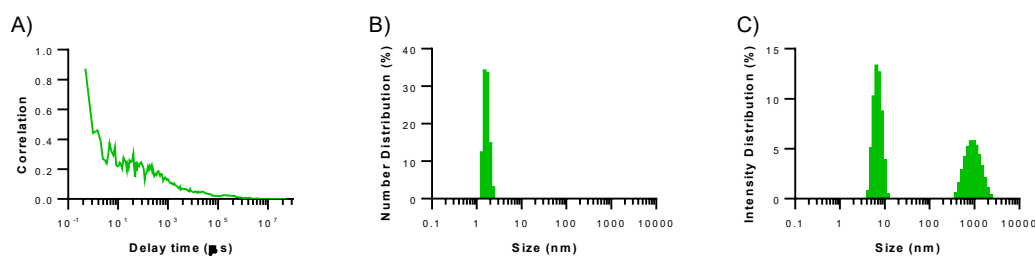


Figure 2.22. Dynamic light scattering analysis. rIAPP-CC was solubilized in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) at 50 μ M followed by a filtration through a 0.22 μ m polyvinylidene fluoride (PVDF) filter. rIAPP-CC was incubated for 24 h preceding measurements. A) Number distribution. B) Intensity distribution. C) Correlation.

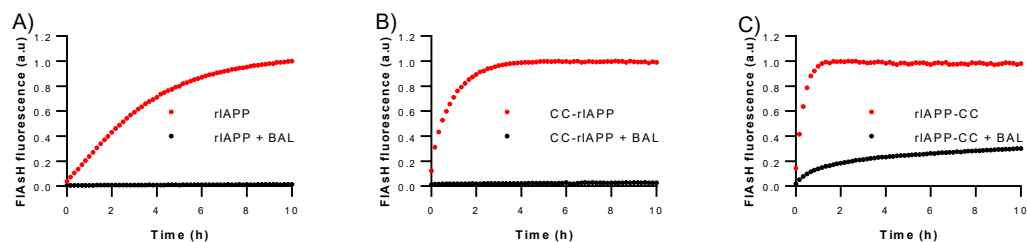


Figure 2.23. A) rIAPP, B) CC-rIAPP and C) rIAPP-CC were incubated at 12.5 μ M under quiescent conditions at 25°C in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with 0.5 μ M FIAsh, 500 μ M TCEP and 125 μ M BAL, if indicated. Fluorescence was measured every 10 min with excitation at 508 nm and emission at 533 nm.

2.5.7 Detection of ThT-negative amyloid fibrils with FIAsh

It was recently reported that IAPP sequence from the puffer fish (pIAPP; Figure 2.24A) can self-assemble into amyloid fibrils, although these fibrils are ThT-negative (Wong *et al.*, 2016). This previous study highlights limitations of ThT for the detection of amyloid fibrils. Accordingly, we probed if the amyloid self-assembly of pIAPP could be monitored using the FIAsh detection method. Monomerized CC-pIAPP was incubated at 50 μ M for 24 h and no significant increase of ThT fluorescence was measured (Figure 2.24B), despite the formation of β -sheet amyloid fibrils observed by TEM (Figure 2.24D) and CD spectroscopy (Figure 2.25). In sharp contrast, FIAsh binding to the N-terminal non-contiguous tetra-Cys motif formed upon pIAPP self-assembly allowed the detection of amyloid fibrils (Figure 2.24C). Moreover, a FIAsh-based kinetic assay revealed a sigmoidal growth curve similar to human IAPP whereas ThT signal remained negative (Figure 2.24E). Accordingly, the FIAsh detection constitutes a relevant alternative strategy to monitor amyloid formation from ThT-insensitive assemblies.

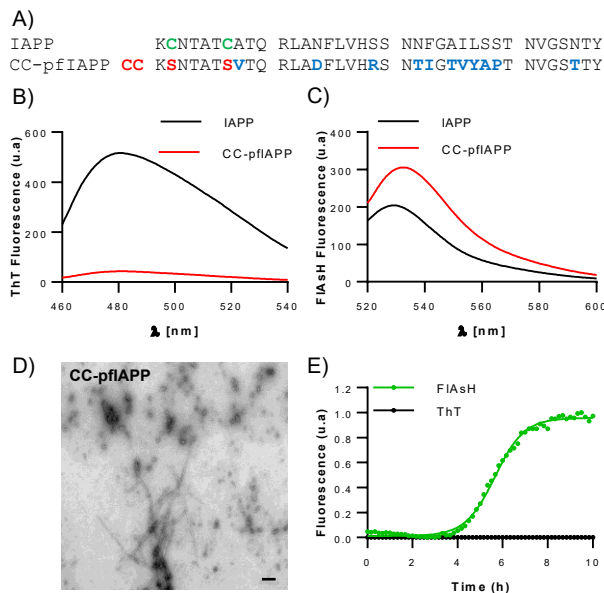


Figure 2.24. FlAsH detection of ThT negative pflAPP fibrils A) Sequence of IAPP and pflAPP. Native Cys are in green, non-native residues are in red and residues that differ from human IAPP are in blue. B, C) Peptides were incubated at $12.5 \mu\text{M}$ for 24 h. and ThT (B) and FlAsH (C) fluorescence spectra were collected. D) TEM analysis of CC-pflAPP. Scale bar is 100 nm. E) CC-pflAPP was incubated at $12.5 \mu\text{M}$ under quiescent conditions in presence of ThT ($10 \mu\text{M}$) or FlAsH ($0.5 \mu\text{M}$). Fluorescence of ThT (Ex 440 nm, Em 485 nm) or FlAsH (Ex 508 nm, Em 533 nm) was measured every 10 min.

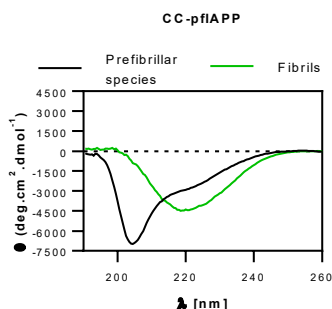


Figure 2.25. CD spectra of CC-pflAPP prefibrillar species and fibrils. CC-pflAPP was incubated under quiescent conditions at 25°C in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 at a concentration of $50 \mu\text{M}$. Far-UV CD spectra were recorded after 30 min (prefibrillar species) and 24 h (fibrils) incubation.

2.5.8 Monitoring self-assembly with FAsH detection in presence of biological co-factors and inhibitors

Considering that amyloid assembly of WT IAPP can be monitored with FAsH, we next investigated if this detection method is appropriate to evaluate the effects of co-factors and inhibitors. It is known that IAPP self-assembly is modulated by numerous biological co-factors, such as lipids and glycosaminoglycans (GAGs), which are both closely associated with amyloid fibrils extracted from patients (Cao *et al.*, 2013a; De Carufel *et al.*, 2013; Jha *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2015). By using large unilamellar vesicles (LUVs) composed of phosphocholine/phosphoglycerol (DOPC:DOPG; 7:3 molar ratio) as membrane model, we showed that FAsH detection revealed the acceleration of IAPP self-assembly induced by LUVs similar to ThT fluorescence (Figure 2.26A). Moreover, the effect of low molecular weight heparin (*i.e.* dalteparin), which is known to accelerate IAPP fibrillization (Jha *et al.*, 2011), could be monitored using FAsH as a probe (Figure 2.26B). These results indicate that FAsH detection constitutes an appropriate strategy to monitor IAPP amyloid formation in presence of biological co-factors without any modifications of IAPP primary structure. Ultimately, the FAsH probe, which binds specifically to tetra-Cys motif, could constitute an interesting alternative to the low-specific ThT dye (Hong *et al.*, 2012) for the detection of IAPP amyloid fibrils in biological samples.

The interaction of exogenous compounds with ThT signal can lead to false positive hits when screening for amyloid inhibitors (Hudson *et al.*, 2009). For instance, the polyketide rifampicin was initially demonstrated to inhibit IAPP amyloid formation, according to its capacity to decrease ThT fluorescence (Meier *et al.*, 2006). However, thorough biophysical characterization revealed that, in fact, rifampicin does not prevent IAPP amyloid formation but simply interferes with ThT signal (Meng *et al.*, 2008). In this context, the FAsH detection method appears as a promising alternative strategy to screen and validate putative amyloid inhibitors such as rifampicin. Kinetic assays were

performed in presence, or absence, of 12.5 μM rifampicin and self-assembly was monitored by ThT and FIAsh fluorescence. As previously reported, by measuring ThT signal rifampicin inhibited IAPP amyloid formation (Figure 2.26C). In contrast, with FIAsh detection, the presence of rifampicin in the aggregation mixture did not change the lag time of IAPP amyloid formation (Figure 2.26C). Next, we evaluated the usage of FIAsh detection to screen amyloid inhibitors to the polyphenol resveratrol, which is known to exert an inhibitory effect on IAPP amyloid formation, although it can also interfere with ThT (Tu *et al.*, 2015). Under the conditions of our assay, we observed that the presence of 12.5 μM resveratrol led to a significant decrease of ThT fluorescence at the plateau (Figure 2.26D). By sharp contrast, using FIAsh as a probe, kinetics of IAPP fibrillization in presence and absence of resveratrol were virtually identical (Figure 2.26D). Overall, FIAsh detection appears as a promising alternative method to ThT fluorescence to evaluate the efficacy of amyloid inhibitors and their mechanisms of action.

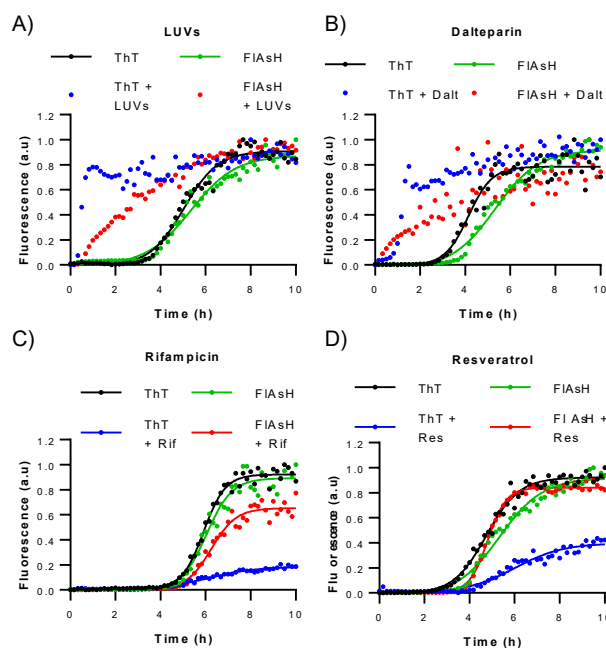


Figure 2.26. Kinetics of IAPP self-assembly monitored by ThT and FIAsh detection. IAPP was incubated at 12.5 μM under quiescent conditions in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented, or not, with A) 500 μM LUVs, B) 1.25 μM dalteparine (Dalt), C) 12.5 μM rifampicin (Rif) and D) 12.5 μM resveratrol (Res). ThT (10 μM) and FIAsh (0.5 μM) fluorescence was measured every 10 min.

2.6 Conclusion

In this study, we extended the use of the fluorogenic probe FAsH to study the kinetics of IAPP self-assembly and to obtain conformational insights of prefibrillar species. By incorporating a Cys-Cys motif at varying positions within the sequence, peptide self-recognition can be monitored by FAsH fluorescence upon the formation of a non-contiguous tetra-Cys binding motif. We observed that a Cys-Cys motif located in IAPP N-terminal domain enables the detection of amyloid fibrils, whereas oligomer formation can be monitored with the incorporation of a Cys-Cys tag at the C-terminus. Furthermore, the stability of the tetra-Cys FAsH-recognition site assembled from adjacent peptides revealed that the C-terminal domains are in close proximity during the early steps of oligomerization. The transition of IAPP through stable oligomers along the amyloidogenic pathway suggests that IAPP self-assembles via a nucleated conformational conversion mechanism where oligomers are converted into amyloid protofilaments. Moreover, we showed that FAsH detection method can be used in presence of biological co-factors known to accelerate IAPP self-assembly. Finally, we reported that the specific interaction between FAsH and the tetra-Cys motif constitutes a promising alternative to ThT fluorescence to monitor amyloid formation and to evaluate amyloid inhibitors that are known to interfere with ThT signal. In summary, by combining the FAsH detection method with positional scanning of Cys-Cys motif, we obtained unique time-dependent conformational insights along the amyloidogenic cascade. This strategy could now be applied to numerous amyloidogenic polypeptides associated with protein misfolding diseases, including A β peptide, α -synuclein and calcitonin.

2.7 Acknowledgments

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (418614) and the Fonds de Recherche du Québec-Nature et technologies (180394).

CHAPITRE III

ARTICLE II

CELL SURFACE GLYCOSAMINOGLYCANS EXACERBATE PLASMA
MEMBRANE PERTURBATION INDUCED BY THE ISLET AMYLOID
POLYPEPTIDE

Noé Quittot, Mathilde Fortier, Phuong Trang Nguyen, Mathew Sebastiao and Steve
Bourgault*

Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale
Centre-Ville, Montréal, H3C 3P8, Canada
Center of Excellence in Orphan Disease Research – Courtois Foundation, CERMO-
FC
Quebec Network for Research on Protein Function, Engineering and Applications,
PROTEO

Soumis à The FASEB Journal, 31 juillet 2020

Contribution des auteurs:

Noé Quittot: Conception du projet, exécution des expériences (essais cellulaires, microscopie confocale, cytométrie en flux, formation de vésicules géantes de la membrane plasmique, microscopie à force atomique, *Photochemical-Induced Cross-Linking*, spectroscopie, cinétiques d'auto-assemblage ThT et FAsH), analyses des résultats, préparation des figures, rédaction de l'article.

Mathilde Fortier: Exécution des expériences (formation de vésicules géantes de la membrane plasmique, dosage phosphate, spectrofluorimètre, cinétiques d'auto-assemblage ThT et FAsH).

Phuong Trang Nguyen: Exécution des expériences (synthèse et purification de peptides, essais cellulaires).

Mathew Sebastiao: Exécution des expériences (microscopie électronique à transmission).

Steve Bourgault: Supervision du projet, rédaction et correction de l'article.

3.1 Résumé

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des hétéropolysaccharides polyanioniques linéaires, qui sont retrouvés associés avec la majorité des dépôts amyloïdes pathologiques extraits de patients. Les GAGs sulfatés solubles sont reconnus pour leur capacité à favoriser l'auto-assemblage de nombreux polypeptides amyloïdogéniques *in vitro* et à moduler leur cytotoxicité. Bien que les GAGs soient abondants à la surface externe de la membrane plasmique sous forme de protéoglycanes, leur contribution à la perturbation des bicouches lipidiques induite par les polypeptides amyloïdogéniques demeure inconnue. Dans cette étude, nous avons élucidé les rôles des GAGs dans la cytotoxicité et la perturbation de la membrane plasmique induites par l'*islet amyloid polypeptide* (IAPP), dont le dépôt tissulaire au niveau des îlots pancréatiques est associé au diabète de type II. Des essais cellulaires utilisant des lignées déficientes en GAGs ont révélé que la présence de GAGs exacerbe la cytotoxicité induite par l'IAPP et la perméabilisation de la membrane plasmique. Des analyses de microscopie confocale et de cytométrie en flux ont révélé que la liaison et la séquestration de l'IAPP à la surface cellulaire dépendent de la présence de GAGs et de la prédisposition à l'agrégation du peptide. À l'aide de vésicules géantes de la membrane plasmique, ou GPMV, préparées à partir de cellules déficientes en GAGs, nous avons validé les contributions des protéoglycanes intégrés à la membrane dans le désassemblage membranaire induit par l'IAPP. Enfin, des tests de cinétique de formation de fibres amyloïdes ont révélé que la présence de GAGs sur les GPMV ne module pas l'auto-assemblage *in vitro*, contrairement aux GAGs sulfatés solubles. Dans l'ensemble, cette étude indique que les GAGs augmentent la concentration locale d'IAPP à la surface cellulaire, ce qui favorise la perturbation de la membrane plasmique et la mort cellulaire sous-adjacente.

3.2 Abstract

Glycosaminoglycans (GAGs) are long and unbranched anionic heteropolysaccharides that have been associated with virtually all amyloid deposits. Soluble sulfated GAGs are known for their propensity to promote the self-assembly of numerous amyloidogenic proteins and to modulate their cytotoxicity. Nonetheless, although GAGs are prevalent on the outer leaflet of eukaryotic cell plasma membrane as part of proteoglycans, their contributions in the perturbation of lipid bilayer induced by amyloid polypeptides remain unknown. Herein, we investigate the roles of GAGs in the cytotoxicity and plasma membrane perturbation induced by the islet amyloid polypeptide (IAPP), whose deposition in the pancreatic islets is associated with type II diabetes. Cellular assays using GAG-deficient cells reveal that GAGs exacerbate IAPP-induced cytotoxicity and permeabilization of the plasma membrane. Confocal microscopy and flow cytometry analyses show that IAPP binding and sequestration at the cell surface are dependent of GAGs and of the aggregation propensity of the peptide. Using giant plasma membrane vesicles (GPMVs) prepared from GAG-deficient cells, we validate the contributions of membrane-embedded proteoglycans in IAPP-induced membrane disassembly. In sharp contrast to soluble sulfated GAGs, kinetics of amyloid self-assembly expose that the presence of GAGs on GPMVs does not significantly modulate amyloid formation. Overall, this study indicates that cell surface GAGs increase the local concentration of IAPP in the vicinity of the plasma membrane, promoting lipid bilayer perturbation and cell death.

3.3 Introduction

The extracellular deposition and tissue accumulation of amyloid fibrils are the hallmark of numerous diseases such as the Alzheimer's disease, familial amyloid polyneuropathy and type II diabetes (T2D) (Chiti et Dobson, 2017). In the vast majority of individuals afflicted with T2D, amyloid deposits mainly composed of a 37-residue peptide hormone, known as the islet amyloid polypeptide (IAPP) or amylin, are observed in the pancreatic islets (Cooper *et al.*, 1987; Westermark *et al.*, 1987). IAPP is co-secreted with insulin by pancreatic β -cells and acts as a glucomodulatory hormone inhibiting glucose uptake and glucose-stimulated insulin secretion (Westermark *et al.*, 2011). Under pathophysiological conditions associated with T2D, IAPP self-assembles into amyloid fibrils, which are ordered protein aggregates characterized by a cross- β -sheet quaternary structure (Luca *et al.*, 2007). A strong correlation is observed between the accumulation of insoluble islet amyloid deposits and the severity and duration of T2D (Jurgens *et al.*, 2011; Lorenzo *et al.*, 1994). This close association of amyloid deposits with pancreatic tissue degeneration as well as early *in vitro* studies have initially led to the postulate that IAPP fibrils directly cause β -cell death (Jurgens *et al.*, 2011; Krotee *et al.*, 2017; Lorenzo *et al.*, 1994). However, most recent studies have reported that prefibrillar intermediates assembled along the amyloidogenic cascade and/or off-pathway oligomers, are the most proteotoxic species (Abedini *et al.*, 2016; Haataja *et al.*, 2008; Jeong et An, 2015). IAPP amyloidogenesis occurs extracellularly in the heterogeneous environment of pancreatic islets and the resulting amyloid deposits are virtually always associated with different biological components, such as serum amyloid P (Kisilevsky, 2000), lipids (Gellermann *et al.*, 2005) and glycosaminoglycans (GAGs) (Ancsin, 2003). These biological co-factors are known to generally promote amyloid aggregation and to modulate the cytotoxicity of numerous amyloidogenic proteins, including IAPP (Madine, 2019; Nguyen *et al.*, 2015).

GAGs are long and unbranched polyanionic heteropolysaccharides mainly localized in the extracellular matrix (ECM) and at the cell surface, where they can be found either unbound or attached to the protein core of proteoglycans (PGs) (Theocharis *et al.*, 2016). IAPP insoluble pancreatic deposits are found in close association with heparan sulfate (HS), which is the most encountered GAG associated with amyloids (Ancsin, 2003; Papy-Garcia *et al.*, 2011; Young *et al.*, 1992). Biophysical studies have shown that heparin, a highly sulfated derivative of HS, accelerates the amyloid self-assembly of IAPP (Castillo *et al.*, 1998; De Carufel *et al.*, 2013; Jha *et al.*, 2011; Quittot *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2013) and of a large diversity of amyloid-related proteins (Bourgault *et al.*, 2011c; McLaurin *et al.*, 1999; Relini *et al.*, 2008; Sebastiao *et al.*, 2019; Solomon *et al.*, 2011). These studies have revealed that sulfated GAGs hastens amyloid formation by facilitating the formation of competent nuclei and/or by promoting the growth of protofilaments and their subsequent packing into amyloid fibrils (De Carufel *et al.*, 2013; Jha *et al.*, 2011; Quittot *et al.*, 2017). Besides, it has been reported that soluble GAGs play a protective role against the cytotoxicity of amyloidogenic peptides by sequestering toxic oligomers and/or by enhancing the formation of poorly toxic amyloid fibrils (Bergamaschini *et al.*, 2002; Madine et Middleton, 2010; Maiza *et al.*, 2018). Soluble heparin in the tissue culture media protects cells against IAPP-mediated cytotoxicity (De Carufel *et al.*, 2013; Jha *et al.*, 2011). Furthermore, it has been shown that cell surface GAGs modulate IAPP-induced cytotoxicity and that membrane-embedded HSPGs promote the apoptosis mediated by the extracellular treatment of IAPP (Oskarsson *et al.*, 2015; Potter *et al.*, 2015). In addition, the reduction of GAGs content on the outer surface of β -cell correlates with a decrease of amyloid loads in the pancreatic islets and a larger functional β -cell area (Oskarsson *et al.*, 2015; Potter *et al.*, 2015; Templin *et al.*, 2019). These studies indicate that sulfated GAGs promote IAPP amyloid self-assembly and the formation of insoluble tissue deposits, ultimately modulating IAPP toxicity.

Multiple mechanisms have been suggested for IAPP-mediated cytotoxicity, including plasma membrane permeabilization, apoptosis, mitochondrial dysfunction and inflammasome activation (Abedini et Schmidt, 2013; Raleigh *et al.*, 2017). As for other amyloidogenic proteins, plasma membrane disruption is one of the most accepted mechanism, and likely constitutes an upstream event of numerous biochemical events associated with cell death (Brender *et al.*, 2012; Caillon *et al.*, 2016; Engel, 2009). On the one hand, it has been suggested that IAPP monomers and/or oligomers interact with the outer leaflet of the cell membrane, hastening fibril growth and leading to membrane disassembly and permeabilization (Engel *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2004). On the other hand, it has been reported that oligomeric proteospecies initiate membrane disruption by the formation of transmembrane pores (Mirzabekov *et al.*, 1996).

Notwithstanding which precise mechanism of membrane perturbation is involved, these models were inferred mainly from biophysical studies conducted with vesicles assembled with synthetic lipids. Although these membrane models are useful tools as their lipid composition, size and curvature can be fine-tuned easily, they poorly recapitulate the complexity, fluidity and heterogeneity of the plasma membrane of eukaryotic cells. Particularly, these synthetic lipid vesicles lack GAG chains of PGs that play a critical role in IAPP self-assembly and cytotoxicity. Accordingly, the direct contribution of cell surface GAGs in plasma membrane perturbation induced by IAPP and other amyloid-associated polypeptides remains unknown. In this context, by using a combination of cell-based and biophysical assays, we investigated the effects of cell surface GAGs in IAPP-induced toxicity and membrane permeabilization. By means of GAG-deficient cells and derived giant plasma membrane vesicles (GPMVs), we observed that the presence of GAGs on the outer leaflet of the plasma membrane exacerbates IAPP-induced membrane disassembly by contributing to the sequestration of the amyloidogenic peptide at the cell surface.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Peptide Synthesis and sample preparation

Peptides were synthesized on a Rink amide resin by standard Fmoc chemistry, as previously described (Godin *et al.*, 2019). Oxazolidine pseudoproline dipeptide derivatives were incorporated to facilitate the synthesis (Abedini et Raleigh, 2005). For fluorescein labeling, an additional Fmoc-Lys-(Dde)-OH was first coupled at the N-terminus of the peptidyl-resin. After Dde removal with 2% hydrazine, a solution containing fluorescein isothiocyanate (FITC; 3 eq.) and triethylamine (6 eq.) in DMF was added and the mixture reacted overnight. Peptides were cleaved from the solid support with a mixture of trifluoroacetic acid (TFA), ethanedithiol (EDT), phenol and water. Crude peptides were precipitated and washed with diethyl ether, recovered by vacuum filtration, solubilized in distilled water before being lyophilized. Peptides were dissolved in 100% acetic acid and diluted to 35% to be purified by a reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a C18 column using a linear gradient of acetonitrile (ACN) in a H₂O/TFA mixture at (0.06% (v/v)). Collected fractions were analyzed by analytical RP-HPLC using a C₁₈ column and mass-verified by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (ESI-TOF-MS). Fractions corresponding to the desired peptide with a purity of >95% were pooled and lyophilized. Peptides were cyclized with 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) overnight under mild agitation and then diluted to 20% to be purified a second time by RP-HPLC. Aliquots of monomerized IAPP were prepared by dissolving the pure lyophilized peptide in hexafluoro-2-propanol (HFIP) to a concentration of 1 mg/mL. Solution was filtered through a 0.22 µm hydrophilic PVDF filter and sonicated for 20 min before being lyophilized. The resulting peptide powder was solubilized a second time in HFIP to a concentration of 1 mg/ml, sonicated for 20 min and the solution was aliquoted and lyophilized again. Monomerized IAPP samples were kept dried at -20°C until used, but not for longer than 4 weeks.

3.4.2 Cell-based assays

Chinese hamster ovary cells K1 (CHO K1) and CHO pgs-A-745 (deficient in xylosyltransferase (Esko *et al.*, 1985)) were maintained in Ham's F12 media supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and antibiotic antimycotic (10 000 UI/ml penicillin and 10 000 UI/ml streptomycin) referred as complete media. Cells were maintained as a monolayer at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. CHO K1 and CHO pgs-A-745 cells were cultured in black wall clear bottom 96-well plates (tissue culture treated) at the indicated density (100 µL/well) for 48 h before treatment with the peptide. Lyophilized/monomerized IAPP was solubilized in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) and cells were treated with 50 µL of peptide solutions at 3× of the final treated concentration. To form prefibrillar species and amyloid fibrils, peptides were incubated without agitation at 75 µM, 25 °C, for 30 min and 24 h, respectively (Quittot *et al.*, 2018). After 24 h treatment with the peptide solutions (monomers, prefibrillar species, amyloid fibrils) cellular viability was evaluated using the resazurin reduction assay. Cell viability (in %) was calculated from the ratio of the fluorescence of the treated sample to the control (vehicle treated). Release of cellular lactate dehydrogenase (LDH) in the media associated with membrane perturbation was measured using the Pierce™ LDH cytotoxicity kit. Briefly, aliquots of cell culture media were taken and LDH activity was measured using a coupled enzymatic assay resulting in formation of red formazan, which was detected by measuring the absorbance at 490 nm. LDH release (in %) was calculated from the ratio of the absorbance of the treated cell to the positive control, *i.e.* treated with lysis buffer. For both experiments, data of at least four assays (with different peptide lots) performed in triplicates were averaged and expressed as the mean ± S.E.M. Statistical analysis was performed using the Student's t-test and statistical difference (between CHO K1 and CHO pgs-A-745) was established at P < 0.01. For Live/Dead assays, cells were seeded in 12-well plates at density of 30 000 cells/well, for 48 h before treatment. Analyses were performed by the addition of the reagent solution (4 × 10⁻⁶ M ethidium

homodimer-1 and 2×10^{-6} M calcein-AM). After 45 min incubation, plates were imaged using a fluorescent microscope.

3.4.3 Enzymatic digestion of cell surface GAGs

For confocal microscopy imaging, cells were cultured in 8-well cell culture chamber at density of 6 000 cells/well for 48 h before treatment. Cells were incubated with Ham's F12 media supplemented with 1 % FBS, containing 1.7 mUI/mL heparinase III for 1 h, or 24 h, at 37 °C. After incubation, cells were washed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes and washed three times with PBS prior to immunocytochemistry. Fixed cells were blocked using 10 % goat serum diluted in PBS for 1 h. After washing, cells were incubated for 1 h with primary mouse anti-HS antibody, diluted at 1/200 in goat serum 3 % in PBS. Cells were washed and incubated with Alexa-Fluor conjugated secondary goat anti-mouse antibody diluted 1/1000 in 3 % goat serum, for 1 h. For viability assays, cells were cultured in 96-well plate for 48 h before being treated with 1.7 mUI/mL heparinase III and 1 UI/mL chondroitinase ABC, diluted in media supplemented with 1 % FBS, for 1 h at 37 °C. After 1 h incubation, the media was replaced by fresh 1% FBS media containing the enzymes and IAPP, or not, and incubate for another 24 h before measuring viability using the resazurin reduction assay.

3.4.4 Evaluation of IAPP sequestration by flow cytometry and confocal microscopy

For flow cytometry analysis, CHO cells were cultured in 12-well plates at density of 30 000 cells/well, for 48 h. Fluorescein-labeled peptide was solubilized in 100% DMSO at 100× final concentration and then diluted in complete media. Media was replaced by fresh media containing 12.5 μM labeled peptide, or 1% DMSO, as the vehicle control. Cells were incubated at 37°C for 30 min. After incubation, cells were washed 3 times with ice-cold PBS buffer and detached manually. Cells were suspended

in ice-cold PBS buffer and kept on ice prior to flow cytometry analysis. Analyses were performed using a BD accuri C6 with 10 000 gated cells/sample with excitation at 488 nm and emission at 530 nm. For confocal microscopy, cells were cultured in 8-well cell culture chamber at a density of 6 000 cells/well for 48 h before treatment. After incubation with labelled peptide, cells were washed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde. Actin and nucleus were stained with 1 U/mL of Texas-red-phalloidin and 0.1 µg/mL DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), respectively, for 25 min in the dark and cells were washed three times with PBS. Fluorescence was analyzed with a confocal Nikon microscope equipped with a 60× oil immersion objective and images were analyzed using ImageJ software.

3.4.5 Preparation of giant plasma membrane vesicles

CHO cells were cultured in 150 mm dishes for 48 h. Cells were washed twice with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and twice with GPMV buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7.4). For plasma membrane vesiculation, cells were exposed to GPMV buffer supplemented with 2 mM N-ethyl maleimide (NEM) for 2 h (Sezgin *et al.*, 2012). Buffer containing GPMVs were harvested and transferred into a conical tube. Samples were centrifuged at 300 g for 3 minutes to pellet cells and large debris. To concentrate GPMVs, supernatant was transferred into spin concentrators with a 100 kDa mass cutoff. Samples were centrifuged at 300 g until the desired concentration is reached. Lipid concentration was estimated by an inorganic phosphate colorimetric assay (Carles, 1956). For fluorescent microscopy imaging, GPMVs were incubated with the fluorescent probes Cell Tracker Orange (0.01 µM) and FAST DiO (50 µg/mL) for 45 minutes at 37 °C. Labelled GPMVs were then concentrated as previously described using spin concentrators with a 100 kDa mass cutoff to eliminate the excess of fluorescent dyes. For membrane perturbation, GPMVs were incubated in presence of 12.5 µM peptide (monomerized, pre-fibrillar species, amyloid fibrils). Images were acquired using a confocal Nikon microscope equipped with a 60× oil

immersion objective at the indicated time. At least three images were acquired for each condition at indicated times. Intensity fluorescence of merged fluorescence was measured for at least 30 vesicles per image. Data of at least three assays (with different peptide and GPMV lots) performed in triplicates were averaged and expressed as the mean \pm S.E.M.

3.4.6 Kinetics of amyloid self-assembly

Lyophilized and monomerized IAPP was solubilized at 25 μ M in GPMV buffer. Peptide solution was then diluted to reach a final concentration of 12.5 μ M in presence of GPMVs, or not, and 10 μ M thioflavin (ThT) or 0.5 μ M Fluorescein arsenical hairpin binder (FIAsH). Assays were carried out in 96-well microplates (black-wall, clear bottom, non-binding surface) with a volume of 100 μ L per well. Microplate was agitated for 5 s (linear shaking, 2 mm amplitude, 654 rpm) before first measurement and the fibrillization kinetics were performed at 25 $^{\circ}$ C under quiescent conditions. Fluorescence, excitation at 440 nm and emission at 485 nm for ThT and excitation at 508 nm and emission at 528 nm for FIAsH, was measured every 10 min. Data obtained from triplicate wells were averaged, corrected by subtracting the corresponding control reaction and plotted as fluorescence vs time. Time dependence of fluorescence intensity were fitted to a sigmoidal Boltzmann model, where T_{50} is the time required to reach half of the fluorescence intensity, k is the apparent first-order constant and Y_{max} and Y_0 are, respectively, the maximum and initial fluorescence values:

$$Y = \frac{Y_0 + (Y_{max} - Y_0)}{1 + e^{-(T-T_{50})/k}}$$

The lag time is described as $T_{50} - 2/k$. Data of at least four different lots of peptides were averaged and were expressed as the mean \pm S.E.M. Evaluation of the results was made using the Student's t-test and statistical difference was established at $P < 0.01$.

3.4.7 Atomic force microscopy

Lyophilized and monomerized peptides were solubilized in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, at a final concentration of 75 μ M. Solution was incubated for 30 min at 25 °C without agitation before being diluted in 1% acetic acid and immediately applied to freshly cleaved mica. The mica was blotted dry with filter paper and washed twice with nanopure water, blotted dry between washings. The washed mica was allowed to dry completely (24h) before imaging. Samples were analyzed using a Veeco/Bruker Multimode AFM using tapping mode with a silicon tip (2-12 nm tip radius, 0.4 N/m force constant) on a nitride lever. Images were taken at scan rate of 0.5 Hz and 1024 scan/min.

3.4.8 Transmission electronic microscopy

Lyophilized and monomerized IAPP was solubilized in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) at a final concentration of 75 μ M and incubated for 24 h before being applied to glow-discharged carbon films on 400 mesh copper grids. After adsorption, samples were negatively stained with 1.5 % uranyl formate for 1 min and air dried for 15 min. Images were recorded using a FEI Tecnai 12 BioTwin microscope operating at 120 kV and equipped with an AMT XR80C CCD camera system.

3.4.9 Photochemical-induced cross-linking (PICUP)

Peptides were solubilized at 75 μ M in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, at 25 °C for 30 min. Cross-linking solution was added to a final concentration of 70 μ M Tris-(bipyridyl)Ru(II) and 1.4 mM ammonium persulfate. Aliquots were illuminated with a 150 W incandescent bulb for 5 sec. Reaction was quenched by the addition of 1 M dithiothreitol. Prefibrillar species were separated by SDS-PAGE electrophoresis using a 15% Tris-tricine gel and visualized by silver staining.

3.4.10 Fluorescence spectroscopy

IAPP was solubilized in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) at a final concentration of 75 μ M in presence of 10 μ M ThT or 40 μ M anilino-1-naphtalensulfonic acid (ANS). Solutions were incubated for the indicated time, at 25 °C without agitation. ThT and ANS fluorescence were measured in an ultra-micro 10 mm length cells using a Horiba spectrofluorometer. ThT emission was measured with excitation at 440 nm and detected between 450 and 550 nm, while ANS emission was measured between 385 and 585 nm after excitation at 370 nm. Spectra were blank-subtracted with the corresponding peptide-free solution.

3.5 Results

3.5.1 Cell surface GAGs potentiate IAPP cytotoxicity

We initially evaluated how cell surface GAGs modulate IAPP-mediated cytotoxicity using K1 and pgs-A-745 CHO cells. CHO pgs-A-745 cells are deficient in xylosyltransferase, a key enzyme in proteoglycan synthesis that catalyzes the transfer of the first sugar to the protein core. This mutation leads to the absence of GAGs at the cell surface (Esko *et al.*, 1985). Cells were plated at four different densities in 96-well plates and incubated for 48 h before being treated with freshly dissolved monomerized IAPP for 24 h. At a density of 1 000 and 2 500 cells/well, the viability of CHO K1 cells is reduced to 15 % and 31 %, respectively, of the control upon treatment with 12.5 μ M IAPP (Figure 3.1A). In sharp contrast, under these conditions, no significant decrease of the metabolic activity was measured for CHO pgs-A-745 cells. At higher cell density, *i.e.* up to 10 000 cells/well, 12.5 μ M of IAPP did not decrease the viability of both cell types. At a peptide concentration of 25 μ M, the cellular viability of CHO K1 cells is significantly lower compared to CHO pgs-A-745, for all densities evaluated (Figure 3.1B). No significant decrease of metabolic activity was measured upon

treatment with 6.25 μM monomerized IAPP, whereas no difference was observed between K1 and pgs-A-745 treated with 50 μM IAPP, for all cell densities (Figure 3.2). These results suggest that the presence of GAGs at the cell surface potentiates IAPP cytotoxicity. This observation is in agreement with a previous study reporting that CHO pgs-D-677 cells, which are deficient in HSPGs, are more resistant against IAPP induced apoptosis, in contrast to their wild-type CHO counterpart (Oskarsson *et al.*, 2015).

Plasma membrane perturbation by IAPP oligomers and/or by the self-assembly process constitutes a main upstream biochemical event leading to cell death (Brender *et al.*, 2012; Demuro *et al.*, 2005). Accordingly, the activity of the cytoplasmic enzyme LDH in the culture media upon IAPP treatment was measured, a common indicator of plasma membrane permeabilization. When cells were treated with 12.5 μM freshly dissolved IAPP, the level of LDH activity in the media was significantly higher for K1 cells compared to pgs-A-745, for all cell densities evaluated (Figure 3.1C). In contrast, no significant difference in cytoplasmic LDH release was measured between K1 and pgs-A-745 cells for the other concentrations tested, *i.e.* 6.25, 25 and 50 μM (Figure 3.1D, 3.2). By fluorescence microscopy, we evaluated simultaneously the presence of metabolically active cells in green (calcein-AM), and the plasma membrane integrity in red (ethidium homodimer-1). Cells were cultured in a 12-well plate at a density of 30 000 cells/well, which is the equivalent of 2 500 cells/well for a 96-well plate, and treated for 24 h with 12.5 and 25 μM IAPP. At both peptide concentrations, more green cells were observed for pgs-A-745 cells, whereas red fluorescence was particularly noticeable for K1 cells (Figure 3.1E), in agreement with the results of LDH release and the resazurin-based metabolic assay.

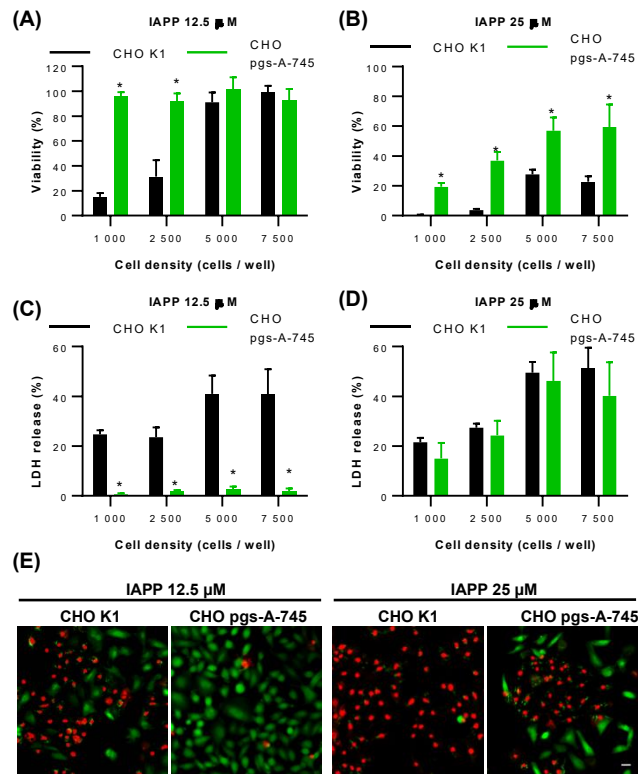


Figure 3.1. Cell surface GAGs potentiate IAPP cytotoxicity. A-D) CHO K1 and CHO pgs-A-745 cells were treated with monomerized IAPP for 24 h at the indicated concentrations. A-B) Cell viability was measured using the resazurin assay and compared to that of vehicle-treated cells. C-D) Membrane perturbation was evaluated by measuring LDH activity in the media and compared to that of cells treated with the lysis buffer. A-D) Data represent mean \pm S.E.M. of at least four individual experiments performed in triplicate. Results were analyzed using the student's t-test and statistical difference between CHO K1 and CHO pgs-A-745 was established at * $P < 0.01$. E) Cell viability was evaluated by staining with calcein-AM (green; lived cells) and ethidium homodimer (red; dead cells). Scale bar: 20 μ m.

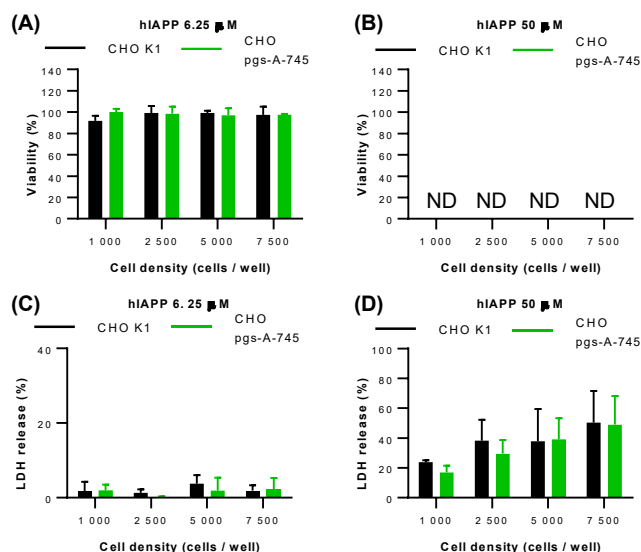


Figure 3.2. hIAPP mediated cytotoxicity at high concentration is independent of the presence of GAGs and cell density. CHO K1 and CHO pgs-A-745 cells were treated with freshly dissolved hIAPP in Tris HCl 20 mM (pH 7.4) at indicated concentrations for 24 h. A-B) Cell viability was measured using the resazurin reduction assay and compared to that of cells treated with vehicle. C-D) Cytotoxicity was evaluated by measuring LDH released in media and compared to that of cells treated with vehicle. For both assays data represent mean \pm S.E.M. of at least four experiments performed in triplicate. Results were analyzed using the student's t-test and statistical difference (between CHO K1 and CHO pgs-A-745) was established at * $P < 0.01$. ND: not determined.

To validate that the divergent vulnerability over IAPP toxicity observed between K1 and pgs-A-745 cells arises directly from the absence of GAGs, cell surface GAGs of CHO K1 cells were digested enzymatically prior to viability assays. Treatment of CHO K1 cells with heparinase III (Hep III) for 1 and 24 h reduced the level of HS, as observed by immunocytochemistry using an anti-HS antibody (Figure 3.3A). For viability assays, cells were simultaneously treated with Hep III and chondroitinase ABC or with the vehicle control for 1 h. Cell media was then removed and replaced with fresh media containing the enzymes, or not, and 12.5 μ M monomerized IAPP. Cells were incubated for 24 h before measuring the metabolic activity. As anticipated, enzymatic digestion of GAGs significantly protected CHO K1 from IAPP-induced toxicity (Figure 3.3B).

The same assay was performed with pgs-A-745 cells and no significant difference was observed between enzyme-treated and control cells, indicating that the presence of GAG-degrading enzymes in the media has no effect on IAPP cytotoxicity (Figure 3.3B). Taken together, these results reveal that the presence of GAGs on the outer leaflet of the plasma membrane decreases the concentration of IAPP required to induce cytotoxicity and membrane permeabilization.

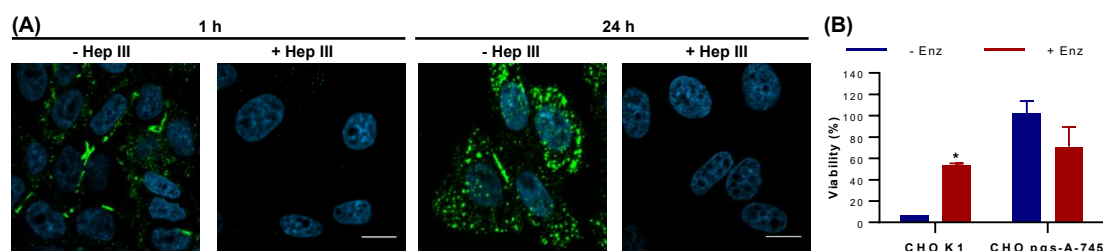


Figure 3.3. Enzymatic digestion of cell surface GAGs protects against IAPP cytotoxicity. A) Representative confocal microscope images of CHO K1 cells incubated for 1 and 24 h with Hep III or not. Immunostaining was performed using a primary mouse anti-HS and an Alexa-Fluor conjugated goat anti-mouse as secondary antibody. Scale bar is 10 μ m. B) CHO K1 and CHO pgs-A-745 cells were treated with 1.7 mUI/mL Hep III and 1 UI/mL chondroitinase ABC (+ Enz) or with the vehicle control (- Enz) for 1 h. Cells were washed and incubated with 12.5 μ M monomerized IAPP for 24 h, in presence, or absence, of GAG-degrading enzymes. Cell viability was measured using the resazurin assay and compared to that of cells treated with the vehicle control. Data represent mean \pm S.E.M. of at least four experiments performed in triplicate. Results were analyzed using the student's t-test and statistical difference was established at * $P < 0.01$.

3.5.2 Cytotoxicity of IAPP quaternary proteospecies is independent of the presence of cell surface GAGs

Compelling experimental evidences have indicated that oligomers and prefibrillar intermediates are the most proteotoxic species of the amyloid cascade, whereas well-defined fibrils are poorly toxic (Abedini *et al.*, 2016; Kaye *et al.*, 2003). Therefore, we evaluated if cell surface GAGs could also modulate the toxicity of pre-assembled IAPP quaternary species. Oligomers, or prefibrillar species, were assembled by incubating IAPP in Tris HCl 20 mM (pH 7.4) at 75 μ M for 30 min (Quittot *et al.*, 2018).

Atomic force microscopy revealed the formation of a mixture of oligomers (Figure 3.4A) and photochemical-induced cross-linking (PICUP) confirmed the presence of oligomers, ranging from dimer to hexamer (Figure 3.4B). Amyloid fibrils were prepared by incubating IAPP under these conditions for 24 h, resulting in the formation of a dense network of unbranched filaments, as observed by transmission electronic microscopy (Figure 3.4C). To validate the quaternary conformational identity of the proteospecies, the fluorescence of ThT and ANS was measured. ThT is a benzothiazole dye whose fluorescence quantum yield increases upon specific binding to cross- β -sheet quaternary structure (LeVine, 1993; Sebastiao *et al.*, 2017), whereas the fluorescence of ANS is known to increase upon binding to protein hydrophobic patches (Hawe *et al.*, 2008). Prefibrillar species assembled for 30 min were ThT and ANS negative, whereas IAPP incubated for 24 h led to a sharp increase of ThT and ANS fluorescence, confirming the formation of cross- β -sheet aggregates (Figure 3.4D, E). Prefibrillar IAPP species showed high cytotoxicity, with cell viability of around 30% of the treated control cells at a peptide concentration of 6.25 μ M, without significant difference between cell types (Figure 3.4F). At 12.5 and 25 μ M, no significant metabolic activity could even be detected, indicative of high cell death. These observations suggest that IAPP oligomeric proteospecies «by-pass» the effect of GAGs on IAPP-mediated cytotoxicity. Considering that no significant toxicity was observed for monomeric IAPP at 6.25 μ M (Figure 3.2), these results also highlight the high toxicity of pre-assembled oligomeric species, as previously reported (Abedini *et al.*, 2016). Evaluation of plasma membrane disruption, *i.e.* measurement of LDH release, upon treatment with prefibrillar IAPP also revealed no significant differences between K1 and pgs-A-745 cells (Figure 3.4G). We also validated that defined amyloid fibrils did not exert cytotoxicity (Figure 3.4H) nor membrane permeabilization (Figure 3.5), in presence or absence of GAGs at the cell surface. Finally, the IAPP isoform from rodent (rIAPP), which is known to be poorly amyloidogenic and non-toxic owing to the presence of multiple proline residues within the 20-29 amyloidogenic segment (Quittot *et al.*, 2018; Westermark *et al.*, 1990), was not toxic for both cell types (Figure 3.6). Moreover, pre-

assembled rIAPP oligomers (Figure 3.7) were non-toxic to CHO K1 and pgs-A-745 cells (Figure 3.4I). These results indicate that the self-assembly of IAPP into distinct quaternary species, *i.e.* oligomers and fibrils, before cell treatment abrogates the effect of GAGs on cytotoxicity and membrane permeabilization.

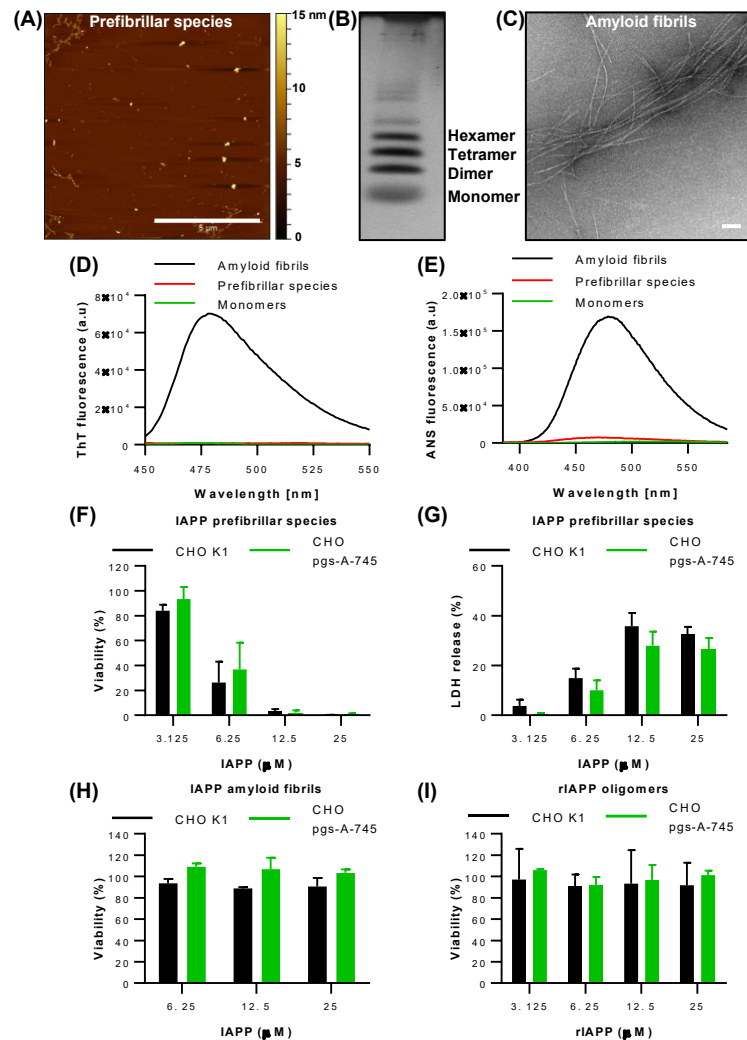


Figure 3.4. Cell surface GAGs do not affect the toxicity of IAPP quaternary species. A-I) Monomerized IAPP was freshly dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 75 μM and assembled under quiescent conditions at 25°C for 0h (monomers), 30 min (prefibrillar species) and 24 h (amyloid fibrils). A) Representative AFM image of IAPP prefibrillar species, scale bar is 5 μm. B) SDS-PAGE of photochemically cross-linked IAPP prefibrillar species. C) Representative TEM image of IAPP amyloid fibrils. Scale bar is 100 nm. D) ThT fluorescence emission spectra after an excitation at 440 nm. E) ANS fluorescence emission spectra after an excitation at 355 nm. F-I) Cells were plated at 2 500 cells/well (96-well plate) before being treated for 24 h with (F,G) IAPP prefibrillar species, (H) amyloid fibrils and (I) prefibrillar rIAPP. F,H,I) Cell viability was measured using the resazurin assay and compared to that of vehicle treated cells. G) Membrane perturbation was evaluated by measuring LDH activity in media and compared to that of cells treated with the lysis buffer. F-I) Data represent mean ± S.E.M. of at least four experiments performed in triplicate.

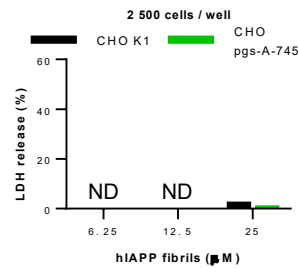


Figure 3.5. Membrane perturbation is not induced by amyloid fibrils. hIAPP was freshly dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 50 μM and pre-incubated under quiescent conditions at 25°C for 24 h. Amyloid fibrils were applied to cells at a density of 2 500 cells/well and incubated for 24 h. Indicated final concentrations are relative to hIAPP in its monomeric forms. Membrane perturbation was evaluated by measuring LDH released in media and compared to that of cells treated with vehicle. Data represent mean ± S.E.M. of at least four experiments performed in triplicate. ND: not determined.

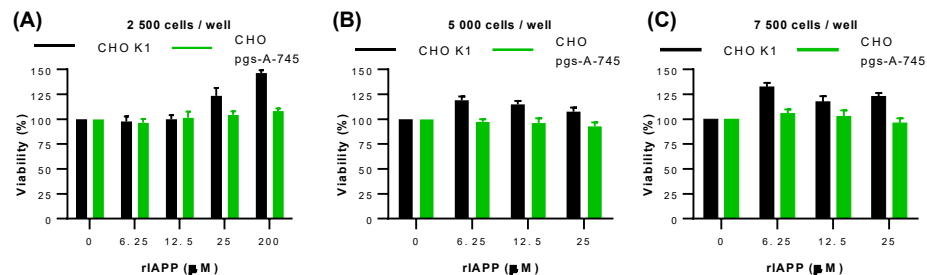


Figure 3.6. Treatment of exogenous monomeric rIAPP is not associated with cytotoxicity. A-C) CHO K1 and CHO pgs-A-745 cells were plated at the indicated cell density for 48 h. Cells were treated with freshly dissolved rIAPP in Tris HCl 20 mM (pH 7.4) at the indicated concentrations for 24 h. Cell viability was measured using the resazurin reduction assay and compared to that of cells treated with vehicle. Data represent mean ± S.E.M. of at least four experiments performed in triplicate.

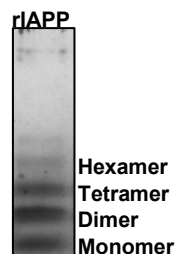


Figure 3.7. Photochemically cross-linked of pre-incubated rIAPP.

3.5.3 Cell surface GAGs sequester IAPP

Considering that cell surface GAGs increase the predisposition towards IAPP cytotoxicity, the capacity of these sulfated polysaccharides to bind and sequester IAPP was evaluated by flow cytometry and confocal microscopy. IAPP was labelled with fluorescein (FITC) on the side chain of an additional Lys residue incorporated at the N-terminus (position 0), a strategy that affects as little as possible the physicochemical (net charge at physiological pH, hydrophobicity) and the self-assembling properties of IAPP. CHO cells were plated at a density corresponding to 2 500 cells/well for a 96-well plates (Figure 3.1), *i.e.* 6 000 cells/well for an 8-well chamber slide for confocal microscopy and 30 000 cells/well for 12-well plates for flow cytometry. After 48 h incubation, cells were treated with 12.5 μ M of fluorescently labelled monomerized IAPP for 30 min at 37 °C before analyses. As observed by flow cytometry, CHO K1 cells sequestered a significant higher level of fluorescence compared to the CHO pgs-A-745 cells, with the mean fluorescence intensity of cells reduced by 65 % (Figure 3.8A, B). Confocal microscopy images of cells treated with freshly dissolved labelled IAPP, showed a dense network of green fluorescent puncta at the cell surface of CHO K1 cells, whereas the green fluorescence was less prevalent for CHO pgs-A-745 (Figure 3.8C). These observations indicate that cell surface GAGs facilitate membrane adsorption of IAPP. Next, we evaluated if GAG-mediated sequestration of IAPP could be associated with the aggregation of the peptide at the plasma membrane facilitated by GAGs. The same experiment was performed with labelled non-amyloidogenic rIAPP. It has been previously reported *in vitro* that heparin binds rIAPP with a similar affinity to IAPP, although rIAPP displays a higher net positive charge at physiological pH than human IAPP owing to an His to Arg substitution at position 18 (Oskarsson *et al.*, 2015). Surprisingly, we observed that rIAPP was poorly sequestered on the cell surface of both cell types, independently of the presence of cell-surface GAGs (Figure 3.8D). This result suggests that the higher binding and sequestration of IAPP on CHO K1 compared to pgs cells is associated with the aggregation propensity of the peptide.

Finally, we validated that the sequestration of IAPP at the cell membrane of CHO K1 cells is associated with cytotoxicity by competitive binding with soluble heparin, which mimics the highly sulfated domains of HS. It has been previously shown that soluble heparin has a protective effect against IAPP-mediated cytotoxicity, likely by hastening peptide self-assembly into cytocompatible amyloid fibrils and/or by decreasing the concentration of toxic proteospecies in solution (De Carufel *et al.*, 2013; Oskarsson *et al.*, 2015; Potter *et al.*, 2015). As anticipated, the presence of soluble heparin protected CHO K1 cells against IAPP mediated cytotoxicity (Figure 3.8E) and decreased IAPP sequestration at the cell surface of CHO KI cells to a level similar to CHO pgs-A-745, in absence of heparin (Figure 3.8). This result indicates that reducing IAPP binding and sequestration at the cell surface abrogates IAPP-mediated cytotoxicity.

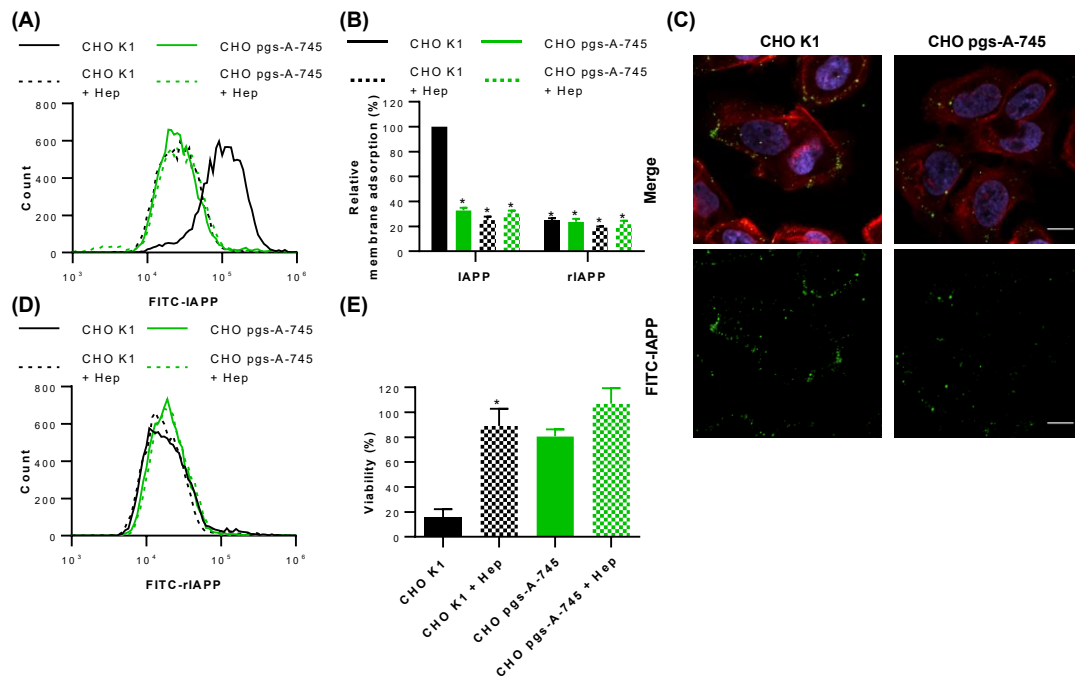


Figure 3.8. Cell surface GAGs sequester IAPP. A-D) CHO K1 and CHO pgs-A-745 cells were treated with 12.5 μ M FITC-IAPP for 30 min at 37°C in presence, or absence, of 12.5 μ M heparin (Hep). A) Flow cytometry histograms showing the cellular sequestration of IAPP on CHO K1 and CHO pgs-A-745 cells. B) Data represent the relative mean fluorescence intensity (\pm S.E.M) of 10 000 gated cells from at least three individual experiments. Results are expressed as a percentage of the maximal fluorescence for 12.5 μ M monomer FITC-IAPP on CHO K1. C) Representative confocal microscopy images of cell sequestration of IAPP on CHO K1 and CHO pgs-A-745. Scale bar: 10 μ m. D) Flow cytometry histograms showing the cellular sequestration of rIAPP on CHO K1 and CHO pgs-A-745 cells. E) CHO K1 and CHO pgs-A-745 cells were treated with 12.5 μ M monomerized IAPP in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) for 24 h, in presence or absence of 12.5 μ M heparin (Hep). Cell viability was measured using the resazurin reduction assay and compared to that of cells treated with the vehicle control. B,E) Results were analyzed using the student's t-test and statistical difference (between CHO K1 and CHO pgs-A-745) was established at * $P < 0.01$.

3.5.4 Preparation of giant vesicles derived from CHO plasma membrane

The effect of IAPP on plasma membrane perturbation, which is exacerbated by the presence of cell surface GAGs, could be the result of other cell death events, such as apoptosis and mitochondrial dysfunctions (Abedini et Schmidt, 2013). For instance, it

has been observed that the translocation of IAPP into the cytosol by scrape-loading procedures leads to membrane permeabilization through mitochondria uncoupling (Magzoub et Miranker, 2012). Accordingly, to specifically address the direct contributions of cell surface GAGs in amyloid-related plasma membrane disruption, GPMVs derived from CHO K1 and CHO pgs-A-745 cells were prepared. In addition, using such lipid vesicles derived from cells will allow us to evaluate biophysically how membrane-embedded GAGs modulate IAPP self-assembly. GPMVs were formed by treating CHO cells with 2 mM NEM for 2 h at 37°C (Figure 3.9A). The recovered GPMVs were concentrated by means of a 100 kDa cutoff centrifugal concentrator, while eliminating small cell debris. GPMV lipid membrane could also be labelled with FAST DiO, whereas the cytoplasmic content was labelled with the thiol-reactive dye Cell Tracker Orange, which is known to be retained into cytoplasm. Double-labelled GPMVs were isolated as described above, while eluting the excess of the remaining dye. Double labelling of GPMVs was validated by fluorescence confocal microscopy, where the GPMV membrane is observed in green and the cytoplasmic content in orange (Figure 3.9B). To estimate the amount of GPMVs in the different preparations, phospholipid concentration was determined by measuring total inorganic phosphate with a colorimetric assay (Carles, 1956). Phospholipid concentration was used as a relative estimation of the quantity of GPMVs.

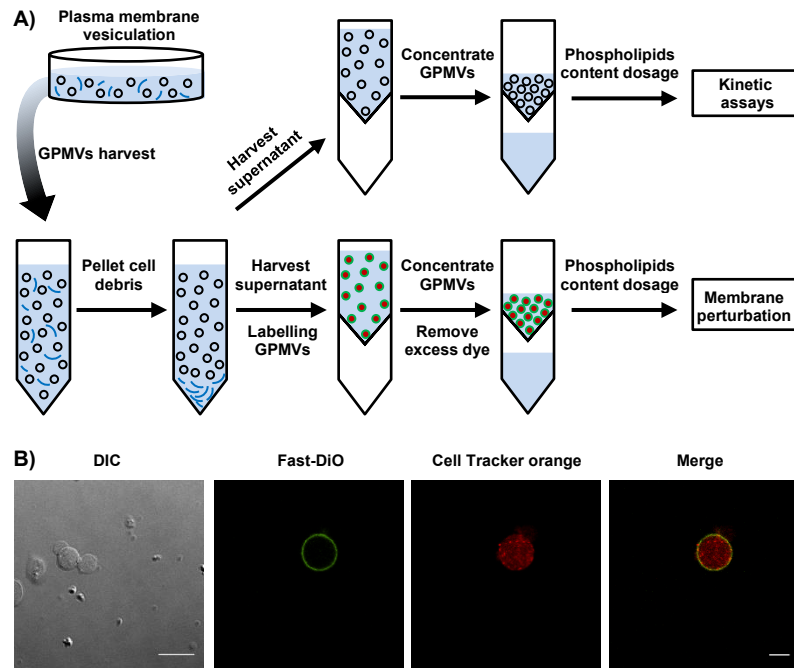


Figure 3.9. Preparation of giant plasma membrane vesicles. A) Schema presenting the preparation of GPMVs derived from CHO K1 and CHO pgs-A-745 cells. B) Representative confocal microscopy images of non-labelled GPMVs by DIC (scale bar is 10 μm), or double labelled Fast Dio/Cell Tracker orange GPMVs by fluorescence (scale bar is 5 μm).

3.5.5 GAGs promote IAPP-induced membrane disassembly of GPMVs

We first evaluated if the presence of GAGs on the outer leaflet of GPMVs contributes to the membrane permeabilization induced by IAPP, as observed for cells (Figure 3.1). Recently, GPMVs isolated from INS-1 pancreatic cells were used to observe in real-time the membrane perturbation associated with IAPP amyloidogenesis (Birol *et al.*, 2018). This elegant study showed that membrane perturbing IAPP oligomers are dynamic assemblies and that a conformational switch within these oligomers is associated with two classes of poration, with a transition from small to large pores. Nonetheless, the roles of membrane-embedded GAGs on the perturbation of lipid vesicles derived from cell membrane has never been addressed so far. GPMVs were labelled with the lipid bilayer in green and the cytoplasmic content in orange and the

resulting merged fluorescence in yellow is indicative of intact GPMVs (Figure 3.10A). This yellow merged fluorescence is lost upon disassembly of GPMVs upon 24 h treatment with 12.5 μM IAPP. Accordingly, the propensity of IAPP to disrupt the integrity of GPMVs as a function of the presence of GAGs could be monitored by evaluating the decrease of the merged fluorescence by confocal microscopy. Images of 12.5 μM GPMVs (expressed as the concentration of phospholipids) were taken after 1, 3 and 24 h treatment with 12.5 μM monomerized IAPP and rIAPP (Figure 3.10B). For each condition, at least three images were taken and the merged fluorescence intensity of at least 30 vesicles per images was measured. The mean fluorescence was expressed as a percentage of the fluorescence of the GPMVs treated with the vehicle buffer control. After 1 h of incubation with both peptides, the average intensity of the merged yellow fluorescence of GPMVs was similar to the one of the vehicle control, indicative of intact GPMVs (Figure 3.10C). However, upon 3 h incubation with IAPP, a decrease of merged fluorescence intensity was measured for K1-derived GPMVs treated with IAPP, while the merged fluorescence was maintained for GPMVs prepared from pgs-A-745. As observed on Figure 3.10B, GPMVs treated with IAPP for 3 h displayed a disordered morphology, whereas K1 vesicles treated with the buffer, or the non-amyloidogenic rIAPP, remained circular with a high intensity of merged fluorescence. After 24 h incubation in presence of IAPP, both K1 and pgs-A-745 GPMVs lost their circular shape and the merged fluorescence intensity decreased sharply. In contrast, vesicles incubated with rIAPP maintained their integrity (Figure 3.10B). It is worth mentioning that GPMVs can spontaneously disassemble after 2 days at 4 $^{\circ}\text{C}$ (Sezgin *et al.*, 2012), likely explaining the partial loss of circular shape after 24 h incubation at room temperature observed in presence of the buffer. Nonetheless, these data clearly indicate that the presence of GAGs at the surface of GPMVs hastens the lipid bilayer disassembly induced by IAPP.

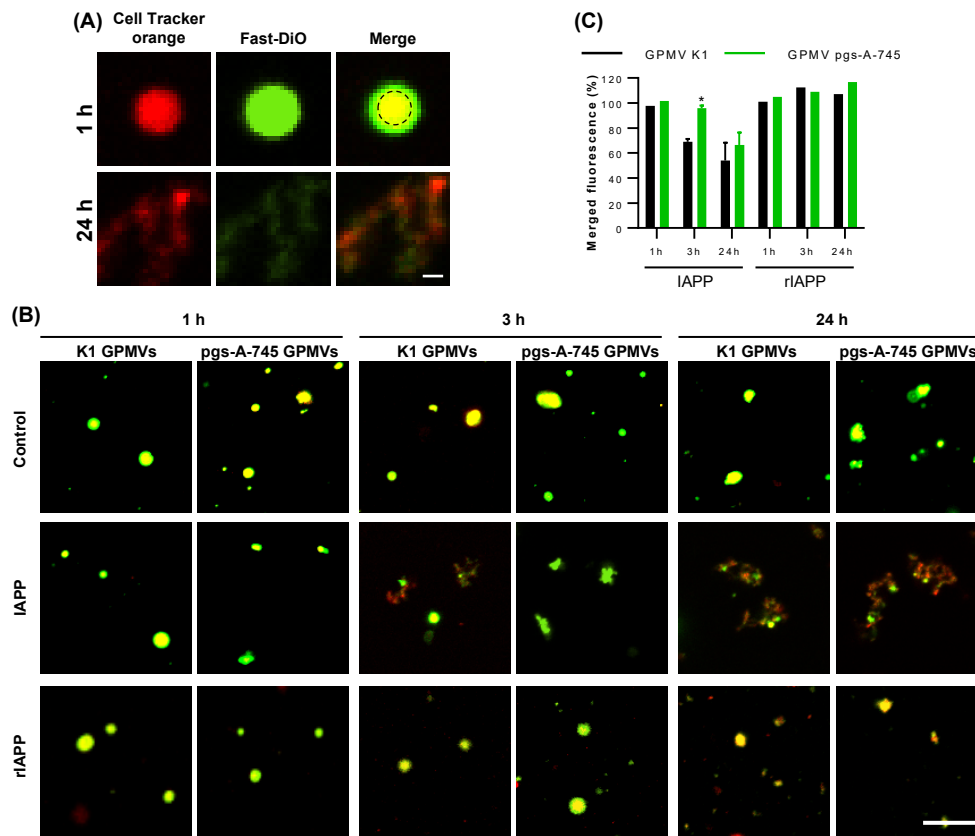


Figure 3.10. GAGs contribute to the disassembly of GPMVs induced by IAPP. A, B) Labelled GPMVs were treated with 12.5 μ M IAPP, rIAPP or GPMV buffer (control) and were imaged by confocal microscopy after 1h, 3h and 24 h incubation. A) Scale bar is 1 μ m. B) Scale bar is 20 μ m. C) Merged fluorescence intensity. Data represent the relative mean fluorescence intensity (\pm S.E.M) from at least three individual experiments. Results are expressed as a percentage of the buffer treated GPMVs. Results were analyzed using the student's t-test and statistical difference (between K1 and pgs-A-745) was established at * $P < 0.01$.

Using lived cells, we observed that the capacity of pre-assembled IAPP quaternary proteospecies, *i.e.* oligomers and amyloid fibrils, to disrupt plasma membrane was independent of the presence of GAGs at the cell surface (Figure 3.4). Accordingly, we evaluated if this effect could also be observed for vesicles derived from the plasma membrane by incubating K1 and pgs-A-745 GPMVs with IAPP prefibrillar species and fibrils. Interestingly, prefibrillar species induce an high level of membrabe dissambly after 3 h incubation, independlty of the presence of GAGs (Figure 3.11A, B). In sharp

contrast, the integrity of K1 and pgs-A-745 derived GPMVs was not significantly affected after 24 h incubation with amyloid fibrils. These results indicate that once the IAPP self-assembly is triggered, cell surface GAGs does not affect the capacity of the peptide to induce plasma membrane permabilization and disassembly.

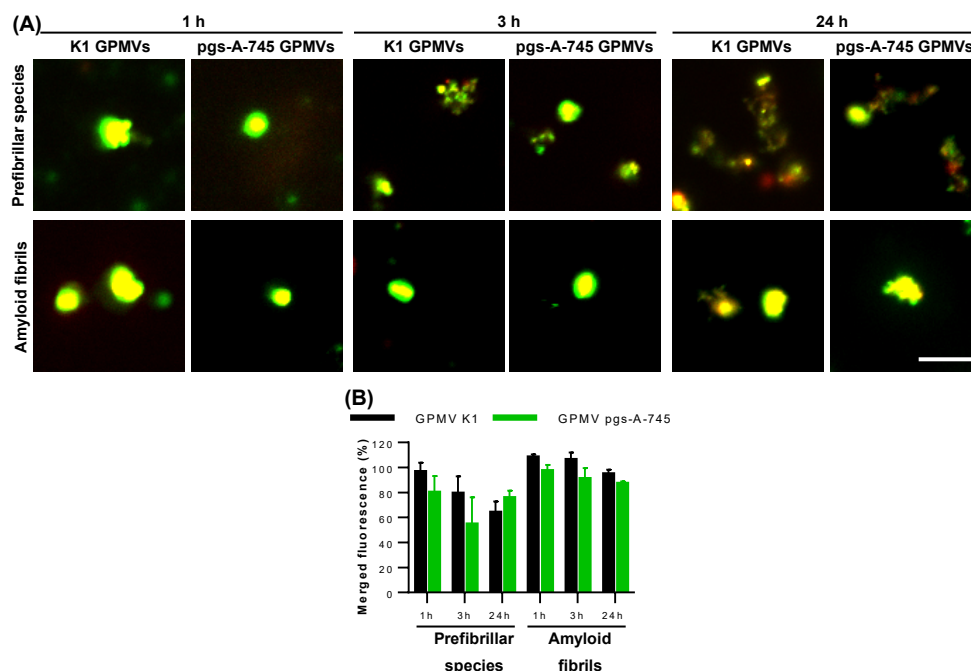


Figure 3.11. Disassembly of GPMVs by IAPP quaternary proteospecies is independent of GAGs. A) Labelled GPMVs were treated with 12.5 μ M IAPP prefibrillar species and amyloid fibrils, and were imaged by confocal fluorescence microscopy after 1h, 3h and 24 h incubation. Scale bar is 20 μ m. B) Merged fluorescence intensity. Data represent the relative mean fluorescence intensity (\pm S.E.M) from at least three individual experiments. Results are expressed as a percentage of the buffer treated GPMVs. Results were analyzed using the student's t-test and statistical difference (between K1 and pgs-A-745) was established at * $P < 0.01$.

3.5.6 GPMV-embedded GAGs have a modest effect on IAPP amyloid self-assembly

Numerous studies have shown that soluble sulfated GAGs, such as heparin and HS, as well as well large unilamellar anionic vesicles composed of synthetic lipids dramatically hasten the self-assembly of IAPP into amyloid fibrils (De Carufel *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2015). Conversely to synthetic lipid vesicles, a study has shown

that GPMVs prepared from an immortal β -cell line prevent IAPP self-assembly, and this inhibitory effect could be related to the presence of proteins or to the physical properties, such as curvature and size (Schlamadinger et Miranker, 2014). However, the effect of GAGs embedded in membrane-derived vesicles on IAPP amyloidogenesis has never been addressed so far. By using unlabelled GPMVs successively isolated from K1 and pgs-A-745 cells, we evaluated the effects of these vesicles on the kinetics of amyloid formation. As revealed by time-resolved ThT fluorescence, increasing the concentrations of GPMVs, expressed relative to phospholipid content, delayed IAPP self-assembly (Figure 3.12A, B). While the lag-time, which is the thermodynamic rate-limiting step precluding elongation, was unaffected by the presence of 12.5 and 25 μ M GPMVs, the lag phase was significantly extended at higher vesicle concentrations (Figure 3.12C). In sharp contrast, in presence of large unilamellar vesicles (LUVs) composed of phosphocholine/phosphoglycerol (DOPC/DOPG; 7:3 molar ratio), widely used membrane model, IAPP self-assembly was drastically accelerated (Figure 3.13). Interestingly, no significant differences were observed between K1 and pgs-A-745 derived vesicles, suggesting that the presence of GAGs on the surface of GPMVs does not affect the kinetics of self-assembly under these conditions. At an IAPP concentration at 6.25 μ M, *i.e.* increasing the ratio of GPMVs, the inhibitory effect of GPMVs was even more pronounced, and no significant difference between K1 and pgs-A-745 GPMVs was observed (Figure 3.14).

As ThT fluorescence is known to be sensitive to the environment and could lead to non-specific interactions in complex biological media such as GPMVs (Hong *et al.*, 2012), we validated the ThT data by an alternative approach based on FAsH. This probe, whose fluorescence increase upon binding to tetra-cys motif, has been recently used to monitor IAPP fibril formation. Actually, a non-contiguous tetracysteine FAsH-binding motif is formed upon amyloid self-assembly, through the clustering of the cysteine in positions 2 and 7, which allows monitoring kinetics of amyloid formation (Quittot *et al.*, 2018). As observed with ThT, FAsH-based kinetics assays revealed that

12.5 and 25 μM GPMVs did not affect significantly the lag-time of IAPP amyloid formation (Figure 3.12D, E, F). Increasing the concentration of GPMVs to 50 μM led to a decrease of the fluorescence signal, suggestive of a delay in the formation of the non-contiguous tetra-cys motif associated with amyloid formation. Taken together, these results indicate that, in contrast to artificial lipid vesicles and soluble GAGs, lipid vesicles derived from eukaryotic plasma membrane have a negligible effect on the *in vitro* fibrillization kinetics of IAPP.

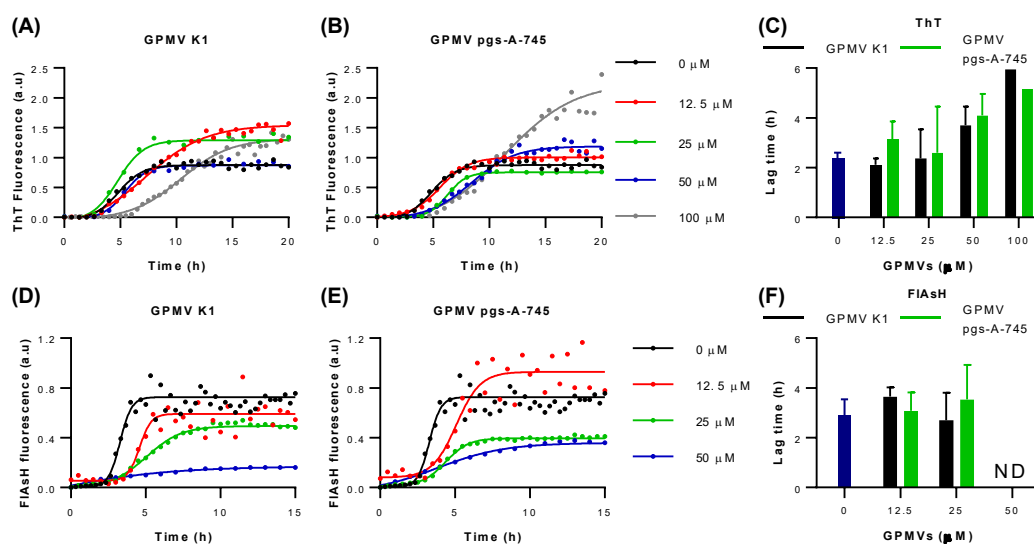


Figure 3.12. GPMVs have a negligible effect on the kinetics of IAPP self-assembly. Representative kinetics of IAPP amyloid assembly monitored by (A,B) ThT and (D,E) FIAsh fluorescence. IAPP was incubated at 12.5 μM under quiescent conditions in presence, or absence, of K1 and pgs-A-745 GPMVs, respectively. Fluorescence of ThT (10 μM) and FIAsh (0.5 μM) was measured every 10 min. The curves represent Boltzmann sigmoidal fit. C) Lag time from ThT (A,B) and FIAsh (D,E) kinetics. Data represent the mean \pm S.E.M. of at least four individual experiments performed in triplicate. ND: could not be determined.

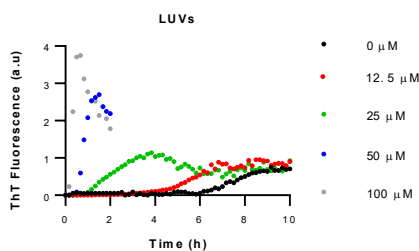


Figure 3.13. IAPP self-assembly is drastically increased by the presence of soluble heparin and LUVs. Representative kinetic traces of IAPP amyloid assembly monitored by ThT. hIAPP was incubated at 12.5 μM under quiescent conditions in presence of increasing concentrations of LUVs in Tris HCl 20mM, pH 7.4. Fluorescence of ThT (10 μM) was measured every 10 min with excitation at 440 nm and emission at 485 nm.

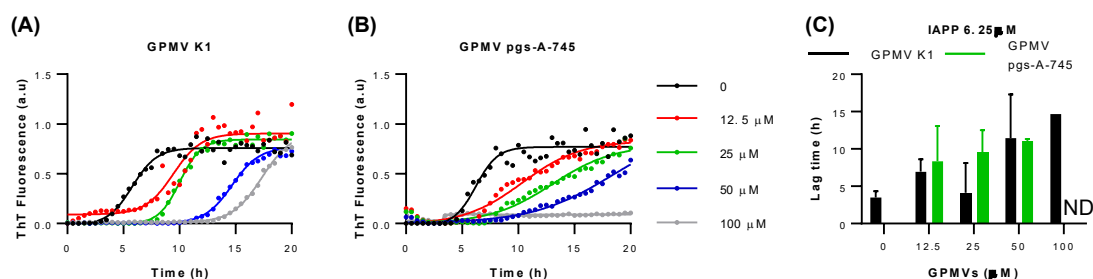


Figure 3.14. IAPP self-assembly is independent of the presence of GAGs at the GPMVs surface. Representative kinetic traces of IAPP amyloid assembly monitored by ThT. hIAPP was incubated at 12.5 μM under quiescent conditions in presence of GPMV K1 or GPMV pgs-A-745 in GPMV buffer supplemented with NEM 2 mM, pH 7.4. Fluorescence of ThT (10 μM) was measured every 10 min with excitation at 440 nm and emission at 485 nm. The curves represent Boltzmann sigmoidal fit. C) Lag time for the fitting curves in A) and B). Data represent mean \pm S.E.M. of at least four experiments performed in triplicate. ND: not determined

3.6 Discussion

Islet amyloid deposits associated with the pathogenesis of T2D comprise numerous non-IAPP components, including apolipoprotein E (Vidal *et al.*, 2003), serum amyloid P (Pepys *et al.*, 1994) and the HSPG perlecan (Young *et al.*, 1992). While these cofactors were initially regarded as accessory molecules and/or contaminants of the amyloids, biophysical and cellular studies have revealed that these biological

macromolecules promote and/or modulate amyloid formation and deposition. These biomolecules not only affect the rate and extent of aggregation, but also reshape the self-assembly landscape as well as the structure, the toxicity, the lifespan and/or the stability of the quaternary proteospecies, *i.e.* oligomers, prefibrillar species and fibrils. Among these co-factors mediating IAPP amyloidogenesis and toxicity, PGs, and more particularly HSPGs, are important for islet amyloid deposition and IAPP-induced toxicity. For instance, decreasing content of GAGs in the pancreatic islets, through enzymatic digestion on isolated islets (Oskarsson *et al.*, 2015; Potter *et al.*, 2015) or a transgenic mice harboring a perlecan mutation that prevents HS attachment (Templin *et al.*, 2019), led to a decrease of the amyloid load. Moreover, absence of membrane-bound HSPGs reduces IAPP-induced apoptosis, supporting the contributions of cell surface GAGs in IAPP-cytotoxicity (Oskarsson *et al.*, 2015). Nonetheless, the mechanistic details of the contributions of cell surface GAGs on IAPP cytotoxicity remain partially unknown and more particularly, in the context of plasma membrane perturbation. Such knowledge is critical to develop therapeutic approaches to decrease amyloid loads and the associated tissue degeneration.

In this study, we first evaluated the contribution of cell surface GAGs in IAPP-induced cytotoxicity using CHO pgs-A-745 cells, defective in proteoglycan synthesis. By varying the peptide/cell density ratio, we observed that the presence of GAGs at the cell surface correlates with a higher vulnerability towards IAPP-induced cytotoxicity. These results indicate that cell surface GAGs reduces the minimal concentration of IAPP required to induce cell death. This observation is in agreement with a previous study showing that HS participates in IAPP-induced apoptosis (Oskarsson *et al.*, 2015). Similarly, the toxicity of the Alzheimer's disease-related amyloid- β (A β) peptide on CHO cells is also increased by the presence of HS (Sandwall *et al.*, 2010). Among the numerous mechanisms proposed for amyloid-associated toxicity, membrane permeabilization and/or perturbation is one of the most recognized upstream event for numerous amyloidogenic polypeptides (Abedini et Schmidt, 2013; Brender *et al.*,

2012; Last *et al.*, 2013). Astonishingly, the implication of cell surface GAGs in the disassembly and/or permeabilization of plasma membrane has never been directly addressed so far. By measuring the release of cytoplasmic LDH into the media upon IAPP treatment, we observed that membrane permeabilization is significantly more important on cells displaying GAGs. Particularly, at a concentration of 12.5 μM IAPP, GAG-deficient cells show no release of LDH for all cell densities evaluated, in contrast to CHO cells that were sensitive to IAPP. This indicates that the presence of GAGs on the plasma membrane reduces the peptide concentration necessary to permeabilize the plasma membrane. Interestingly, comparison between cell viability, as measured by metabolic activity, and plasma membrane permeabilization, *i.e.* cytoplasmic LDH release, revealed that for some peptide/cell ratios, no cytotoxicity was measured although membrane perturbation was observed. This observation suggests that membrane permeabilization by its own may not be sufficient to induce a decrease of metabolic activity. It was recently shown that IAPP self-assembly induces two classes of poration, and that the transition from small pores to larger pore induces cytotoxicity, indicating that poration may not to be sufficient for cell death (Birol *et al.*, 2018). Moreover, membrane permeabilization is likely an upstream event to numerous biochemical events, such as mitochondrial dysfunction and activation of apoptotic pathways (Abedini et Schmidt, 2013; Magzoub et Miranker, 2012). Accordingly, in the present study, such downstream events could not have been triggered and membrane permeabilization could occur locally.

Upon treatment with monomerized peptide, cytotoxicity could result from the fibrillization process and/or by the formation of discrete toxic oligomers and prefibrillar assemblies (Abedini *et al.*, 2016; Gurlo *et al.*, 2010). To better understand the contributions of GAGs in the modulation of IAPP cytotoxicity, prefibrillar proteospecies were first assembled before treatment. Strikingly, the potentiating effect of cell surface GAGs on IAPP toxicity was not observed when IAPP is assembled into a mixture of oligomers, as prefibrillar species exert similar cytotoxicity against both

CHO cell types, independently of GAGs. This result suggests that GAGs likely contribute to IAPP cytotoxicity by increasing the peptide concentration at the cell surface and/or by triggering local assembly into membrane-active oligomers. Confocal microscopy and flow cytometry showed that IAPP was more sequestered at the cell surface of K1 cells compared to their GAG-deficient counterpart. Competition of GAG-mediated cell adsorption of IAPP by soluble heparin revealed that the sequestration of IAPP and cytotoxicity are associated. Furthermore, the non-amyloidogenic rIAPP showed a low binding to K1 and pgs cells, revealing that GAG-associated sequestration of IAPP is related to aggregation. Previous biophysical studies have indicated that sulfated GAGs act as a scaffold increasing local peptide concentration and facilitating their conformational conversion into β -sheet rich assemblies (De Carufel *et al.*, 2013; Jha *et al.*, 2011). Our results suggest that a similar mechanism likely occurs in the vicinity of the plasma membrane environment, promoting its permeabilization.

Two main mechanisms have been proposed for the membrane disassembly and/or permeabilization induced by amyloid peptides; (i) the fibrillization process into the lipid bilayer induces membrane disruption, similar to the carpet-like model, (ii) the insertion of oligomers into the plasma membrane induces pore formation, similar to the barrel-stave mechanism (Caillon *et al.*, 2016). These mechanistic models have been inferred mostly from *in vitro* studies with artificial membrane models that do not recapitulate the complexity, heterogeneity and fluidity of biological membranes. By using GPMVs, we showed that GAGs directly contribute to the perturbation of plasma membrane-derived lipid vesicles, indicating that GAGs need to be considered in these previously proposed models. Microscopy imaging of GPMVs treated with the proteospecies revealed a strong capacity of monomerized IAPP and oligomers to dismantle vesicles. Moreover, as observed for lived cells, assembling IAPP into a mixture of oligomers before treatment, by-pass the involvement of GAGs in GPMV disassembly. Finally, while biophysical studies have abundantly shown that soluble

sulfated GAGs and lipid anionic vesicles hasten IAPP amyloid formation (Nguyen *et al.*, 2015), these biophysical studies lack the biological complexity of the plasma membrane. Herein, by using giant vesicles derived from eukaryotic cells, we observed that GAGs at the GPMVs surface did not significantly alter the kinetics of amyloid fibril formation. Accordingly, caution should be taken when extrapolating results obtained with synthetic lipid vesicles and soluble GAGs to complex biological systems, as these simplistic models of fibrillogenesis do not recapitulate the amyloid deposition associated with the T2D etiology.

In conclusion, this study revealed for the first time that cell surface GAGs potentiate IAPP-induced cytotoxicity by directly contributing to plasma membrane permeabilization and disassembly. Therefore, membrane embedded PGs should be considered as much as the biochemical and physicochemical features of the lipid bilayer in understanding the toxicity mechanisms of IAPP. It will now be critical to evaluate if this proposed model can be extrapolated to other membrane-active amyloidogenic polypeptides, such as α -synuclein and A β peptide.

3.7 Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC; Grant 418614) and the Canada Research Chair program to S.B. N.Q. acknowledges a scholarship from the Center of Excellence in Research on Orphan Diseases - Courtois Foundation (CERMO-FC).

CHAPITRE IV

ARTICLE III

IDENTIFICATION OF A CONFORMATIONAL HEPARIN-RECOGNITION
MOTIF ON THE PEPTIDE HORMONE SECRETIN: KEY ROLE FOR CELL
SURFACE BINDING

Noé Quittot^{a,b}, Phuong Trang Nguyen^{a,b}, Armelle Tchoumi Nerée^{a,b}, Marc P. Lussier^a
and Steve Bourgault^{a,b}

^aDepartment of Chemistry, Pharmaqam, University of Québec in Montreal, Montreal,
QC, Canada, H3C 3P8,

^bQuebec Network for Research on Protein Function, Engineering, and Applications,
PROTEO, Canada

Manuscrit publié dans *Biochemical Journal*, 2017, 26;474(13):2249-2260

DOI: 10.1042/BCJ20170035

Contribution des auteurs:

Noé Quittot: Conception du projet, exécution des expériences (synthèse et purification de peptides, microscopie confocale, cytométrie en flux, chromatographie d'affinité, spectroscopie de dichroïsme circulaire, culture cellulaire), analyses des résultats, préparation des figures, rédaction de l'article.

Phuong Trang Nguyen: Exécution des expériences (synthèse et purification de peptides, résonance des plasmons de surface).

Armelle Tchoumi Nérée: Exécution des expériences (Titration calorimétrique isotherme, résonance des plasmons de surface).

Marc P. Lussier: Supervision du projet, correction de l'article.

Steve Bourgault: Supervision du projet, rédaction et correction de l'article.

4.1 Résumé

La sécrétine est une hormone peptidique qui exerce des fonctions physiologiques variées en se liant spécifiquement à son récepteur membranaire. Le modèle de la catalyse membranaire des interactions entre peptide et récepteur indique que les ligands peptidiques solubles interagissent initialement avec la membrane plasmique. Cette interaction augmente la concentration locale et structure le peptide, ce qui augmente le taux de liaison au récepteur. Toutefois, ce modèle ne tient pas en compte le dense réseau de glycosaminoglycanes (GAGs) à la surface des cellules eucaryotes. Ces chaînes de polysaccharides sulfatés sont connues pour séquestrer de nombreuses molécules de signalisation de nature protéique. Dans cette étude, nous avons évalué l'interaction entre l'hormone peptidique sécrétine et les GAGs sulfatés, et sa contribution à la liaison à la surface des cellules. En utilisant des cellules déficientes en GAGs et une expérience de compétition avec des GAGs solubles, nous avons observé par microscopie confocale et cytométrie en flux que les GAGs modulent la séquestration de la sécrétine à la surface des cellules. Le titrage calorimétrique isotherme et la résonance des plasmons de surface ont révélé que la sécrétine se lie à l'héparine avec des constantes de dissociation comprises entre 0,9 et 4 μM . En concevant des dérivés de la sécrétine avec un ensemble conformationnel restreint, nous avons observé que cette interaction est modulée par la présence d'un motif de reconnaissance conformationnel spécifique aux GAGs à la surface du peptide lors du repliement hélicoïdal. Cette étude identifie la sécrétine comme un nouveau polypeptide liant les GAGs et ouvre vers de nouvelles avenues de recherche sur le rôle fonctionnel des GAGs dans la biologie de la sécrétine.

4.2 Abstract

Secretin is a peptide hormone that exerts pleiotropic physiological functions by specifically binding to its cognate membrane-bound receptor. The membrane catalysis model of peptide-receptor interactions states that soluble peptidic ligands initially interact with the plasma membrane. This interaction increases the local concentration and structures the peptide, enhancing the rate of receptor binding. However, this model does not consider the dense network of glycosaminoglycans (GAGs) at the surface of eukaryotic cells. These sulfated polysaccharide chains are known to sequester numerous proteic signaling molecules. In this study, we evaluated the interaction between the peptide hormone secretin and sulfated GAGs and its contribution to cell surface binding. Using GAG-deficient cells and competition experiment with soluble GAGs, we observed by confocal microscopy and flow cytometry that GAGs mediate the sequestration of secretin at the cell surface. Isothermal titration calorimetry and surface plasmon resonance revealed that secretin binds to heparin with dissociation constants ranging between 0.9 and 4 μM . By designing secretin derivatives with a restricted conformational ensemble, we observed that this interaction is mediated by the presence of a specific conformational GAG-recognition motif that decorates the surface of the peptide upon helical folding. This study identifies secretin as a novel GAG-binding polypeptide and opens new research direction on the functional role of GAGs in the biology of secretin.

4.3 Introduction

The regulation of the activation level of plasma membrane receptors plays key physiological roles and these proteins constitute the target of over 50% of the drugs used in the clinics (Overington *et al.*, 2006). The conformational state of membrane receptors is modulated by a wide variety of chemically diverse ligands, from photons to large proteins (Gether, 2000). Hundreds of G-protein coupled receptors (GPCRs), the most abundant membrane-bound signaling receptors, are activated by peptide ligands, such as glucagon, oxytocin and secretin (Fredriksson *et al.*, 2003). These peptide hormones bind to their cognate receptors with very high selectivity and with dissociation constants within the low nanomolar range (Gether, 2000; Harmar, 2001). The peptide-receptor binding reaction is often described as an event with multiple sequential steps involving (i) interaction of the ligand with the membrane environment, (ii) cell surface accumulation and diffusion and (iii) receptor binding and activation (Bourgault *et al.*, 2009a; Inooka *et al.*, 2001; Langelaan et Rainey, 2010). This model originally proposed by Sargent and Schwyzer in 1986 (Sargent et Schwyzer, 1986), known as the membrane catalysis hypothesis, is still today applied to explain the mechanism of activation of a receptor by a peptidic ligand (Bourgault *et al.*, 2011a; Bourgault *et al.*, 2009b; Couvineau et Laburthe, 2012; Hoare, 2005; Hruby, 2002; Langelaan *et al.*, 2009; Langelaan et Rainey, 2009; Nanga *et al.*, 2009). This model is characterized by four key elements. (Langelaan et Rainey, 2010; Sargent et Schwyzer, 1986). First, a peptide more likely binds first to the outer leaflet of the membrane rather than directly to its cognate receptor as the protein occupies a very small surface area. Second, membrane adsorption amplifies the local concentration, increasing the rate of receptor binding. Third, upon adsorption, ligand diffusion becomes two-dimensional instead of three-dimensional, increasing peptide-receptor binding rates. Fourth, the lipidic membrane environment triggers a conformational conversion to a structure that prompts recognition by the receptor.

Although indirect experimental evidences support this model, the membrane catalysis hypothesis perceives the cell surface as a simple anionic/zwitterionic lipid bilayer and does not take into account the heterogeneity of the membrane environment. The surface of eukaryotic cell is decorated with a diversity of macromolecules, including a high density of (glyco)proteins and proteoglycans (PGs) (Bishop *et al.*, 2007). PGs are ubiquitously expressed on membrane and consist of highly-glycosylated membrane proteins comprising a protein core with covalently attached glycosaminoglycan (GAG) chain(s). Disaccharides form the basic subunit of a GAG chain, a long, linear and heterogeneous polysulfated polysaccharides that can reach up to 25 000 disaccharides (Handel *et al.*, 2005). GAGs, including chondroitin sulfate (CS) and heparan sulfate (HS), participate in many physiological functions such as organogenesis, cell adhesion, inflammation and cell signaling (Bernfield *et al.*, 1999; Handel *et al.*, 2005). Cell surface GAGs are known to sequester numerous proteic soluble ligands and to play an integral role in the biological activities of chemokines, cytokines and growth factors (19). Owing to the high density of sulfate and carboxylate groups on the GAG chains, PGs are highly negatively charged (Handel *et al.*, 2005). Thus, proteins that are known to bind GAGs display cationic-rich domain(s). Studies have revealed that the XBBXBX and XBBBXXBX sequences, in which B is a basic amino acid (Arg or Lys), is a common GAGs recognition motif for many GAGs-binding proteins (Cardin et Weintraub, 1989). Whereas the contributions of GAGs in the sequestration of numerous signaling proteins have been well-documented, the roles of GAGs in cell surface binding of peptide ligands, in the context of the membrane-catalysis hypothesis, have not been addressed so far.

Secretin is a 27-amino acid C-terminally amidated peptide that was first identified in jejunal mucosa extracts for its ability to stimulate pancreatic secretion (Bayliss et Starling, 1902). Secretin is widely expressed throughout the body and exerts a large array of biological activities, including regulation of bicarbonate secretion, modulation of water homeostasis as well as gastric acid secretion (Afroze *et al.*, 2013; Singh *et al.*,

2016). This hormone is a member of the secretin/glucagon/GHRH superfamily which includes a group of (neuro)peptides that share significant sequence and conformational homology (Tam *et al.*, 2014; Vaudry *et al.*, 2009). These peptide ligands mediate their biological functions by activating class B GPCRs (Chapter *et al.*, 2010). Pharmacological studies have revealed the existence of a single human secretin receptor, which is endogenously expressed by a number of organs including brain, pancreas, stomach, kidney and liver (Afroze *et al.*, 2013).

Owing to its net positive charge and wide conformational landscape, secretin can interact electrostatically with various polyanions located on the outer leaflet of eukaryotic cell membrane, including GAGs. We recently reported that glucagon and secretin bind avidly to a heparin-functionalized column and that the salt concentrations needed to elute these hormones were higher to than ones reported for chemokines and cytokines (Tchoumi Neree *et al.*, 2015). Nonetheless, the contribution of GAGs in the binding of peptide hormones to cell surface has not been addressed so far. In this study, we evaluated the roles of GAGs in cell surface adsorption/sequestration of secretin by means of GAG-deficient cells. By combining biophysical and chemical approaches, we observed that the affinity of secretin towards sulfated GAGs resides in the presence of a specific conformational heparin recognition motif.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Peptide synthesis, purification and characterization

Peptides were synthesized on a Tribute peptide synthesizer (Protein Technologies) with standard Fmoc chemistry using 2-(6-chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate (HCTU) as a coupling reagent and diisopropylethylamine (DIEA) as a base. Deprotection used 20% piperidine in DMF. For fluorescein labeling, Fmoc-Ahx-OH was first coupled at the N-terminus of each

peptidyl-resin. After Fmoc removal, a solution containing fluorescein isothiocyanate (FITC; 3 eq.), triethylamine (TEA; 3 eq.) in DCM:DMF (1:1) was added to the reaction vessel and was allowed to react overnight. FITC coupling was monitored using the ninhydrin test. Peptides were cleaved from the resin using a mixture of trifluoroacetic acid (TFA): ethanedithiol: phenol: water (92:2.5:3:2.5; v/v). After filtration and evaporation of the cleavage mixture, peptides were precipitated and washed with diethylether, solubilized in water and lyophilized. Crude peptides were purified by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a preparative Luna C₁₈ column (250 mm x 21.2 mm; 5µm, 100Å, Phenomenex using a linear gradient of acetonitrile (ACN) in H₂O/TFA (0.06% v/v). Collected fractions were analyzed by analytical RP-HPLC using an Aeris peptide XB C₁₈ column (150 mm x 4.6 mm; 3.6 µm, Phenomenex) and by ESI-TOF mass spectrometry. Fractions corresponding to the peptidic hormone, as confirmed by mass spectrometry, with purity higher than 95%, as measured by analytical HPLC, were pooled and lyophilized.

4.4.2 Cell culture

Chinese hamster ovary cells K1 (CHO K1; obtained from ATCC) and CHO pgs-A-745 (xylosyltransferase deficient cells; obtained from ATCC (Esko *et al.*, 1987)) were maintained in Ham's F12 medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and antibiotic antimycotic (10 000 UI/ml penicillin, and 10 000 UI/mL streptomycin). Cells were maintained as a monolayer at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air and passaged by trypsinization when the cells reached 70-80% confluence.

4.4.3 Evaluation of cell surface sequestration by flow cytometry

Cell surface adsorption was assessed using a protocol adapted from Gump *et al.* (Gump *et al.*, 2010). Briefly, CHO K1 and CHO pgs-A-745 were seeded in 12-well plates at a

density of 30 000 cells/well for 48 hours to approximately 75% confluence. Cells were pre-chilled for 10 min at 4°C in 1% FBS Ham's F12 medium (supplemented with glutamine and antibiotic/antimycotic) before being incubated in presence of different concentrations of fluorescein-labelled peptide for 15 min at 4°C. After incubation, cells were washed twice with ice-cold HBSS buffer and detached manually in 500 µL of complete Ham's F12 media supplemented with 10% FBS and cells were centrifuged for 5 min at 400 x g. Cells were suspended in ice-cold sorting buffer (Ca/Mg free PBS, 1 mM EDTA, 25 mM HEPES, 1% FBS) and kept on ice until flow cytometry analysis. Flow cytometry analyses were performed using a FACS Calibur instrument (BD Biosciences) and a minimum of 10 000 gated cells per sample were analyzed. The fluorescein-peptide was excited at 488 nm and emission was measured through a 530 nm filter. Data analysis was performed with the WinMDI software (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry).

4.4.4 Confocal microscopy

CHO K1 and CHO pgs-A-745 were seeded on coverslip placed in 6-well plates at a density of 150 000 cells/well for 48 hours to reach approximately 75% confluence. After removing the culture media, cells were incubated in 1% FBS Ham's F12 medium (supplemented with glutamine and antibiotic/antimycotic) for 10 min at 4°C. Cells were then treated with fluorescein-labelled peptides at 4°C for 15 min. After incubation, cells were washed twice with ice-cold PBS buffer and fixed with 4% formaldehyde for 10 min, then wash 3 times with PBS. The actin and nucleus of cells were stain with 1 unit/mL of Texas-Red-phalloidin and 100 ng/ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 25 minutes in the dark and cells were washed 3 times. Subcellular localization of FITC-conjugated secretin was analyzed using a confocal Nikon microscopy equipped with a 60x oil immersion objective was used. Images were captured and analyzed using Nikon imaging software.

4.4.5 Analytical heparin-affinity and ion-exchange chromatography

The relative binding affinity of the peptides for sulfated GAGs was evaluated using a 1 mL HiTrap Heparin HP column packed with Sepharose and immobilized heparin (GE Healthcare). The column was connected to a FPLC Aktapure system (GE Healthcare) and equilibrated with phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) prior to injection. A volume of 500 μ L of 0.5 mg/mL peptide solution was injected at a flow rate of 0.5 mL/min. After injection, the elution consisted of an isocratic step of 5 mL phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) followed by a gradient from 0 to 2 M NaCl in phosphate buffer (pH 7.4). Peptide elution was monitored using the absorbance at 230 nm whereas NaCl gradient was monitored with conductivity. For the cation exchange, a 1 mL HiTrap SP HP packed with sepharose functionalized with sulfopropyl was used under the conditions described above.

4.4.6 Circular dichroism spectroscopy

Far-ultraviolet circular dichroism (CD) spectra were recorded at 25°C using a Jasco J-810 CD spectrometer (Jasco). Secretin, without or with heparin was prepared in phosphate buffer (20 mM, pH 7.4). Heparin used in the present study was from porcine intestinal mucosa with an average molecular weight of 17 ± 2 kDa (Sigma-Aldrich). All spectra were measured from 260 to 190 nm and were corrected by subtracting the appropriate blank solution (with or without heparin). A 1 mm path length quartz cuvette was used.

4.4.7 Isothermal titration calorimetry

Measurements were performed using a Microcal VP-ITC (GE Healthcare). Lyophilized aliquots of peptides were dissolved in phosphate buffer (pH 7.4) at a final concentration of 100 μ M just before being injected into the calorimeter cell. Heparin

was prepared at a final concentration of 30 μM in phosphate buffer (pH 7.4). Titrations were performed by injecting 10 μL of the heparin solution (except for the initial 2 μL injection) into the peptide solution. The temperature was set at 25°C. Heats of dilution were measured by injecting heparin solution into the corresponding buffer and were included in the final analysis. Data analysis was done with the software package (Origin) provided by manufacturer. Data were fit to an independent set of multiple binding sites model.

4.4.8 Surface plasmon resonance

SPR analyses were performed using a Biacore T200 instrument (GE Healthcare). Heparin (average molecular weight of 17 kDa) was biotinylated with biotin- ϵ -aminocaproic acid N-hydroxysuccinimide ester (biotin-X-NHS) according to the protocol developed by Debbage (Debbage *et al.*, 1988). Biotinylated heparin in HBS-EP buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20, pH 7.4) was injected at 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 180s on a SA sensor chip, coated with carboxymethyl dextran and streptavidin. By this approach, approximately 150 resonance units of heparin were immobilized on the surface. Secretin and its derivatives were injected at a flow rate of 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 240 s at 25°C in 20 mM phosphate buffer, pH 7.4. Surface regeneration was performed with 2 M NaCl, with a flow rate of 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ and a contact time of 60s. Binding sensograms were obtained by subtraction of the reference flow cell (without heparin). Experiments were performed in duplicate and data analysis was performed using the BIAevaluation software package (GE Healthcare).

4.5 Results

4.5.1 GAGs mediate cell surface binding of secretin

We initially probed the contributions of GAGs in the adsorption/sequestration of secretin by flow cytometry and confocal microscopy. We used the CHO pgs-A-745 cells that are deficient in xylosyltransferase, an enzyme that catalyzes the transfer of a D-xylosyl group to the side chain of a serine residue, a key step in the synthesis of proteoglycans (Esko *et al.*, 1987). Therefore, these cells do not express any GAGs, HS and CS, on the outer leaflet of their plasma membrane. To monitor cell surface adsorption, secretin was labeled with fluorescein (FITC) at its N-terminal amine function. Cells were incubated in presence of secretin at 4°C for a short period of time in order to minimize cellular uptake. As previously reported, endocytosis is inhibited at 4°C and the fluorescence level correlates closely with peptide cell surface binding (Bechara *et al.*, 2013; Gump *et al.*, 2010; Tchoumi Neree *et al.*, 2014). By flow cytometry, pgs-A-745 cells were significantly less effective to adsorb and sequester secretin than their wild type counterpart (Figure 4.1A). The mean fluorescent intensity of cells was reduced by 70% for CHO pgs-A-745 cells when treated with 50 µM FITC-secretin. This effect was also observed at concentrations of 10 and 5 µM, for which peptide adsorption was 3-4 fold higher for CHO K1 (Figure 4.1B). These results were confirmed by confocal microscopy. As shown in Figure 1C, 10 µM labelled-secretin was barely detectable on GAGs-deficient cells whereas CHO K1 cells display high fluorescence. Z-stack reconstruction validated that under the conditions of our assay (4°C, 15 mins), the fluorescence signal was principally localized on the cell surface, *i.e.* on top of actin labelling with phalloidin (red).

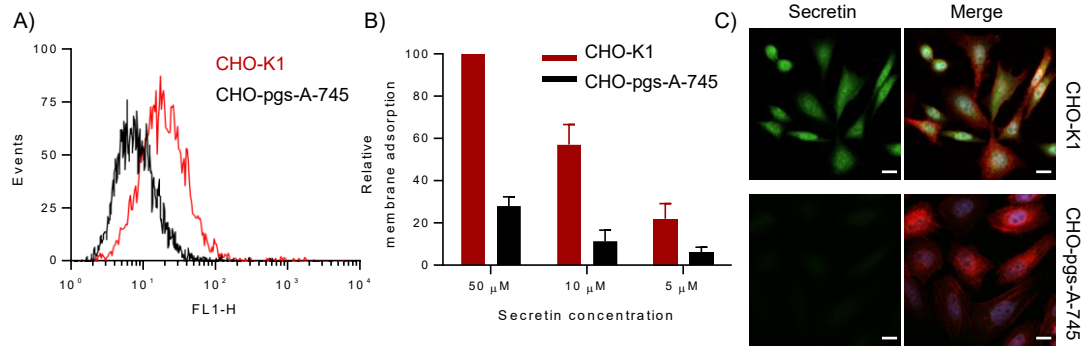


Figure 4.1. GAGs mediate cell surface binding of secretin. (A) Representative flow cytometry histograms showing cell surface sequestration of 10 μM secretin on CHO-K1 and CHO-pgs-A-745 cells. (B) Cell surface adsorption of secretin on CHO-K1 and CHO-pgs-A-745 cells. Data represent the relative mean fluorescence intensity (S.E.M.) of gated cells from at least 3 individual experiments and results are expressed as a percentage of the median fluorescence for 50 μM secretin on CHO-K1 cells. (C) Representative confocal microscopy images of cell surface adsorption of 10 μM secretin labelled with FITC on CHO-K1 and CHO-pgs-A-745 cells at 4°C and for 15 minutes. Scale bar: 10 μm .

We then performed a competition assay between cell surface GAGs and soluble sulfated GAGs. CHO K1 cells were first incubated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparin, used as a model of the sulfated domain of HS, for 5 mins before treatment with secretin. As measured by flow cytometry, the presence of heparin in culture media reduced membrane sequestration of secretin by over 70% (Figure 4.2A). Interestingly, the level of cell surface binding of secretin on CHO K1 cells in presence of soluble heparin was equivalent to the level observed for CHO pgs-A-745 cells, confirming the key roles of GAGs in cell surface adsorption. Confocal microscopy validated that the presence of heparin reduces binding of secretin at the cell surface (Figure 4.2B). Overall, these results indicate that GAGs mediate the adsorption/sequestration of the peptide hormone to the cell surface.

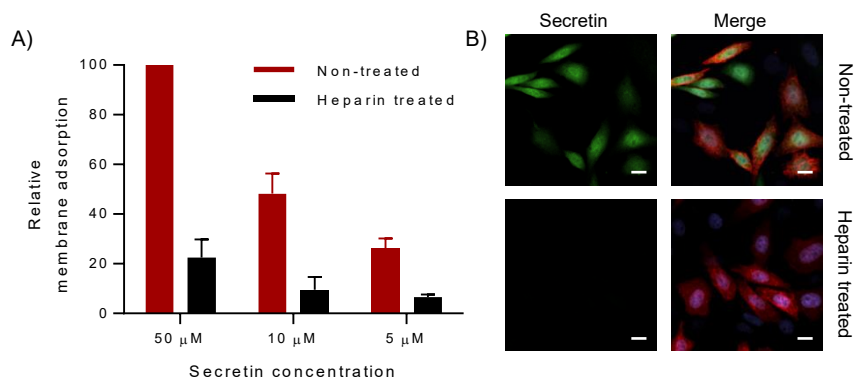


Figure 4.2. Soluble heparin inhibits cell surface binding of secretin. (A) Cellular sequestration of secretin on CHO-K1 in absence or in presence of heparin. Data represent the relative mean fluorescence intensity (\pm S.E.M.) of gated cells from at least 3 individual experiments and results are expressed as a percentage of the median fluorescence for 50 μ M secretin in absence of heparin. (B) Representative confocal microscopy images of cellular adsorption of 10 μ M secretin on CHO-K1 in presence or absence of heparin. Scale bar: 10 μ m.

4.5.2 Characterization of secretin–heparin interaction

There are many methods to characterize protein-GAG interactions. The most common method relies on the salt concentration required to elute the protein from a heparin sepharose column. As observed in Figure 4.3A, a concentration of over 1.7 M NaCl was needed to elute secretin from the heparin-functionalized column, indicating a strong electrostatic binding. This NaCl concentration is higher than the one reported for the majority of chemokines and growth factors known to interact *in vivo* with sulfated GAGs (Handel *et al.*, 2005). For instance, interleukin-8 needs a concentration of 0.6 M NaCl to be eluted whereas the basic fibroblast growth factor is eluted at 1.38 M NaCl (Kuschert *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 1994). We validated the specificity of the secretin-heparin interaction by injecting the peptide on a cation exchange column (sulfopropyl). Surprisingly, although secretin has a pI of 9.45 and a net charge of +2 at pH 7.4, the peptide was not retained by the column (Figure 4.3B). This low binding to the sulfopropyl column is most likely related to the salts of the PBS buffer that shield

the purely electrostatic interactions. These data indicate that the binding of secretin to heparin is not simply driven by nonspecific electrostatic forces.

The kinetics of secretin-heparin interaction was investigated by SPR. Heparin was biotinylated at its reducing-end (Debbage *et al.*, 1988) before being immobilized on a streptavidin (SA) coated sensor chip. Secretin was successively injected at increasing concentrations on the sensor chip at a flow rate of 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 240 s. The SPR binding sensorgrams of secretin-heparin interaction are shown in Figure 4.3C. These are characterized with fast association and dissociation rates, as previously reported for human interleukin-7 binding to immobilized heparin (Zhang *et al.*, 2012). The binding equilibrium dissociation constant ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}} = K_d$) was calculated at 0.89 μM . Figure 3D, top panel, shows a representative calorimetric heat flow trace obtained by the titration of heparin into secretin. The downward direction of the titration peaks indicates that binding of heparin to secretin is an exothermic reaction at 25°C. The integrated titration peaks (corrected for the heats of dilution) were fitted to a model of independent identical binding sites, where secretin was considered as the ligand, as previously described for the interaction of IAPP and melittin with GAGs (De Carufel *et al.*, 2013; Klocek et Seelig, 2008). The thermodynamics parameters obtained were an enthalpy of $\Delta H_{\text{secretin}} \approx -8.15$ kcal/mol and entropy of $-T\Delta S_{\text{secretin}} \approx 0.81$ kcal/mol. This suggests that the binding is driven by enthalpy, most likely through electrostatic interactions and hydrogen bonds. The obtained binding constant (K) of 2.44×10^5 M corresponds to a dissociation constant (K_d) of around 4.1 μM , suggestive of a moderate affinity of secretin for heparin. With the inverse of the midpoint of the transition, the binding stoichiometry (n) was evaluated at 32.4, providing an estimation of the number of secretin molecules bound per heparin molecule, based on an average molecular weight of 17 kDa for heparin. The dissociation constants obtained by ITC and SPR in the low micromolar range as well as the chromatography results indicate that the binding of secretin to heparin is tight.

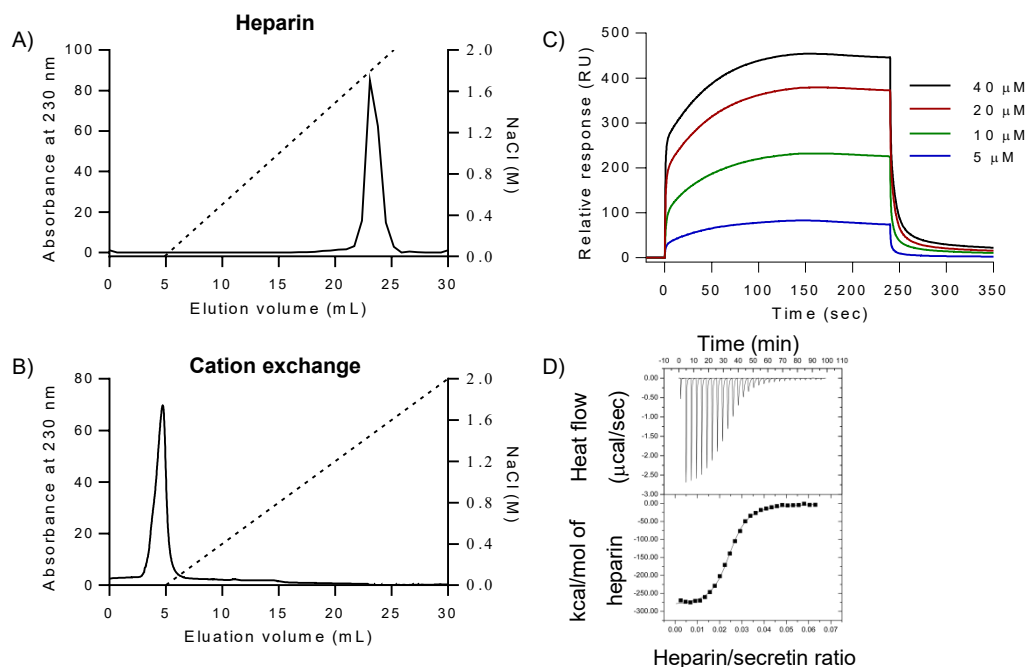


Figure 4.3. Characterization of secretin-heparin interaction. (A,B) Chromatograms of secretin with increasing NaCl concentration (dashed line) on a (A) heparin or (B) strong sulfopropyl cation exchange column. 500 μl of 0.5 mg/ml secretin was injected in phosphate buffer, pH 7.4. (C) SPR sensograms of secretin/heparin interaction. Secretin solutions were injected over immobilized biotinylated heparin on a streptavidin coated sensor chip in phosphate buffer, pH 7.4. (D) Titration of heparin into secretin. Top panel: calorimetric trace of reaction obtained at 25°C by the titration of heparin (30 μM) into a solution of secretin (100 μM) in phosphate buffer, pH 7.4. Bottom panel: heats of reaction were integrated from the calorimetric trace and plotted as a function of heparin/secretin molar ratio.

4.5.3 Heparin binding stabilizes secretin α -helical structure

In aqueous solution, secretin displays a secondary structure that is characterized by a short helical domain spanning from residues Thr-5 to Leu-14, whereas the N- and C-terminus segments are mainly disordered (Wray *et al.*, 1998). As for other class B GPCR peptide ligands, secretin adopts an α -helical conformation in presence of organic solvents and lipid micelles, commonly employed to mimic the lipophilic environment of the plasma membrane (Bourgault *et al.*, 2009a). Studies have revealed

that the binding of cationic peptides to GAGs, such as the lytic peptide melittin (Klocek et Seelig, 2008), the cell-penetrating peptide (CPP) penetratin (Bechara *et al.*, 2013) and the neurohormone PACAP (Tchoumi Neree *et al.*, 2014), triggers a random coil- α -helix conformational conversion. We evaluated if upon binding to sulfated GAGs secretin undergoes a structural transition towards an extended α -helix. By circular dichroism spectroscopy (CD), secretin spectrum displays two minima at 205 and 222 nm and a single maximum at around 190 nm, indicative of a partial helical secondary structure in aqueous solution (Figure 4.4A). In presence of heparin, the helical structure of secretin is drastically stabilized, as shown with the red-shift of the minima from 205 to 208 nm and the increases of the negative ellipticity at 222 nm and of the positive ellipticity at 192 nm. Thus, upon binding to sulfated GAGs, secretin undergoes a secondary conformational conversion into a well-defined α -helix, a structure closely related to its biological active conformation (Tam *et al.*, 2014).

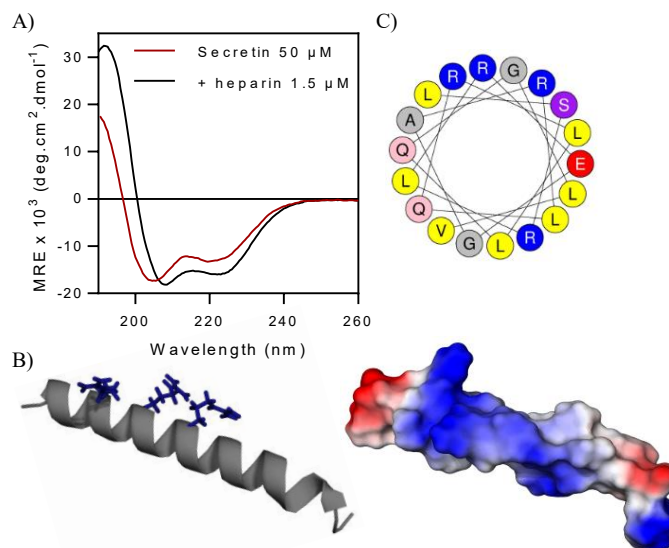


Figure 4.4. Binding of secretin to heparin stabilizes α -helical conformation. (A) Circular dichroism spectra of secretin (50 μM) in absence or in presence of heparin (1.5 μM) in phosphate buffer, pH 7.4. (B) Schematic ribbon representation of secretin helical secondary structure showing the side chain of residues Arg-14, Arg-18 and Arg-21 and surface representation colored according to the electrostatic potential with positive and negative regions in blue and red, respectively. (C) Helical wheel representation of the putative α -helical segment of secretin (10-27) with basic residues indicated in blue.

4.5.4 Identification of a conformational heparin-binding motif

The high affinity between secretin and sulfated GAGs observed by affinity chromatography, ITC and SPR is intriguing since the sequence of secretin (HSDGTFTSELSRLLREGARLQRLQGLV) does not encompass any heparin-binding domain. Secretin is a slightly cationic peptide with a net charge of +2 at physiological pH and comprises four Arg residues. Strikingly, upon folding into a helical secondary structure, the Arg residues in positions 14, 18 and 21 are located on the same face of the α -helix (Figure 4.4B). Surface representation of the electrostatic potential highlights the presence of a cationic-rich domain. Moreover, helical wheel representation of the putative α -helix segment of secretin clearly shows the formation of a conformational heparin-binding motif that includes residues L¹⁰, R²¹, R¹⁴, G²⁵ and

R¹⁸ (Figure 4.4C). This tri-dimensional epitope could explain the good affinity of secretin towards sulfated GAGs and the key contributions of GAGs in cell surface sequestration.

To probe this hypothesis, we initially designed 3 secretin analogs in which two adjacent amino acids of the helical segment were substituted by their D-enantiomers. Successive double D-substitutions introduced in a helical region result in local disturbance of the α -helix, without modifying other properties of the peptide such as hydrophobicity and net charge (De Carufel *et al.*, 2015; Tchoumi Neree *et al.*, 2014; Wieprecht *et al.*, 1996). Taking into account that the α -helix of secretin, in structure-inducing environment, spanned over the central domain, we successively introduced the D-amino acids at positions 11-12, 13-14 and 18-19. As revealed by CD spectroscopy, the 3 D,D-derivatives display predominantly a random coil conformation (Figure 4.5A). In presence of a high concentration of heparin (50 μ M), [D-Leu¹⁰, D-Ser¹¹]secretin and [D-Leu¹³, D-Arg¹⁴]secretin adopt a partially helical conformation whereas [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹] secretin remains in random coil (Figure 4.6).

We then evaluated the binding affinity of these helically-frustrated secretin analogs by ITC, SPR and affinity chromatography. Under the conditions employed for secretin, ITC experiments revealed that D,D-peptides interact weakly with heparin (Figure 4.7). Similarly, sensograms obtained by SPR revealed poor binding of these 3 derivatives towards immobilized heparin (Figure 4.5B). By affinity chromatography, we observed that hindering secretin helical folding precludes its binding to the heparin-functionalized sepharose resin. Indeed, [D-Leu¹⁰, D-Ser¹¹], [D-Leu¹³, D-Arg¹⁴] and [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin were eluted from the column with a NaCl concentration of 0.3 M whereas native secretin was eluted at over 1.7 M NaCl (Figure 4.5C vs Figure 4.3A). These results indicate that the GAG-binding motif of secretin is encrypted within its tridimensional conformation and not simply in the linear disposition of positively charged Arg residues.

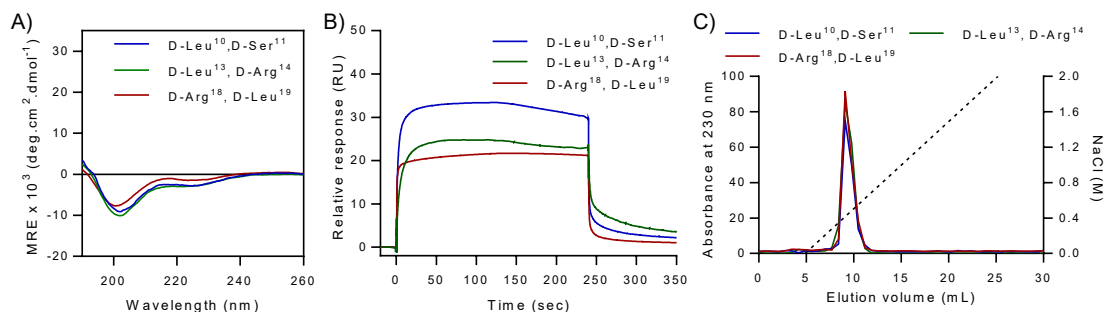


Figure 4.5. Destabilization of secretin α -helix inhibits binding to sulfated GAGs. (A) Circular dichroism spectra of [D-Leu¹⁰, D-Ser¹¹], [D-Leu¹³, D-Arg¹⁴] and [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin at 50 μ M in phosphate buffer, pH 7.4. (B) SPR sensograms of D,D-secretin derivatives / heparin interaction. Peptide solutions (50 μ M) were injected over immobilized biotinylated-heparin on a SA-sensor chip in phosphate buffer, pH 7.4. (C) Superimposed chromatograms of secretin derivatives with increasing NaCl concentration (dashed line) on a sepharose heparin column. 500 μ l of 0.5 mg/ml peptides were injected in phosphate buffer, pH 7.4.

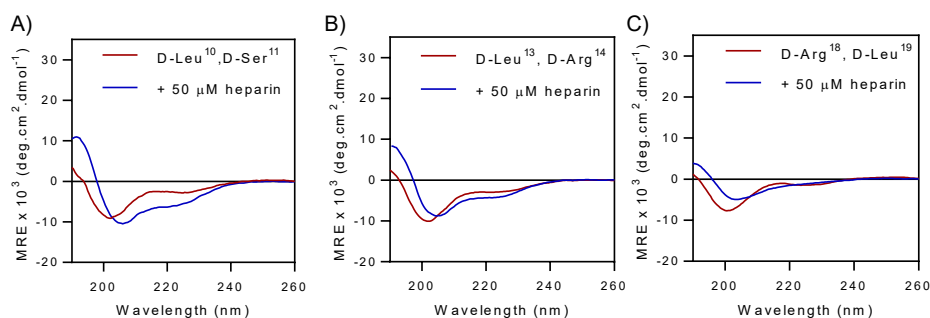


Figure 4.6. Conformational transition of secretin derivatives induced by heparin. Circular dichroism spectra of (A) [D-Leu¹⁰, D-Ser¹¹]secretin, (B) [D-Leu¹³, D-Arg¹⁴]secretin and (C) [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin at 50 μ M in absence (red) and in presence of 50 μ M heparin (blue).

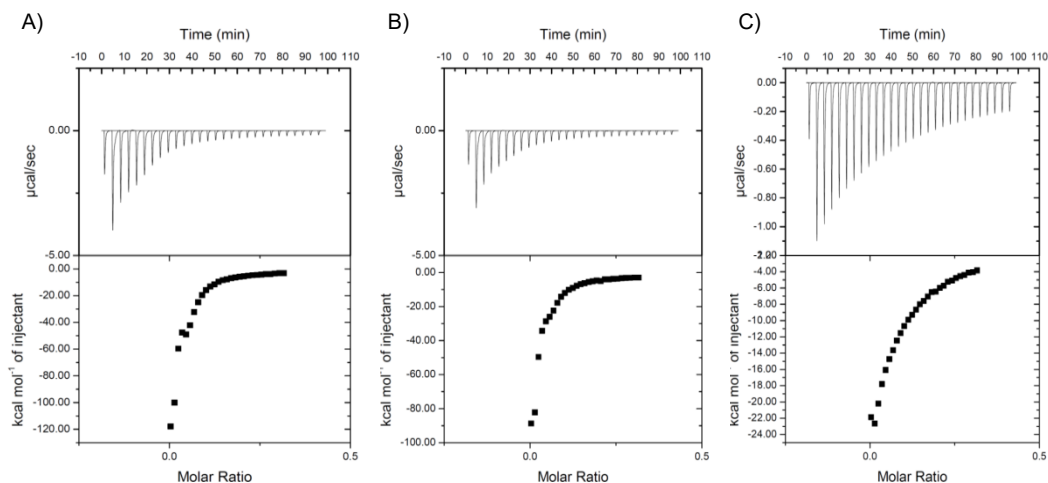


Figure 4.7. Binding of secretin derivatives to heparin by isothermal titration calorimetry. Titration of heparin into (A) [D-Leu¹⁰, D-Ser¹¹]secretin, (B) [D-Leu¹³, D-Arg¹⁴]secretin and (C) [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin. (A,B,C) Top panels: calorimetric trace of reaction obtained at 25°C by the titration of 30 µM heparin into a secretin solution (100 µM) in phosphate buffer, pH 7.4. Bottom panels: heats of reaction were integrated from the calorimetric trace and plotted as a function of heparin/secretin molar ratio.

To validate this hypothesis and to evaluate how individual Arg contributes to heparin binding, 4 secretin analogs in which each Arg residues were successively substituted by Ala were prepared and binding was evaluated by affinity chromatography. As observed in Figure 4.8, R12A secretin exhibits a similar binding affinity towards heparin compared to its WT counterpart. In contrast, the R14A and R18A derivatives were eluted from the heparin column at lower NaCl concentration compared to WT secretin, around 1.1 M NaCl. The R21A mutant was eluted at 0.9 M NaCl, indicating a major contribution of Arg-21 side chain in GAG-binding. Thus, these data confirm that the Arg-14, Arg-18 and Arg-21 are mediating the binding of secretin to heparin whereas Arg-12, located on the other face of the α -helix is not part of the heparin-binding domain.

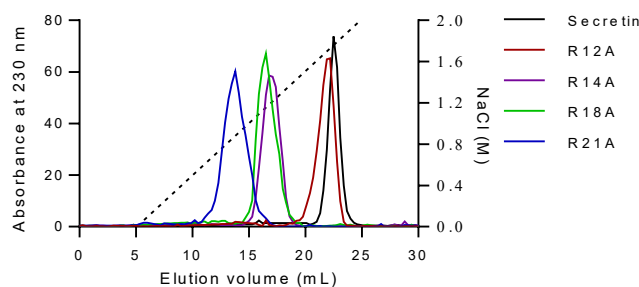


Figure 4.8. Contribution of individual Arg residues in binding to heparin. Superimposed chromatograms of secretin and R12A, R14A, R18A and R21A mutants with increasing NaCl concentration (dashed line) on a sepharose heparin column. 500 μ l of 0.5 mg/ml peptides were injected in phosphate buffer, pH 7.4.

4.5.5 Role of secretin secondary conformation for GAG-mediated cell surface binding

We evaluated the contribution of this 3-dimensional GAG-recognition motif in cell surface binding by measuring the sequestration of the fluorescently labelled [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin. Flow cytometry analysis revealed that [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin was significantly less absorbed compared to its wildtype counterpart to the cell surface of CHO K1 at concentrations ranging from 50 to 5 μ M (Figure 4.9A). Interestingly, the relative level of cell surface binding of [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin was in the same order of that secretin on pgs-A-745 (Figure 4.9A vs Figure 4.1A). Moreover, in GAGs-defective CHO pgs-A-745 cells, cell surface sequestration of secretin was similar to the adsorption of the helical-deficient secretin derivative (Figure 4.9B). This indicates that GAGs-independent membrane adsorption of secretin is not affected by inhibiting helical folding. In contrast, GAGs-mediated sequestration is suppressed by hindering the formation of a tri-dimensional heparin binding surface on secretin. These data emphasize the key contribution of GAGs in the cellular adsorption of secretin and indicate that the binding of secretin to sulfated GAGs is specific.

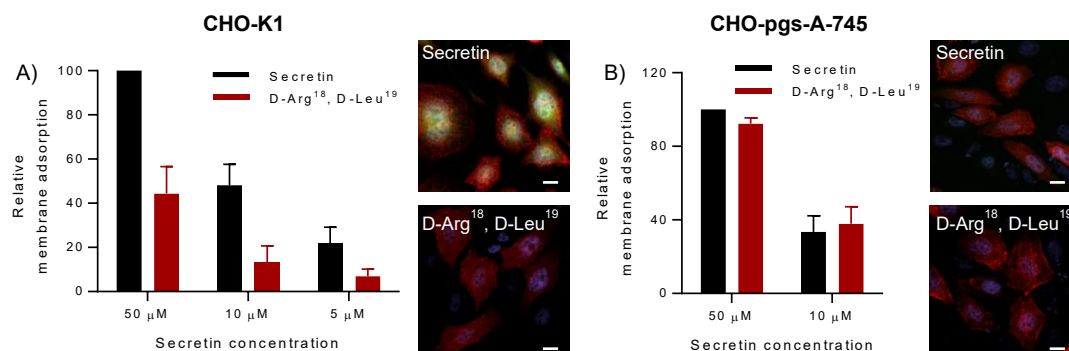


Figure 4.9. Role of secretin α -helical structure in cell surface binding. Cellular sequestration of secretin and [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin on CHO-K1 (A) and CHO-pgs-A-745 cells (B). A,B) Data represent the relative mean fluorescence intensity (S.E.M.) of gated cells from at least 3 individual experiments and results are expressed as a percentage of the median fluorescence for 50 μ M secretin on cells. A,B) Representative confocal microscopy. Scale bar: 10 μ m.

4.6 Discussion

Over the last two decades, the interaction of peptides with GAGs has been abundantly studied in the context of the cellular uptake of CPPs (Favretto *et al.*, 2014) and of the formation of amyloid fibrils (Quittot *et al.*, 2017). In contrast, the interaction of peptide hormones with sulfated GAGs and its significance on the stability, conformation and cell surface sequestration have been poorly addressed so far. Although secretin was characterized over 40 years ago (Mutt *et al.*, 1970), uncertainties in the understanding of the mechanism of receptor binding remain. The model describing that the membrane lipid phase acts as a catalyst for peptide-receptor interactions (Langelaan et Rainey, 2010; Sargent et Schwyzer, 1986) is attractive to explain the sequential steps that lead to secretin binding to its GPCR. However, this model does not recapitulate the complexity of the microenvironment of the cell surface, including the high density of sulfated GAGs.

In this study, by means of GAG-deficient cells and competition experiment with soluble heparin, we observed that the adsorption of secretin to the cell surface is mainly

mediated by sulfated GAGs whereas other anionic components of the plasma membrane, such as sialic acid-glycoproteins and anionic lipids, play a negligible role. In contrast to cationic CPPs where GAG-mediated cell surface binding leads to cellular uptake, secretin is poorly internalized when incubated at 37°C for longer period (Tchoumi Neree *et al.*, 2015). Principally, we demonstrated that this strong interaction is mediated by the presence of a conformational heparin-recognition motif. Whereas residues Arg-14, Arg-18 and Arg-21 are somewhat distant in secretin primary structure, they cluster to define a potential GAG interaction surface upon helical folding. Preventing the formation of an α -helix without altering the net charge and hydrophobicity of the peptide with the incorporation of two consecutive D-amino acids revealed that the high affinity recognition of GAGs by secretin is specifically mediated by the spatial orientation of these 3 Arg side chains. Taking into account the solution conformation of heparin (PDB: 1HPN (Mulloy *et al.*, 1993)), these guanidinium groups are perfectly positioned upon secretin helical folding to interact with the sulfate moieties of heparan sulfate/heparin. Such high affinity heparin-binding site that is dependent on a helical secondary structure has been reported for the apolipoprotein B-100 (Mulloy *et al.*, 1993) and the chemokine lymphotactin (Peterson *et al.*, 2004). Besides, we conducted a sequence database search (basic local alignment search tool; BLAST) to identify proteins with sequence homology with the fragment 13-23 of secretin (LRQGARLQRL), which encompasses this conformational heparin binding motif. Interestingly, the apolipoprotein L contains a high sequence homology and many apolipoproteins (E4, E7 and B-100) are known to interact with sulfated GAGs (Dong *et al.*, 2011; Mulloy *et al.*, 1993; Yamamura *et al.*, 1999). However, the binding of apolipoprotein L to sulfated GAGs has not been reported so far.

PGs are recognized as a storage site for many signaling proteins in the extracellular matrix and the basement membrane (Handel *et al.*, 2005). As observed by flow cytometry and confocal microscopy, the interaction of soluble secretin with membrane-bound PGs increases the local concentration of the peptide ligand at the cell surface

and this could have major biological significance. For instance, binding to GAGs leads to enrichment, accumulation and/or sequestration of secretin at the cell surface. This allows the establishment of a gradient of concentration that can affect the kinetics of receptor binding. The affinity between sulfated GAGs and secretin in the low micromolar range reported in the present study, is around 3-log higher than the affinity of peptide ligands towards their cognate GPCR(s) (Hoare, 2005). Thus, surface accumulation of secretin through electrostatic attraction and hydrogen bonding with PGs would be a very effective mechanism to enhance subsequent kinetics of receptor binding. Moreover, as a linear and partially random coil peptide, secretin undergoes rapid enzymatic degradation after its introduction in the systemic circulation. Members of the secretin/glucagon/GHRH superfamily exhibit short blood half-life: GLP-1 and PACAP showing plasmatic half-lives of less than 2 mins (Bourgault *et al.*, 2008; Knudsen, 2004; Zhu *et al.*, 2003). Accordingly, binding of secretin to the polysaccharide motifs of PGs and its sequestration from the circulation could extend the biological activity of secretin by hindering its cleavage by proteolytic enzymes and/or its elimination from the circulation.

PGs are known for their capacity of modulating receptor binding and signal transduction of chemokines by acting as co-receptor and presenting the signaling proteins to the receptor (Handel *et al.*, 2005). However, in view of the molecular size of secretin and the fact that the pharmacophores of secretin are spread throughout the sequence of the ligand (Singh *et al.*, 2016), this mechanism is unlikely applicable to secretin. For instance, residues Arg-18 and Arg-21, which are putative residues of the heparin-binding motif characterized in this paper, were proposed to make direct contact with the secretin receptor (Dong *et al.*, 2008).

Considering the high GAG density on eukaryotic cells and the affinity of secretin for sulfated GAGs, it appears more likely, in the context of the membrane catalysis hypothesis, that cell surface binding is mediated by the polysaccharide motifs of PGs

and not directly by the lipid phase of the membrane. In eukaryotic cells, the fraction of anionic lipids is usually lower than 10% (Güttler et Clausen, 1969; Pankov *et al.*, 2006; Ziegler et Seelig, 2008). Particularly, lipids are not distributed symmetrically across the two sides of the membrane bilayer and in healthy mammalian cells, anionic lipids are mainly localized on the cytosolic leaflet of the plasma membrane (Devaux, 1991; Martin *et al.*, 1995; Ziegler et Seelig, 2008). Thus, as suggested for cationic CPPs (Favretto *et al.*, 2014; Ziegler et Seelig, 2008) and according to the net positive charge and low hydrophobicity of secretin, binding of secretin to GAGs is certainly more probable than direct adsorption of the peptide to the lipid bilayer. In elucidating the structure-activity relationships (SAR) of peptide hormones, researchers have so far exclusively focused on the structure of the peptide in lipid-membrane environment to recapitulate the conformation which is recognized by the receptor. We observed that upon binding to GAGs, the secondary structure of secretin is stabilized into a well-defined α -helix, a conformation closely related to its bioactive structure (Robinson *et al.*, 1982). It is likely that this GAG-induced helical conformation provides a biofunctional scaffold for increasing the kinetics of receptor binding.

The binding model presented here opens new research directions on the functional role of GAGs in the biology of secretin and provides key insights for further functional characterization. This study highlights that peptide hormone-GAG interactions need to be considered when studying peptidic ligands and that the membrane catalysis hypothesis should be revisited to introduce the contributions of PGs.

4.7 Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to S.B. [418614].

CHAPITRE V

DISCUSSION

Les ligands peptidiques des RCPG de la classe B, qui affichent un large ensemble conformationnel, sont soumis à de nombreux réarrangements de structure secondaire, tertiaire et quaternaire. Ces conversions structurales pouvant être modulées par l'environnement et les interactions moléculaires, sont au cœur de leurs fonctions biologiques, aussi bien physiologiques que pathologiques. Toutefois, à ce jour, soit plus d'un siècle depuis la découverte de la première hormone peptidique en 1902 (Bayliss et Starling, 1902), de nombreuses questions subsistent quant à la relation entre les modulations conformationnelles et l'environnement de ces hormones. En effet, dans un contexte physiologique, la modulation de la structure secondaire permet au peptide d'adopter une conformation bioactive précise, permettant d'exercer une activité biologique. Selon l'hypothèse de la catalyse membranaire, l'environnement de la membrane plasmique permettrait d'induire des modulations conformationnelles vers la conformation bioactive (Sargent et Schwyzer, 1986). Cependant, cette hypothèse ne prend pas en considération la présence des GAGs à la surface des cellules qui pourraient, au vue de leur localisation, interagir avec les hormones peptidiques et induire un changement conformationnel. Par ailleurs, dans un contexte pathologique, la propension des ligands peptidiques des RCPG de la classe B à s'auto-assembler peut conduire à la formation de dépôts amyloïdes (Chiti et Dobson, 2017). La formation de ces dépôts implique de nombreux réarrangements conformationnels, aussi bien au niveau de la structure secondaire que quaternaire et dont les mécanismes et les cinétiques demeurent à éclaircir. De plus, ces modifications structurales se produisent

au sein d'un environnement biologique hétérogène et complexe, et de nombreux cofacteurs se retrouvent associés aux dépôts amyloïdes, tels que les ions métalliques, les lipides, des protéines et les GAGs (Nguyen *et al.*, 2015). Notamment, les GAGs se retrouvent intrinsèquement associés aux dépôts amyloïdes et accélèrent *in vitro* la formation de fibres amyloïdes (Iannuzzi *et al.*, 2015; Quittot *et al.*, 2017). Cependant, le rôle des GAGs dans le processus d'auto-assemblage de peptides amyloïdogéniques dans un environnement biologique complexe reste à élucider. D'autre part, la contribution des GAGs dans les mécanismes de cytotoxicité associés à l'auto-assemblage demeure inconnue. Dans ce contexte, les travaux de recherche de cette thèse avaient pour premier objectif de développer des outils chimiques pour étudier les modulations conformationnelles quaternaires d'hormones peptidiques prônes à l'agrégation. Un second objectif visait à déterminer la contribution des GAGs situés à la surface de la membrane plasmique sur les réarrangements conformationnels de peptides amyloïdogéniques et de la perturbation membranaire associée. Finalement, cette thèse avait pour troisième et dernier objectif l'évaluation de la contribution des GAGs au sein de l'hypothèse de la catalyse membranaire.

5.1 Utilisation d'une sonde fluorogénique pour étudier la cinétique et le mécanisme de l'auto-assemblage de l'IAPP

La forte propension à l'auto-assemblage de nombreux polypeptides conduit à la formation de fibres amyloïdes, dont la déposition tissulaire peut être associée à de nombreuses maladies, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie d'Huntington ou le DTII (Benson *et al.*, 2018). Bien que les fibres amyloïdes aient longtemps été considérées comme des espèces cytotoxiques, l'hypothèse des oligomères toxiques suggère que les intermédiaires oligomériques de la cascade amyloïdogénique sont les espèces toxiques (Iadanza *et al.*, 2018). Toutefois, un doute subsiste encore quant à la nature de la toxicité qui pourrait provenir d'une conformation oligomérique précise et/ou du processus d'auto-assemblage en lui-même. La nature transitoire et le large

ensemble conformationnel des espèces intermédiaires rendent leurs études complexes (Moore *et al.*, 2018; Nagel-Steger *et al.*, 2016). De ce fait, la compréhension fine du mécanisme de l'auto-assemblage, d'un point de vue cinétique aussi bien que d'un point de vue structural, revêt un intérêt crucial pour prévenir leur agrégation. Dans ce contexte, nous avons comme premier objectif de développer des outils chimiques afin d'obtenir simultanément de nouvelles données sur la cinétique d'auto-assemblage et l'ensemble conformationnel et ce, en ciblant les espèces pré-fibrillaires.

Les cinétiques d'auto-assemblage de nombreux polypeptides amyloïdogéniques restent majoritairement étudiées à l'aide de la sonde ThT, qui se lie aux structures riches en feuillets- β -croisés caractéristiques des structures amyloïdes (Biancalana et Koide, 2010; LeVine, 1993). Ainsi, l'essai basé sur la fluorescence de la ThT ne permet pas la détection des espèces intermédiaires oligomériques. De plus, une sonde fluorogénique a récemment été développée et permet de suivre la cinétique de formation de fibres amyloïdes de l'IAPP mais ne renseigne pas sur la cinétique d'oligomérisation (Chen *et al.*, 2020). Pour pallier à ce problème, une nouvelle approche basée sur la reconnaissance d'un motif tetracystéique par la sonde FIAsh a été mise en place en 2011 (Lee *et al.*, 2011). En effet, cette sonde a été utilisée avec le peptide A β où l'incorporation d'un motif Cys-Cys à l'extrémité N-terminale du peptide a permis la formation d'un motif tetracystéique non-contigu lors de l'oligomérisation, permettant de suivre l'auto-assemblage dès les premiers instants. De façon intéressante, l'IAPP présente l'avantage de contenir deux cystéines endogènes aux positions 2 et 7. Par l'utilisation de cet essai, il a été montré qu'une augmentation de la fluorescence de la sonde FIAsh se produisait dès les premiers instants de l'auto-assemblage de l'IAPP (Wang *et al.*, 2017). Cependant, dans cette étude précédente à nos travaux, les auteurs ont omis d'ajouter à leur essai la présence d'une espèce thiolique pour entrer en compétition avec le motif tetra cystéique néoformé pour la liaison du FIAsh. Ainsi, le signal de fluorescence obtenu par ces auteurs ne reflète pas la formation d'un motif tetracystéique stable. Dans notre étude, par l'ajout du compétiteur thiolique BAL, nous

avons pu valider la présence d'un motif tetra-cystéique stable au sein des fibres amyloïdes formées par l'IAPP sauvage. Ce résultat suggère que les extrémités N-terminales sont proches au sein de la structure fibrillaire, ce qui corrèle avec la structure des fibres amyloïdes de l'IAPP obtenue par RMN à l'état solide (Luca *et al.*, 2007). Dans un second temps, contrairement à l'étude de Wang *et al.*, nous avons montré que les cystéines en position 2 et 7 ne forment pas un motif tetra-cystéique stable lors de l'oligomérisation, ne permettant donc pas d'étudier la formation des espèces préfibrillaires. Pour évaluer l'oligomérisation de l'IAPP via l'essai FAsH, la stratégie adoptée fut d'incorporer par synthèse chimique deux cystéines adjacentes dans la structure primaire de l'IAPP, soit successivement à l'extrémité N- et C-terminale. Grâce à cette approche, il a pu être mis en évidence que les espèces préfibrillaires de l'IAPP présentant un motif Cys-Cys à l'extrémité C-terminale induisaient une augmentation de la fluorescence de la sonde FAsH, et qui était conservée lors de la formation de fibres amyloïdes. De plus, un essai de compétition pour la liaison du motif tetra-cystéique entre la sonde FAsH et des concentrations croissantes du compétiteur thiolique, BAL, a permis de valider la présence d'un motif tetra-cystéique stable formé par les Cys-Cys à l'extrémité C-terminale. Nos résultats indiquent donc un rapprochement des régions C-terminales lors de l'oligomérisation de l'IAPP. De façon intéressante, des études sur la dimérisation de l'IAPP montrent que la région 20-29 forme des brins beta parallèles qui pourrait induire le bon positionnement du motif Cys-Cys à l'extrémité C-terminale pour la reformation du motif tetracystéique (Buchanan *et al.*, 2013; Chiu et de Pablo, 2015; Dupuis *et al.*, 2011b). Toutefois, il faut prendre en considération que les espèces préfibrillaires formées dans notre étude sont plus larges que des dimères, tel qu'il a été montré par PICUP, DLS et AFM, ce qui pourrait donc impliquer la présence d'autres structures quaternaires. Par ailleurs, il a été montré par *replica exchange molecular dynamics* (REMD) qu'une des voies possibles de l'auto-assemblage de l'IAPP implique l'association de deux brins β parallèles formés par la région 31-37 (Buchanan *et al.*, 2018). Notre étude permet de réévaluer le mécanisme d'auto-assemblage de l'IAPP. En effet, actuellement le mécanisme d'auto-assemblage

de l'IAPP est considéré comme un mécanisme de polymérisation nucléée où la formation d'un noyau oligomérique compétent précède l'élongation. Cependant, en considérant les résultats de cette étude, nous proposons que l'IAPP suit un mécanisme de conversion conformationnelle, où une formation oligomérique stable précoce précède la formation de fibres, tel qu'il a été proposé pour le peptide A β (Lee *et al.*, 2011).

De façon similaire à l'essai réalisé en présence de l'IAPP humain, l'incorporation du motif Cys-Cys à l'extrémité C-terminale a permis de suivre pour la première fois l'oligomérisation du rIAPP, pourtant connu pour être faiblement amyloïdogénique (Westermarck *et al.*, 1990). En effet, l'isoforme de l'IAPP de rat diffère de 6 acides aminés par rapport à celle de l'humain, incluant 3 prolines (A25P, S28P et S29P), qui sont reconnues pour déstabiliser les structures en feuillets- β . De façon intéressante, une stratégie utilisée pour inhiber l'auto-assemblage de l'IAPP fut de substituer dans la séquence de l'IAPP humain les trois prolines issues de la séquence du rat pour donner un analogue non-amyloïdogénique, nommé le pramlintide (Kruger et Gloster, 2004). Cependant, cet analogue affiche la capacité de s'auto-assembler (Łoboda et Rowińska-Żyrek, 2017) et présente une faible solubilité à pH physiologique (Frigori, 2017) et peut former des fibres amyloïdes sous certaines conditions (da Silva *et al.*, 2016). De plus, une étude récente a montré, par des essais ThT, que la substitution S28P était la plus critique pour réduire la formation de fibres (Ridgway *et al.*, 2020). Cependant, les auteurs ont montré par spectrométrie de masse à mobilité ionique et par PICUP que cet analogue peut s'auto-assembler. Ainsi, l'essai basé sur la sonde fluorogénique FIAsh couplé à la stratégie de déplacement du motif Cys-Cys pourrait être une nouvelle approche pour évaluer les modulations conformationnelles quaternaire de peptides faiblement amyloïgéniques, ce qui permettrait d'affiner le développement d'inhibiteurs peptidiques de la formation de fibres amyloïdes

En plus des stratégies thérapeutiques à partir d'analogues de l'IAPP, de nombreuses petites molécules ont été proposées pour inhiber la formation de fibres amyloïdes (Dhouafli *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2020). À ce jour, l'essai ThT reste majoritairement utilisé pour évaluer l'effet d'un inhibiteur sur la cinétique de l'auto-assemblage de polypeptides amyloïdogéniques (Sun *et al.*, 2020). Cependant, il a été montré que des petites molécules, comme la rifampicine et le resvératrol, peuvent interagir avec la ThT, diminuant ainsi le signal de fluorescence (Meng *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2015). En proposant d'évaluer l'effet de ces inhibiteurs via l'essai basé sur la sonde fluorogénique FAsH, nous avons pu valider que ces molécules n'inhibaient que faiblement l'auto-assemblage de l'IAPP. Ainsi, l'essai FAsH constitue un nouvel essai pour évaluer les inhibiteurs de la formation de fibres amyloïdes.

Nos travaux ont montré qu'un essai basé sur la fluorescence de la sonde fluorogénique FAsH permettait d'évaluer les modulations quaternaires de l'IAPP. En plus de l'IAPP, d'autres membres de la famille des ligands RCPG de la classe B sont prônes à l'agrégation et présentent deux cystéines naturelles dans la région N-terminale, telle que la calcitonine (Thomas *et al.*, 2019), et l' α CGRP (Tsiolaki *et al.*, 2018). En outre, les modulations quaternaires d'hormones peptidiques peuvent mener à la formation d'amyloïdes fonctionnels pour laquelle l'essai FAsH pourrait renseigner sur les cinétiques d'auto-assemblage.

Finalement, l'essai basé sur la sonde FAsH, en comparaison à l'essai ThT, repose sur un site de liaison spécifique et peut donc être réalisé dans un environnement hétérogène et complexe. Ici, nous avons montré la possibilité de suivre l'auto-assemblage amyloïde en présence de co-facteurs comme l'héparine ou de membranes modèles synthétiques. Ainsi, cet essai peut être développé pour l'étude des modulations conformationnelles de peptides amyloïdogéniques dans des environnements biologiques complexes, tel qu'il sera évoqué dans la section suivante.

5.2 Contributions des glycosaminoglycanes dans la perturbation membranaire induite par l'IAPP

Le dépôt tissulaire de fibres amyloïdes se déroule dans un environnement biologique complexe. Ainsi, les modulations conformationnelles des hormones peptidiques sont grandement influencées par leur environnement, tels que la présence de GAGs (Nguyen *et al.*, 2015; Tomasello *et al.*, 2015). Notamment, les dépôts amyloïdes extraits de patients sont toujours associés aux GAGs (Iannuzzi *et al.*, 2015; Quittot *et al.*, 2017). Par ailleurs, de nombreuses études *in vitro* ont montré que les GAGs accélèrent le processus de formation de fibres amyloïdes de nombreux peptides amyloïdogéniques (Quittot *et al.*, 2017). De plus, il a été montré sur des cellules en culture, ou des tissus, que les GAGs modulent la quantité de dépôts amyloïdes et la cytotoxicité sous-adjacente (Oskarsson *et al.*, 2015; Potter *et al.*, 2015; Templin *et al.*, 2019). Cependant, le rôle joué par les GAGs au sein d'un environnement hétérogène et complexe sur la modulation conformationnelle de peptides amyloïdogéniques et la cytotoxicité qui en résulte reste à déterminer. Ainsi, dans un premier temps, nous avons évalué la cytotoxicité associée à l'auto-assemblage de l'IAPP sur deux types cellulaires, l'un présentant des GAGs (CHO K1), l'autre en étant dépourvu (CHO pgs-A-745). Nous avons montré que l'IAPP induit une diminution accrue de l'activité métabolique des cellules présentant des GAGs à leur surface, comparativement à celles qui en sont dépourvues. Ce résultat corrèle avec une étude précédente qui montre que HS est requis pour déclencher la mort cellulaire par apoptose induite par l'IAPP (Oskarsson *et al.*, 2015). De façon intéressante, parmi les nombreux mécanismes de cytotoxicité, le plus couramment décrit est la perturbation membranaire (Caillon *et al.*, 2016). Étonnamment, le rôle des GAGs dans la perturbation des membranes biologiques par les peptides amyloïdogéniques n'a jamais été étudié. Dans notre étude, la perturbation membranaire induite par l'IAPP a été évaluée par le dosage de l'activité enzymatique de la LDH, une enzyme cytoplasmique, libérée dans le milieu de culture lorsque l'intégrité membranaire est détériorée. En réalisant cet essai sur les deux types

cellulaires mentionnés précédemment, nous avons montré que la présence de GAGs à la surface cellulaire exacerbe la perturbation membranaire.

L'hypothèse des oligomères toxiques postule que les espèces intermédiaires de la cascade amyloïdogénique sont les espèces les plus cytotoxiques (Iadanza *et al.*, 2018; Kaye *et al.*, 2003). Le traitement des deux types cellulaires, K1 et pgs-A-745, par des espèces préfibrillaires de l'IAPP indiquent que les GAGs ne modulent pas la cytotoxicité de ces espèces. De façon similaire, la perturbation membranaire induite par les espèces préfibrillaires est indépendante de la présence de GAGs. De plus, à concentration équivalente, le traitement par les espèces préfibrillaires induit une plus forte cytotoxicité que le traitement avec l'IAPP monomérique. Ainsi, nos résultats suggèrent que suite à l'initiation du processus d'auto-assemblage, la modulation de la cytotoxicité de l'IAPP par les GAGs est abrogée.

Étant donné que la présence de GAGs à la surface cellulaire diminue la concentration requise pour induire la cytotoxicité et la perturbation membranaire, nous avons évalué si les GAGs pouvaient augmenter la séquestration de l'IAPP à la surface cellulaire. À l'aide d'un IAPP marqué avec un fluorophore et via des analyses par cytométrie en flux et microscopie confocale, nous avons observé que l'IAPP était plus présent à la surface des cellules présentatrices de GAGs. De façon intéressante, l'IAPP de rat qui est non amyloïdogénique et présente une charge nette à pH physiologique supérieure à celle de l'IAPP, due à la présence d'une Arg en position 18 contre une His pour la séquence humaine, était séquestré de manière indépendante aux GAGs à la surface cellulaire. Ce résultat suggère que la haute séquestration de l'IAPP à la surface des cellules présentatrices de GAGs résultent d'une forte interaction due à l'auto-assemblage modulé par les GAGs.

Il est important de noter que la corrélation entre la présence de GAGs et la perturbation membranaire induite par l'IAPP puisse résulter d'événements en amont. Par exemple,

il a été montré qu'un dysfonctionnement de la mitochondrie induit par l'auto-assemblage intracellulaire de l'IAPP entraîne un relargage de la LDH (Magzoub et Miranker, 2012). Dans ce contexte, la formation des vésicules dérivées de la membrane plasmique (GPMV) a permis d'évaluer plus directement la relation entre la perturbation membranaire induite par l'IAPP et la présence de GAGs. Afin d'évaluer l'interaction de l'IAPP avec les GAGs à la surface des GPMV, les vésicules ont été marquées en rouge avec un fluorophore lipophile et l'IAPP a été marqué en vert. Des analyses par cytométrie en flux ont permis de discriminer les différentes populations, vésicules seules, peptide seul, et peptide séquestré à la surface des vésicules. En comparant la séquestration de l'IAPP sur les deux types de vésicules, nous avons montré que l'IAPP est davantage séquestré sur les vésicules présentant des GAGs, de façon similaire aux résultats obtenus à l'aide des cellules entières. De plus, la perturbation membranaire des GPMV a été évaluée à l'aide d'un double marquage des vésicules, permettant d'identifier les vésicules présentant une fluorescence mixte comme étant intègre. À l'opposé, la diminution ou la perte de cette fluorescence mixte indique une diminution de l'intégrité vésiculaire et donc une perturbation membranaire. Ainsi, il a été observé que la présence d'IAPP exacerbe la perturbation membranaire des vésicules avec GAGs. Finalement, les GPMV permettent d'évaluer l'implication des GAGs dans un environnement membranaire sur la cinétique d'auto-assemblage de l'IAPP. La cinétique d'auto-assemblage de l'IAPP en présence des deux types de GPMV a été évaluée par des essais basés sur les sondes ThT et FIAsh. Ces essais n'ont pas permis d'observer de modulation de la cinétique d'auto-assemblage par les GAGs dans un environnement complexe. En conclusion, cette étude montre que la présence de GAGs à la surface cellulaire favorise une séquestration accrue de l'IAPP, soit une augmentation de la concentration peptidique locale, déclenchant ainsi la cascade amyloïdogénique et qui peut conduire *in fine* à une cytotoxicité.

De façon intéressante, il a été suggéré que l'IAPP traverse la membrane plasmique, tel un CPP cationique (Magzoub et Miranker, 2012). Les CPP cationiques présentent

généralement au moins une charge nette positive de +8 (Futaki *et al.*, 2001) et nécessitent habituellement d'interagir avec les GAGs pour être internalisés (Ziegler et Seelig, 2008). Pour l'IAPP, ce dernier ne présente qu'une charge nette positive de +3 à pH physiologique. Toutefois, l'oligomérisation pourrait induire une augmentation locale du nombre de charges positives. Ainsi, on pourrait supposer qu'un tel agencement de charges positives permettent l'interaction avec les GAGs chargés négativement, et ainsi moduler l'internalisation de l'IAPP, tel que montré pour d'autres peptides amyloïdogéniques, incluant le peptide A β (Wesen *et al.*, 2018), l' α -synucléine (Ihse *et al.*, 2017) et la protéine tau (Holmes *et al.*, 2013). En plus de l'internalisation, il a été montré que les GAGs modulent la propagation d'espèces cytotoxiques de la protéine tau (Holmes *et al.*, 2013). De façon intéressante, il a récemment été suggéré que l'IAPP puisse se propager par un mécanisme similaire à celui du prion (Mukherjee *et al.*, 2017), bien que le rôle des GAGs dans ce mécanisme reste à être déterminé pour l'IAPP.

5.3 Identification d'un site de liaison conformationnel de l'héparine chez l'hormone peptidique sécrétine

Les ligands peptidiques des RCPG de la classe B sont d'importants messagers impliqués dans la régulation de nombreux processus physiologiques essentiels chez l'humain. Bien qu'elles affichent une structure secondaire partiellement aléatoire en solution, ces hormones peptidiques doivent adopter une conformation tridimensionnelle précise afin d'activer leurs récepteurs respectifs (Jazayeri *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017). De façon intéressante, il a été montré qu'en présence de membranes modèles, ces hormones peptidiques subissaient un réarrangement conformationnel vers la structure bioactive hélicoïdale (Gao et Wong, 1998). Ainsi, il a été suggéré que l'environnement membranaire pourrait déclencher les réarrangements conformationnels en amont de l'interaction avec le récepteur (Behnam et Deber, 1984; Sargent et Schwyzer, 1986). Toutefois, les membranes

modèles ne représentent que partiellement la complexité membranaire, en omettant, par exemple les GAGs, qui forment un réseau dense à la surface cellulaire. En considérant leur localisation, leur charge et leur densité, les hormones peptidiques peuvent avoir une plus grande probabilité d'interagir avec les GAGs, plutôt qu'avec leur récepteur enfoui dans la membrane. En outre, il a été montré *in vitro* que plusieurs ligands peptidiques des RCPG de la classe B ont la capacité de se lier à l'héparine (Tchoumi Neree *et al.*, 2015). D'autre part, les hormones peptidiques PACAP38, VIP et glucagon subissent un réarrangement conformationnel suite à leur interaction avec l'héparine, et cette conformation est proche de la structure bioactive. Toutefois, le rôle des GAGs dans l'adsorption des ligands peptidiques des RCPG de la classe B à la surface cellulaire reste à élucider.

L'utilisation de deux types cellulaires, l'un présentant des GAGs (CHO K1) et l'autre en étant dépourvu (CHO pgs-A-745), a permis d'évaluer la séquestration de la sécrétine marquée à la surface des cellules. Ainsi, via des analyses de microscopie confocale et de cytométrie en flux, il a pu être révélé que la sécrétine était plus présente à la surface cellulaire des cellules pourvues de GAGs. Par la suite, différentes approches ont été utilisées afin d'étudier l'interaction entre la sécrétine et les GAGs. Premièrement, une haute concentration en sel est requise pour éluer la sécrétine d'une colonne fonctionnalisée avec de l'héparine, révélant ainsi une forte interaction électrostatique. De plus, les constantes de dissociation obtenues par SPR et ITC se situent dans le bas μM , confirmant la forte affinité entre l'héparine et la sécrétine observée par chromatographie d'affinité.

Il a été montré dans une précédente étude que l'interaction entre l'héparine et les ligands GPCR de la classe B, induit un réarrangement conformationnel vers une structure hélicoïdale (Tchoumi Neree *et al.*, 2015). Des analyses par spectroscopie de CD ont révélé que la sécrétine subit également un réarrangement conformationnel vers une conformation hélicoïdale en présence de GAGs sulfatés. Lors de ce repliement en

hélice α , les chaînes latérales des arginines aux positions 14, 18 et 21 se projettent sur une même face de l'hélice, conduisant ainsi à la formation d'un domaine fortement cationique. De plus, la représentation en roue hélicoïdale de la sécrétine (Figure 4.4 C) montre la disposition d'un motif de reconnaissance spatial à l'héparine, XBBXBX où B est un résidu basique et X un résidu hydrophobe non chargé, avec les résidus L¹⁰, R²¹, R¹⁴, G²⁵ and R¹⁸. Afin de déterminer si la conformation hélicoïdale est requise pour l'interaction de la sécrétine avec l'héparine, des dérivés de la sécrétine présentant un ensemble conformationnel restreint ont été développés. En outre, la substitution de deux résidus adjacents par leurs énantiomères de conformation D permet d'inhiber la formation d'hélice- α . Par chromatographie d'affinité, SPR et ITC, il a été observé que les dérivés de la sécrétine présentaient une faible interaction avec l'héparine, validant ainsi que la liaison entre la sécrétine avec l'héparine est dépendante de la structure secondaire du peptide. L'importance des différentes Arg fut ensuite évaluée en substituant successivement les Arg par un résidu Ala (*Ala-Scan*). Notamment, la substitution successive des Arg 14, 18 et 21, positionnées sur la même face de l'hélice, réduit drastiquement l'interaction avec l'héparine, tandis que la substitution de l'Arg en position 12 influence peu l'affinité de liaison. Finalement, la séquestration d'un analogue de la sécrétine contraint à la surface cellulaire des CHO K1 est fortement réduite, comparativement à la sécrétine sauvage.

L'interaction entre les ligands peptidiques des RCPG de la classe B et les GAGs pourrait avoir un rôle physiologique important, en facilitant la liaison à la surface cellulaire et le réarrangement conformationnel vers la structure bioactive. Par conséquence, l'hypothèse de la catalyse membranaire pourrait être actualisée et devrait intégrer la liaison aux GAGs comme une étape supplémentaire. Toutefois, au cours de nos études nous avons montré qu'évaluer l'interaction entre les GAGs et les hormones peptidiques à la surface cellulaire peut se révéler difficile, en considérant l'agrégation et l'internalisation. Ainsi, le choix de la sécrétine qui est soluble et ne s'agrège pas aux contacts des GAGs s'est révélé judicieux. Cependant, une analyse de chaque membre

de la famille des ligands RCPG de la classe B permettrait d'assurer que les GAGs sont bien un partenaire physiologique qui participe à l'activation des récepteurs.

5.4 Conclusion et perspectives

En conclusion, les travaux de cette thèse indiquent que les GAGs favorisent une séquestration accrue des hormones peptidiques à la surface cellulaire et induisent des modulations structurales secondaires et/ou quaternaires. Ainsi, dans un contexte physiologique, cette liaison conduirait à l'adoption d'une structure secondaire proche de la conformation bioactive. Cet événement conduisant à l'augmentation de la concentration locale en peptide pourrait mener à une augmentation du taux de liaison au récepteur. Pour élucider l'importance des GAGs dans le processus physiologique de l'activation de RCPG de la classe B par les hormones peptidiques, plusieurs approches pourraient être développées. D'une part, l'expression du récepteur de la sécrétine dans les cellules CHO K1 et CHO pgs-A-745 permettrait d'évaluer si la présence de GAGs influence la liaison et l'activation du récepteur. D'autre part, il existe des modèles animaux porteurs de mutation limitant l'expression de certains GAGs, ou exprimant des enzymes de dégradation de GAGs. Ainsi, on pourrait évaluer *in vivo* l'importance des GAGs dans la physiologie de la sécrétine.

Dans un contexte pathologique, nos travaux suggèrent que l'augmentation de la concentration locale de peptides prônes à l'agrégation permet de déclencher l'auto-assemblage et favorise la perturbation de la membrane plasmique. Ainsi, l'inhibition de l'interaction entre les peptides amyloïdogéniques et les GAGs, par des fragments courts d'héparine (Jha *et al.*, 2011) ou de petites molécules sulfatées mimant les GAGs comme l'acide fuschine ou le *fast green FCF* (Meng et Raleigh, 2011), permettrait d'évaluer une approche thérapeutique conduisant à l'inhibition de la perturbation membranaire et de la cytotoxicité associée.

Finalement, il serait intéressant de pouvoir étudier l'interaction entre les GAGs et les peptides prônes à l'agrégation dans un contexte physiologique. En effet, ici l'étude de l'interaction de l'IAPP avec les GAGs est réalisée en présence de concentrations élevées de peptides, favorables à l'agrégation et considérées comme toxiques. Étant donné que nos travaux suggèrent une forte interaction entre l'IAPP et les GAGs et que cette liaison est associée à l'agrégation, des concentrations plus faibles de peptides pourraient être associées à une activité biologique via l'activation du récepteur de l'IAPP.

BIBLIOGRAPHIE

- Abedini A, Plesner A, Cao P, Ridgway Z, Zhang J, Tu LH, Middleton CT, Chao B, Sartori DJ, Meng F, et al. (2016) Time-resolved studies define the nature of toxic IAPP intermediates, providing insight for anti-amyloidosis therapeutics. *Elife* 5: 12977
- Abedini A et Raleigh DP (2005) Incorporation of pseudoproline derivatives allows the facile synthesis of human IAPP, a highly amyloidogenic and aggregation-prone polypeptide. *Organic letters* 7: 693-696.
- Abedini A et Raleigh DP (2009) A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides. *Protein engineering, design and selection* 22: 453-459.
- Abedini A et Schmidt AM (2013) Mechanisms of islet amyloidosis toxicity in type 2 diabetes. *FEBS Letters* 587: 1119-1127.
- Abedini A, Tracz SM, Cho JH et Raleigh DP (2006) Characterization of the heparin binding site in the N-terminus of human pro-islet amyloid polypeptide: implications for amyloid formation. *Biochemistry* 45: 9228-9237.
- Afroze S, Meng F, Jensen K, McDaniel K, Rahal K, Onori P, Gaudio E, Alpini G et Glaser SS (2013) The physiological roles of secretin and its receptor. *Annals of translational medicine* 1: 29.
- Ahronheim JH (1943) The nature of the hyaline material in the pancreatic islands in diabetes mellitus. *The american journal of pathology* 19: 873-882.
- Akter R, Cao P, Noor H, Ridgway Z, Tu L-H, Wang H, Wong AG, Zhang X, Abedini A, Schmidt AM, et al. (2016) Islet amyloid polypeptide: structure, function, and pathophysiology. *Journal of diabetes research* 2016: 2798269.
- Amand HL, Rydberg HA, Fornander LH, Lincoln P, Norden B et Esbjorner EK (2012) Cell surface binding and uptake of arginine- and lysine-rich penetratin peptides in absence and presence of proteoglycans. *Biochimica and biophysica acta* 1818: 2669-2678.

- Ancsin JB (2003) Amyloidogenesis: historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans as a major culprit. *Amyloid* 10: 67-79.
- Apostolidou M, Jayasinghe SA et Langen R (2008) Structure of alpha-helical membrane-bound human islet amyloid polypeptide and its implications for membrane-mediated misfolding. *Journal of biological chemistry* 283: 17205-17210.
- Arosio P, Knowles TPJ et Linse S (2015) On the lag phase in amyloid fibril formation. *Physical chemistry chemical physics* 17: 7606-7618.
- Arvinte T, Cudd A et Drake AF (1993) The structure and mechanism of formation of human calcitonin fibrils. *Journal of biological chemistry* 268: 6415-6422.
- Asthana S, Mallick B, Alexandrescu AT et Jha S (2018) IAPP in type II diabetes: Basic research on structure, molecular interactions, and disease mechanisms suggests potential intervention strategies. *Biochimica and biophysica acta biomembrane*
- Ban T, Hamada D, Hasegawa K, Naiki H et Goto Y (2003) Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. *Journal of biological chemistry* 278: 16462-16465.
- Bayliss WM et Starling EH (1902) The mechanism of pancreatic secretion. *The journal of physiology* 28: 325-353.
- Beaven GH, Gratzer WB et Davies HG (1969) Formation and structure of gels and fibrils from glucagon. *European journal of biochemistry* 11: 37-42.
- Bechara C, Pallerla M, Zaltsman Y, Burlina F, Alves ID, Lequin O et Sagan S (2013) Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *Faseb journal* 27: 738-749.
- Bedrood S, Li Y, Isas JM, Hegde BG, Baxa U, Haworth IS et Langen R (2012) Fibril structure of human islet amyloid polypeptide. *Journal of biological chemistry* 287: 5235-5241.
- Behnam BA et Deber CM (1984) Evidence for a folded conformation of methionine- and leucine-enkephalin in a membrane environment. *Journal of biological chemistry* 259: 14935-14940.

- Bemporad F et Chiti F (2012) Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationships. *Chemical biology* 19: 315-327.
- Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, Sipe JD et Westermarck P (2018) Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* 25: 215-219.
- Bergamaschini L, Donarini C, Rossi E, De Luigi A, Vergani C et Grazia De Simoni M (2002) Heparin attenuates cytotoxic and inflammatory activity of Alzheimer amyloid- β in vitro. *Neurobiology of aging* 23 531-536.
- Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J et Zako M (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual review of biochemistry* 68: 729-777.
- Biancalana M et Koide S (2010) Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et biophysica acta* 1804: 1405-1412.
- Birol M, Kumar S, Rhoades E et Miranker AD (2018) Conformational switching within dynamic oligomers underpins toxic gain-of-function by diabetes-associated amyloid. *Nature communication* 9: 1312.
- Bishop JR, Schuksz M et Esko JD (2007) Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446: 1030-1037.
- Bitan G, Lomakin A et Teplow DB (2001) Amyloid beta-protein oligomerization: prenucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins. *Journal of biological chemistry* 276: 35176-35184.
- Blanco LP, Evans ML, Smith DR, Badtke MP et Chapman MR (2012) Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends in microbiology* 20: 66-73.
- Bourgault S, Chatenet D, Wurtz O, Doan ND, Leprince J, Vaudry H, Fournier A et Vaudry D (2011a) Strategies to convert PACAP from a hypophysiotropic neurohormone into a neuroprotective drug. *Current pharmaceutical design* 17: 1002-1024.

- Bourgault S, Choi S, Buxbaum JN, Kelly JW, Price JL et Reixach N (2011b) Mechanisms of transthyretin cardiomyocyte toxicity inhibition by resveratrol analogs. *Biochemical and biophysical research communication* 410: 707-713.
- Bourgault S, Solomon JP, Reixach N et Kelly JW (2011c) Sulfated glycosaminoglycans accelerate transthyretin amyloidogenesis by quaternary structural conversion. *Biochemistry* 50: 1001-1015.
- Bourgault S, Vaudry D, Botia B, Couvineau A, Laburthe M, Vaudry H et Fournier A (2008) Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 29: 919-932.
- Bourgault S, Vaudry D, Dejda A, Doan ND, Vaudry H et Fournier A (2009a) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: focus on structure-activity relationships of a neuroprotective Peptide. *Current medicinal chemistry* 16: 4462-4480.
- Bourgault S, Vaudry D, Segalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Couvineau A, Laburthe M, Vaudry H et Fournier A (2009b) Molecular and conformational determinants of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) for activation of the PAC1 receptor. *Journal of medicinal chemistry* 52: 3308-3316.
- Bower RL et Hay DL (2016) Amylin structure-function relationships and receptor pharmacology; implications for amylin mimetic drug development. *British journal of pharmacology* 173: 1883-1898.
- Bram Y, Frydman-Marom A, Yanai I, Gilead S, Shaltiel-Karyo R, Amdursky N et Gazit E (2014) Apoptosis induced by islet amyloid polypeptide soluble oligomers is neutralized by diabetes-associated specific antibodies. *Scientific reports* 4: 4267.
- Brender JR, Hartman K, Nanga RPR, Popovych N, de la Salud Bea R, Vivekanandan S, Marsh ENG et Ramamoorthy A (2010) Role of zinc in human islet amyloid polypeptide aggregation. *Journal of the american chemical society* 132: 8973-8983.
- Brender JR, Salamekh S et Ramamoorthy A (2012) Membrane disruption and early events in the aggregation of the diabetes related peptide IAPP from a molecular perspective. *Accounts of chemical research* 45: 454-462.

- Bridges TM et Lindsley CW (2008) G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. *ACS Chemical biology* 3: 530-541.
- Bucciantini M, Nosi D, Forzan M, Russo E, Calamai M, Pieri L, Formigli L, Quercioli F, Soria S, Pavone F, et al. (2012) Toxic effects of amyloid fibrils on cell membranes: the importance of ganglioside GM1. *Faseb journal* 26: 818-831.
- Buchanan LE, Dunkelberger EB, Tran HQ, Cheng P-N, Chiu C-C, Cao P, Raleigh DP, de Pablo JJ, Nowick JS et Zanni MT (2013) Mechanism of IAPP amyloid fibril formation involves an intermediate with a transient β -sheet. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 110: 19285-19290.
- Buchanan LE, Maj M, Dunkelberger EB, Cheng PN, Nowick JS et Zanni MT (2018) Structural polymorphs suggest competing pathways for the formation of amyloid fibrils that diverge from a common intermediate species. *Biochemistry* 57: 6470-6478.
- Caillon L, Hoffmann ARF, Botz A et Khemtouri L (2016) Molecular structure, membrane interactions, and toxicity of the islet amyloid polypeptide in type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes research* 2016: 5639875.
- Cao P, Abedini A et Raleigh DP (2013a) Aggregation of islet amyloid polypeptide: from physical chemistry to cell biology. *Current opinion in structural biology* 23: 82-89.
- Cao P, Marek P, Noor H, Patsalo V, Tu L-H, Wang H, Abedini A et Raleigh DP (2013b) Islet amyloid: From fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity. *FEBS letters* 587: 1106-1118.
- Cao P et Raleigh DP (2012) Analysis of the inhibition and remodeling of islet amyloid polypeptide amyloid fibers by flavanols. *Biochemistry* 51: 2670-2683.
- Cao P, Tu LH, Abedini A, Levsh O, Akter R, Patsalo V, Schmidt AM et Raleigh DP (2012) Sensitivity of amyloid formation by human islet amyloid polypeptide to mutations at residue 20. *Journal of molecular of biology* 421: 282-295.
- Cao Q, Boyer DR, Sawaya MR, Ge P et Eisenberg DS (2020) Cryo-EM structure and inhibitor design of human IAPP (amylin) fibrils. *Nature structural and molecular biology* 27: 653-659.

- Cardin AD et Weintraub HJ (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 9: 21-32.
- Cardoso JC, Vieira FA, Gomes AS et Power DM (2010) The serendipitous origin of chordate secretin peptide family members. *BioMed Central (BMC) evolutionary biology* 10: 135.
- Carles J (1956) [Colorimetric microdetermination of phosphorus]. *Bull soc chim biol (Paris)* 38: 255-257.
- Casas S, Gomis R, Gribble FM, Altirriba J, Knuutila S et Novials A (2007) Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway is a downstream endoplasmic reticulum stress response induced by extracellular human islet amyloid polypeptide and contributes to pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes* 56: 2284-2294.
- Castillo GM, Cummings JA, Yang W, Judge ME, Sheardown MJ, Rimvall K, Hansen JB et Snow AD (1998) Sulfate content and specific glycosaminoglycan backbone of perlecan are critical for perlecan's enhancement of islet amyloid polypeptide (amylin) fibril formation. *Diabetes* 47: 612-620.
- Chapter MC, White CM, DeRidder A, Chadwick W, Martin B et Maudsley S (2010) Chemical modification of class II G protein-coupled receptor ligands: frontiers in the development of peptide analogs as neuroendocrine pharmacological therapies. *Pharmacology and therapeutics* 125: 39-54.
- Chen MS, Zhao DS, Yu YP, Li WW, Chen YX, Zhao YF et Li YM (2013) Characterizing the assembly behaviors of human amylin: a perspective derived from C-terminal variants. *Chemical communication* 49: 1799-1801.
- Chen WL, Ma ST, Chen YW, Chao YC, Chan AC, Tu LH et Liu WM (2020) A fluorogenic molecule for probing islet amyloid using flavonoid as a scaffold design. *Biochemistry* 59: 1482-1492.
- Cheng B, Liu X, Gong H, Huang L, Chen H, Zhang X, Li C, Yang M, Ma B, Jiao L, et al. (2011) Coffee components inhibit amyloid formation of human islet amyloid polypeptide in vitro: possible link between coffee consumption and diabetes mellitus. *J Agric Food Chem* 59: 13147-13155.
- Chey WY et Chang TM (2014) Secretin: historical perspective and current status. *Pancreas* 43: 162-182.

- Chimienti F, Devergnas S, Favier A et Seve M (2004) Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 53: 2330-2337.
- Chiti F et Dobson CM (2009) Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nature chemical biology* 5: 15-22.
- Chiti F et Dobson CM (2017) Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: A summary of progress over the last decade. *Annual review of biochemical* 86: 27-68.
- Chiu C-c et de Pablo JJ (2015) Fibrillar dimer formation of islet amyloid polypeptides. *AIP Advances* 5: 092501.
- Civelli O, Reinscheid RK, Zhang Y, Wang Z, Fredriksson R et Schiöth HB (2013) G protein-coupled receptor deorphanizations. *Annual review of pharmacology and toxicology* 53: 127-146.
- Clark A et Nilsson MR (2004) Islet amyloid: a complication of islet dysfunction or an aetiological factor in Type 2 diabetes? *Diabetologia* 47: 157-169.
- Colvin MT, Silvers R, Ni QZ, Can TV, Sergeev I, Rosay M, Donovan KJ, Michael B, Wall J, Linse S, et al. (2016) Atomic resolution structure of monomorphic A β 42 amyloid fibrils. *Journal of America chemical society* 138: 9663-9674.
- Cooper GJ, Leighton B, Dimitriadis GD, Parry-Billings M, Kowalchuk JM, Howland K, Rothbard JB, Willis AC et Reid KB (1988) Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 85: 7763-7766.
- Cooper GJ, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB et Reid KB (1987) Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 84: 8628-8632.
- Cornish J, Callon KE, Bava U, Kamona SA, Cooper GJS et Reid IR (2001) Effects of calcitonin, amylin, and calcitonin gene-related peptide on osteoclast development. *Bone* 29: 162-168.

- Couvineau A et Laburthe M (2012) The family B1 GPCR: structural aspects and interaction with accessory proteins. *Current drug targets* 13: 103-115.
- Culhane KJ, Liu Y, Cai Y et Yan ECY (2015) Transmembrane signal transduction by peptide hormones via family B G protein-coupled receptors. *Frontiers in Pharmacology* 6: 264.
- da Silva DC, Fontes GN, Erthal LCS et Lima LMTR (2016) Amyloidogenesis of the amylin analogue pramlintide. *Biophysical chemistry* 219: 1-8.
- De Carufel CA, Nguyen PT, Sahnouni S et Bourgault S (2013) New insights into the roles of sulfated glycosaminoglycans in islet amyloid polypeptide amyloidogenesis and cytotoxicity. *Peptide science* 100: 645-655.
- De Carufel CA, Quittot N, Nguyen PT et Bourgault S (2015) Delineating the role of helical intermediates in natively unfolded polypeptide amyloid assembly and cytotoxicity. *Angewandte chemie international edition* 54: 14383-14387
- Debbage PL, Lange W, Hellmann T et Gabius HJ (1988) Detection of receptors for sulfated polysaccharides in human placenta by biotinylated probes. *Journal of histochemistry and cytochemistry* 36: 1097-1102.
- DeFronzo RA (2004) Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Medical clinics of North America* 88: 787-835, ix.
- Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I et Glabe CG (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *Journal of biological chemistry* 280: 17294-17300.
- Devaux PF (1991) Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 30: 1163-1173.
- Dhavale DD, Tsai C, Bagchi DP, Engel LA, Sarezyk J et Kotzbauer PT (2017) A sensitive assay reveals structural requirements for alpha-synuclein fibril growth. *Journal of biology chemistry* 292: 9034-9050.

- Dhouafli Z, Cuanalo-Contreras K, Hayouni EA, Mays CE, Soto C et Moreno-Gonzalez I (2018) Inhibition of protein misfolding and aggregation by natural phenolic compounds. *Cell and molecular life sciences* 75: 3521-3538.
- Diociaiuti M, Gaudiano MC et Malchiodi-Albedi F (2011) The slowly aggregating salmon calcitonin: a useful tool for the study of the amyloid oligomers structure and activity. *International journal of molecular sciences* 12: 9277-9295.
- Domanov YA et Kinnunen PK (2008) Islet amyloid polypeptide forms rigid lipid-protein amyloid fibrils on supported phospholipid bilayers. *Journal of molecular biology* 376: 42-54.
- Dong M, Lam PC, Pinon DI, Sexton PM, Abagyan R et Miller LJ (2008) Spatial approximation between secretin residue five and the third extracellular loop of its receptor provides new insight into the molecular basis of natural agonist binding. *Molecular pharmacology* 74: 413-422.
- Dong M, Le A, Te JA, Pinon DI, Bordner AJ et Miller LJ (2011) Importance of each residue within secretin for receptor binding and biological activity. *Biochemistry* 50: 2983-2993.
- Duan M, Fan J et Huo S (2012) Conformations of islet amyloid polypeptide monomers in a membrane environment: implications for fibril formation. *PLoS One* 7: e47150.
- Dupuis NF, Wu C, Shea J-E et Bowers MT (2009) Human islet amyloid polypeptide monomers form ordered β -hairpins: A possible direct Amyloidogenic Precursor. *Journal of the American chemical society* 131: 18283-18292.
- Dupuis NF, Wu C, Shea J-E et Bowers MT (2011a) The Amyloid Formation Mechanism in Human IAPP: Dimers have β -strand Monomer-Monomer Interfaces. *Journal of the American chemical society* 133: 7240-7243.
- Dupuis NF, Wu C, Shea JE et Bowers MT (2011b) The amyloid formation mechanism in human IAPP: dimers have beta-strand monomer-monomer interfaces. *Journal of the American chemical society* 133: 7240-7243.
- Ehrlich JC et Ratner IM (1961) Amyloidosis of the islets of Langerhans. A restudy of islet hyalin in diabetic and non-diabetic individuals. *The American of journal pathology* 38: 49-59.

- Eisenberg DS et Sawaya MR (2017) Structural studies of amyloid proteins at the molecular level. *Annual review of biochemistry* 86: 69-95.
- Eizirik DL, Cardozo AK et Cnop M (2008) The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocrine reviews* 29: 42-61.
- Engel MFM (2009) Membrane permeabilization by islet amyloid polypeptide. *Chemistry and physics of lipids* 160: 1-10.
- Engel MFM, Khemtémourian L, Kleijer CC, Meeldijk HJD, Jacobs J, Verkleij AJ, de Kruijff B, Killian JA et Höppener JWM (2008) Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 105: 6033-6038.
- Esko JD, Stewart TE et Taylor WH (1985) Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis. *Proceedings of the national academy of sciences* 82: 3197-3201.
- Esko JD, Weinke JL, Taylor WH, Ekborg G, Rodén L, Anantharamaiah G et Gawish A (1987) Inhibition of chondroitin and heparan sulfate biosynthesis in Chinese hamster ovary cell mutants defective in galactosyltransferase I. *Journal of biological chemistry* 262: 12189-12195.
- Favretto ME, Wallbrecher R, Schmidt S, van de Putte R et Brock R (2014) Glycosaminoglycans in the cellular uptake of drug delivery vectors - bystanders or active players? *Journal of controlled release* 180: 81-90.
- Findlay DM, Michelangeli VP, Orłowski RC et Martin TJ (1983) Biological activities and receptor interactions of des-Leu16 salmon and des-Phe16 human calcitonin. *Endocrinology* 112: 1288-1291.
- Fonseca SG, Burcin M, Gromada J et Urano F (2009) Endoplasmic reticulum stress in beta-cells and development of diabetes. *Current opinion in pharmacology* 9: 763-770.
- Foord SM, Jupe S et Holbrook J (2002) Bioinformatics and type II G-protein-coupled receptors. *Biochemical society transactions* 30: 473-479.

- Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE et Kelly JW (2006) Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS biology* 4: e6-e6.
- Fowler DM, Koulov AV, Balch WE et Kelly JW (2007) Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends biochemical science* 32: 217-224.
- Fradinger EA, Monien BH, Urbanc B, Lomakin A, Tan M, Li H, Spring SM, Condron MM, Cruz L, Xie CW, et al. (2008) C-terminal peptides coassemble into Abeta42 oligomers and protect neurons against Abeta42-induced neurotoxicity. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 105: 14175-14180.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG et Schioth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* 63: 1256-1272.
- Frigori RB (2017) Be positive: optimizing pramlintide from microcanonical analysis of amylin isoforms. *Physical chemistry chemical physics* 19: 25617-25633.
- Frokjaer S et Otzen DE (2005) Protein drug stability: a formulation challenge. *Nature reviews drug discovery* 4: 298-306.
- Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K et Sugiura Y (2001) Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *Journal of biological chemistry* 276: 5836-5840.
- Gao X et Wong TC (1998) Studies of the binding and structure of adrenocorticotropin peptides in membrane mimics by NMR spectroscopy and pulsed-field gradient diffusion. *Biophysical journal* 74: 1871-1888.
- Gelenter MD, Smith KJ, Liao SY, Mandala VS, Dregni AJ, Lamm MS, Tian Y, Xu W, Pochan DJ, Tucker TJ, et al. (2019) The peptide hormone glucagon forms amyloid fibrils with two coexisting β -strand conformations. *Nature structural and molecular biology* 26: 592-598.
- Gellermann GP, Appel TR, Tannert A, Radestock A, Hortschansky P, Schroeckh V, Leisner C, Lütkepohl T, Shtrasburg S, Röcken C, et al. (2005) Raft lipids as

common components of human extracellular amyloid fibrils. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 102: 6297-6302.

Gennari C et Agnusdei D (1994) Calcitonins and osteoporosis. *British journal of clinical practice* 48: 196-200.

Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews* 21: 90-113.

Gillam JE et MacPhee CE (2013) Modelling amyloid fibril formation kinetics: mechanisms of nucleation and growth. *Journal of physics condensed matter* 25: 373101.

Glabe CG (2008) Structural classification of toxic amyloid oligomers. *Journal of biological chemistry* 283: 29639-29643.

Godin E, Nguyen PT, Zottig X et Bourgault S (2019) Identification of a hinge residue controlling islet amyloid polypeptide self-assembly and cytotoxicity. *Journal of biological chemistry* 294: 8452-8463.

Green JD, Kreplak L, Goldsbury C, Li Blatter X, Stolz M, Cooper GS, Seelig A, Kistler J et Aebi U (2004) Atomic force microscopy reveals defects within mica supported lipid bilayers induced by the amyloidogenic human amylin peptide. *Journal of molecular biology* 342: 877-887.

Griffin BA, Adams SR, Jones J et Tsien RY (2000) Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FLaSH. *Methods in enzymology* 327: 565-578.

Griffin BA, Adams SR et Tsien RY (1998) Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* 281: 269-272.

Grigolato F, Colombo C, Ferrari R, Rezabkova L et Arosio P (2017) Mechanistic origin of the combined effect of surfaces and mechanical agitation on amyloid formation. *ACS Nano* 11: 11358-11367.

- Gump JM, June RK et Dowdy SF (2010) Revised role of glycosaminoglycans in TAT protein transduction domain-mediated cellular transduction. *Journal of biological chemistry* 285: 1500-1507.
- Gurlo T, Ryazantsev S, Huang C-j, Yeh MW, Reber HA, Hines OJ, O'Brien TD, Glabe CG et Butler PC (2010) Evidence for proteotoxicity in β cells in type 2 diabetes : toxic islet amyloid polypeptide oligomers form intracellularly in the secretory pathway. *The American journal of pathology* 176: 861-869.
- Güttler F et Clausen J (1969) Changes in lipid pattern of HeLa cells exposed to immunoglobulin G and complement. *Biochemical journal* 115: 959-968.
- Haataja L, Gurlo T, Huang CJ et Butler PC (2008) Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis. *Endocrine reviews* 29: 303-316.
- Hammarstrom P, Simon R, Nystrom S, Konradsson P, Aslund A et Nilsson KP (2010) A fluorescent pentameric thiophene derivative detects in vitro-formed prefibrillar protein aggregates. *Biochemistry* 49: 6838-6845.
- Handel TM, Johnson Z, Crown SE, Lau EK et Proudfoot AE (2005) Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annual reviews in biochemistry* 74: 385-410.
- Harmar AJ (2001) Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol* 2: Reviews 3013.
- Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, et al. (1998) International union of pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacological reviews* 50: 265.
- Hassanpour A, De Carufel CA, Bourgault S et Forgione P (2014) Synthesis of 2,5-diaryl-substituted thiophenes as helical mimetics: towards the modulation of islet amyloid polypeptide (IAPP) amyloid fibril formation and cytotoxicity. *Chemistry – A European journal* 20: 2522-2528.
- Hatai J, Motiei L et Margulies D (2017) Analyzing amyloid beta aggregates with a combinatorial fluorescent molecular sensor. *Journal of the American chemical Society* 139: 2136-2139.

- Hawe A, Sutter M et Jiskoot W (2008) Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharmaceutical Research* 25: 1487-1499.
- Hay DL, Garelja ML, Poyner DR et Walker CS (2018) Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25. *British journal of pharmacology* 175: 3-17.
- Hebda JA et Miranker AD (2009) The interplay of catalysis and toxicity by amyloid intermediates on lipid bilayers: insights from type II diabetes. *Annual reviews of biophysics* 38: 125-152.
- Hebda JA, Saraogi I, Magzoub M, Hamilton AD et Miranker AD (2009) A peptidomimetic approach to targeting pre-amyloidogenic states in type II diabetes. *Chemistry & Biology* 16: 943-950.
- Ho HH, Gilbert MT, Nussenzveig DR et Gershengorn MC (1999) Glycosylation is important for binding to human calcitonin receptors. *Biochemistry* 38: 1866-1872.
- Hoare SRJ (2005) Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug discovery today* 10: 417-427.
- Hoffmann C, Gaietta G, Zurn A, Adams SR, Terrillon S, Ellisman MH, Tsien RY et Lohse MJ (2010) Fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins in intact cells. *Nature protocols* 5: 1666-1677.
- Hofmann M, Gondol D, Bovermann G et Nilges M (1989) Conformation of secretin in dimethyl sulfoxide solution. *European journal of biochemistry* 186: 95-103.
- Holmes BB, DeVos SL, Kfoury N, Li M, Jacks R, Yanamandra K, Ouidja MO, Brodsky FM, Marasa J, Bagchi DP, et al. (2013) Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proceedings of the national academy of Sciences of the United States of America* 110: E3138-E3147.
- Hong Y, Meng L, Chen S, Leung CWT, Da L-T, Faisal M, Silva D-A, Liu J, Lam JWY, Huang X, et al. (2012) Monitoring and inhibition of insulin fibrillation by a small organic fluorogen with aggregation-induced emission characteristics. *Journal of the American chemical society* 134: 1680-1689.

- Hruby VJ (2002) Designing peptide receptor agonists and antagonists. *Nature reviews drug discovery 1*: 847-858.
- Hubbard JA, Martin SR, Chaplin LC, Bose C, Kelly SM et Price NC (1991) Solution structures of calcitonin-gene-related-peptide analogues of calcitonin-gene-related peptide and amylin. *The biochemical journal 275 (Pt 3)*: 785-788.
- Hudson SA, Ecroyd H, Kee TW et Carver JA (2009) The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *Febs journal 276*: 5960-5972.
- Hull RL, Peters MJ, Perigo SP, Chan CK, Wight TN et Kinsella MG (2012) Overall sulfation of heparan sulfate from pancreatic islet beta-TC3 cells increases maximal fibril formation but does not determine binding to the amyloidogenic peptide islet amyloid polypeptide. *Journal of biological chemistry 287*: 37154-37164.
- Hull RL, Zraika S, Udayasankar J, Aston-Mourney K, Subramanian SL et Kahn SE (2009) Amyloid formation in human IAPP transgenic mouse islets and pancreas, and human pancreas, is not associated with endoplasmic reticulum stress. *Diabetologia 52*: 1102-1111.
- Hull RL, Zraika S, Udayasankar J, Kisilevsky R, Szarek WA, Wight TN et Kahn SE (2007) Inhibition of glycosaminoglycan synthesis and protein glycosylation with WAS-406 and azaserine result in reduced islet amyloid formation in vitro. *American journal of physiology - Cell physiology 293*: C1586-1593.
- Hurshman AR, White JT, Powers ET et Kelly JW (2004) Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization. *Biochemistry 43*: 7365-7381.
- Iadanza MG, Jackson MP, Hewitt EW, Ranson NA et Radford SE (2018) A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nature reviews molecular cell biology 19*: 755-773.
- Iannuzzi C, Irace G et Sirangelo I (2015) The effect of glycosaminoglycans (GAGs) on amyloid aggregation and toxicity. *Molecules 20*: 2510-2528.

- Ihse E, Yamakado H, van Wijk XM, Lawrence R, Esko JD et Masliah E (2017) Cellular internalization of alpha-synuclein aggregates by cell surface heparan sulfate depends on aggregate conformation and cell type. *Scientific reports* 7: 9008.
- Inooka H, Ohtaki T, Kitahara O, Ikegami T, Endo S, Kitada C, Ogi K, Onda H, Fujino M et Shirakawa M (2001) Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nature structural biology* 8: 161-165.
- Jan A, Adolfsson O, Allaman I, Buccarello AL, Magistretti PJ, Pfeifer A, Muhs A et Lashuel HA (2011) Abeta42 neurotoxicity is mediated by ongoing nucleated polymerization process rather than by discrete Abeta42 species. *Journal of biological chemistry* 286: 8585-8596.
- Janciauskiene S et Ahrén B (2000) Fibrillar islet amyloid polypeptide differentially affects oxidative mechanisms and lipoprotein uptake in correlation with cytotoxicity in two insulin-producing cell lines. *Biochemical and biophysical research communications* 267: 619-625.
- Janson J, Ashley RH, Harrison D, McIntyre S et Butler PC (1999) The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes* 48: 491-498.
- Janson J, Soeller WC, Roche PC, Nelson RT, Torchia AJ, Kreutter DK et Butler PC (1996) Spontaneous diabetes mellitus in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 93: 7283-7288.
- Jayasinghe SA et Langen R (2004) Identifying structural features of fibrillar islet amyloid polypeptide using site-directed spin labeling. *Journal of biological chemistry* 279: 48420-48425.
- Jazayeri A, Rappas M, Brown AJH, Kean J, Errey JC, Robertson NJ, Fiez-Vandal C, Andrews SP, Congreve M, Bortolato A, et al. (2017) Crystal structure of the GLP-1 receptor bound to a peptide agonist. *Nature* 546: 254-258.
- Jean-Charles P-Y, Kaur S et Shenoy SK (2017) G protein-coupled receptor signaling through β -arrestin-dependent mechanisms. *Journal of cardiovascular pharmacology* 70: 142-158.

- Jeong HR et An SSA (2015) Causative factors for formation of toxic islet amyloid polypeptide oligomer in type 2 diabetes mellitus. *Clinical interventions in aging 10*: 1873-1879.
- Jha S, Patil SM, Gibson J, Nelson CE, Alder NN et Alexandrescu AT (2011) Mechanism of amylin fibrillization enhancement by heparin. *The journal of biological chemistry 286*: 22894-22904.
- Johnson SM, Connelly S, Fearn C, Powers ET et Kelly JW (2012) The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug. *Journal of molecular biology 421*: 185-203.
- Jorpes JE et Mutt V (1961) The gastrointestinal hormones, secretin and cholecystokinin-pancreozymin. *Annals of internal medicine 55*: 395-405.
- Jurgens CA, Toukatly MN, Fligner CL, Udayasankar J, Subramanian SL, Zraika S, Aston-Mourney K, Carr DB, Westermark P, Westermark GT, et al. (2011) β -cell loss and β -cell apoptosis in human type 2 diabetes are related to islet amyloid deposition. *The American journal of pathology 178*: 2632-2640.
- Kahn SE (2003) The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia 46*: 3-19.
- Kahn SE, Andrikopoulos S et Verchere CB (1999) Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes 48*: 241-253.
- Kajava AV, Aebi U et Steven AC (2005) The parallel superpleated beta-structure as a model for amyloid fibrils of human amylin. *Journal of molecular biology 348*: 247-252.
- Karamanos TK, Kalverda AP, Thompson GS et Radford SE (2015) Mechanisms of amyloid formation revealed by solution NMR. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy 0*: 86-104.
- Kayed R, Bernhagen J, Greenfield N, Sweimeh K, Brunner H, Voelter W et Kapurniotu A (1999) Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro. *Journal of molecular biology 287*: 781-796.

- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW et Glabe CG (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300: 486-489.
- Kayed R, Pensalfini A, Margol L, Sokolov Y, Sarsoza F, Head E, Hall J et Glabe C (2009) Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *The journal of biological chemistry* 284: 4230-4237.
- Kayed R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE et Glabe CG (2004) Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *Journal of biological chemistry* 279: 46363-46366.
- Khemtémourian L, Doménech E, Doux JPF, Koorengel MC et Killian JA (2011) Low pH acts as inhibitor of membrane damage induced by human islet amyloid polypeptide. *Journal of the American chemical society* 133: 15598-15604.
- Kirkitadze MD, Bitan G et Teplow DB (2002) Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies. *Journal of neuroscience research* 69: 567-577.
- Kisilevsky R (2000) The relation of proteoglycans, serum amyloid P and Apo E to amyloidosis current status, 2000. *Amyloid* 7: 23-25.
- Klocek G et Seelig J (2008) Melittin interaction with sulfated cell surface sugars. *Biochemistry* 47: 2841-2849.
- Knight JD, Hebda JA et Miranker AD (2006) Conserved and cooperative assembly of membrane-bound alpha-helical states of islet amyloid polypeptide. *Biochemistry* 45: 9496-9508.
- Knight JD, Williamson JA et Miranker AD (2008) Interaction of membrane-bound islet amyloid polypeptide with soluble and crystalline insulin. *Protein science* 17: 1850-1856.
- Knowles TP, Waudby CA, Devlin GL, Cohen SI, Aguzzi A, Vendruscolo M, Terentjev EM, Welland ME et Dobson CM (2009) An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science* 326: 1533-1537.

- Knudsen LB (2004) Glucagon-like peptide-1: the basis of a new class of treatment for type 2 diabetes. *Journal of medicinal chemistry* 47: 4128-4134.
- Kollmer M, Close W, Funk L, Rasmussen J, Bsoul A, Schierhorn A, Schmidt M, Sigurdson CJ, Jucker M et Fandrich M (2019) Cryo-EM structure and polymorphism of Abeta amyloid fibrils purified from Alzheimer's brain tissue. *Nature communication* 10: 4760.
- Koo BW et Miranker AD (2005) Contribution of the intrinsic disulfide to the assembly mechanism of islet amyloid. *Protein science : A publication of the protein society* 14: 231-239.
- Kowitsch A, Zhou G et Groth T (2018) Medical application of glycosaminoglycans: a review. *Journal of tissue engineering regenerative medicine* 12: e23-e41.
- Krishnan B et Gierasch LM (2008) Cross-strand split tetra-Cys motifs as structure sensors in a β -sheet protein. *Chemistry & biology* 15: 1104-1115.
- Krotee P, Rodriguez JA, Sawaya MR, Cascio D, Reyes FE, Shi D, Hattne J, Nannenga BL, Oskarsson ME, Philipp S, et al. (2017) Atomic structures of fibrillar segments of hIAPP suggest tightly mated beta-sheets are important for cytotoxicity. *Elife* 6: 19273
- Kruger DF et Gloster MA (2004) Pramlintide for the treatment of insulin-requiring diabetes mellitus: rationale and review of clinical data. *Drugs* 64: 1419-1432.
- Kumar S, Birol M, Schlamadinger DE, Wojcik SP, Rhoades E et Miranker AD (2016) Foldamer-mediated manipulation of a pre-amyloid toxin. *Nature communication* 7: 11412.
- Kuschert GS, Hoogewerf AJ, Proudfoot AE, Chung CW, Cooke RM, Hubbard RE, Wells TN et Sanderson PN (1998) Identification of a glycosaminoglycan binding surface on human interleukin-8. *Biochemistry* 37: 11193-11201.
- Laghaei R, Mousseau N et Wei G (2011) Structure and thermodynamics of amylin dimer studied by Hamiltonian-temperature replica exchange molecular dynamics simulations. *Journal of physical chemistry B* 115: 3146-3154.

- Langelan DN, Bebbington EM, Reddy T et Rainey JK (2009) Structural insight into G-protein coupled receptor binding by apelin. *Biochemistry* 48: 537-548.
- Langelan DN et Rainey JK (2009) Headgroup-dependent membrane catalysis of apelin-receptor interactions is likely. *Journal of physical chemical B* 113: 10465-10471.
- Langelan DNLN et Rainey JK (2010) Membrane catalysis of peptide-receptor binding This paper is one of a selection of papers published in this special issue entitled "Canadian society of biochemistry, molecular & cellular biology 52nd annual meeting — Protein folding: principles and diseases" and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and cell Biology* 88: 203-210.
- Larson JL et Miranker AD (2004) The mechanism of insulin action on islet amyloid polypeptide fiber formation. *Journal of molecular biology* 335: 221-231.
- Last NB et Miranker AD (2013) Common mechanism unites membrane poration by amyloid and antimicrobial peptides. *Proceedings of the national academy of sciences of United States of America* 110: 6382-6387.
- Last NB, Schlamadinger DE et Miranker AD (2013) A common landscape for membrane-active peptides. *Protein science* 22: 870-882.
- Law E, Lu S, Kieffer TJ, Warnock GL, Ao Z, Woo M et Marzban L (2010) Differences between amyloid toxicity in alpha and beta cells in human and mouse islets and the role of caspase-3. *Diabetologia* 53: 1415-1427.
- Lee CC, Julian MC, Tiller KE, Meng F, DuConge SE, Akter R, Raleigh DP et Tessier PM (2016) Design and optimization of anti-amyloid domain antibodies specific for beta-amyloid and islet amyloid polypeptide. *Journal of biological chemistry* 291: 2858-2873.
- Lee CC, Sun Y et Huang HW (2012) How type II diabetes-related islet amyloid polypeptide damages lipid bilayers. *Biophysical journal* 102: 1059-1068.
- Lee J, Culyba EK, Powers ET et Kelly JW (2011) Amyloid- β forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. *Nature chemical biology* 7: 602-609.

- Lefkowitz RJ (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends in pharmacological sciences* 25: 413-422.
- LeVine H, 3rd (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein science* 2: 404-410.
- Li J, McQuade T, Siemer AB, Napetschnig J, Moriwaki K, Hsiao Y-S, Damko E, Moquin D, Walz T, McDermott A, et al. (2012) The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* 150: 339-350.
- Li SC, Goto NK, Williams KA et Deber CM (1996) Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 93: 6676-6681.
- Li Y, Xu W, Mu Y et Zhang JZ (2013) Acidic pH retards the fibrillization of human Islet Amyloid Polypeptide due to electrostatic repulsion of histidines. *Journal of chemical physics* 139: 055102.
- Łoboda D et Rowińska-Żyrek M (2017) Zn(II) - pramlintide: Stability, binding sites and unexpected aggregation. *Journal of inorganic biochemistry* 174: 150-155.
- Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC et Yankner BA (1994) Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* 368: 756-760.
- Lu J-X, Qiang W, Yau W-M, Schwieters CD, Meredith SC et Tycko R (2013) Molecular structure of β -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell* 154: 10.1016/j.cell.2013.1008.1035.
- Luca S, Yau WM, Leapman R et Tycko R (2007) Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: constraints from solid-state NMR. *Biochemistry* 46: 13505-13522.
- Lutz TA, Geary N, Szabady MM, Del Prete E et Scharrer E (1995) Amylin decreases meal size in rats. *Physiology and behavior* 58: 1197-1202.

- Ma L, Yang C, Zheng J, Chen Y, Xiao Y et Huang K (2020) Non-polyphenolic natural inhibitors of amyloid aggregation. *European journal of medicinal chemistry* 192: 112197.
- Ma Z, Westermark GT, Sakagashira S, Sanke T, Gustavsson A, Sakamoto H, Engstrom U, Nanjo K et Westermark P (2001) Enhanced in vitro production of amyloid-like fibrils from mutant (S20G) islet amyloid polypeptide. *Amyloid* 8: 242-249.
- Madine J (2019) Cofactor-mediated amyloidogenesis. *Bioscience reports* 39: BSR20190327
- Madine J, Jack E, Stockley PG, Radford SE, Serpell LC et Middleton DA (2008) Structural insights into the polymorphism of amyloid-like fibrils formed by region 20-29 of amylin revealed by solid-state NMR and X-ray fiber diffraction. *Journal of the American chemical society* 130: 14990-15001.
- Madine J et Middleton DA (2010) Comparison of aggregation enhancement and inhibition as strategies for reducing the cytotoxicity of the aortic amyloid polypeptide medin. *European biophysical journal* 39: 1281-1288.
- Magzoub M et Miranker AD (2012) Concentration-dependent transitions govern the subcellular localization of islet amyloid polypeptide. *The FASEB journal* 26: 1228-1238.
- Maiza A, Chantepie S, Vera C, Fifre A, Huynh MB, Stettler O, Ouidja MO et Papy-Garcia D (2018) The role of heparan sulfates in protein aggregation and their potential impact on neurodegeneration. *FEBS Letter* 592: 3806-3818.
- Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, Jessberger S, Vadodaria K, Rissman RA, Singru PS, Nilsson KP, Simon R, Schubert D, et al. (2009) Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science* 325: 328-332.
- Makin OS et Serpell LC (2005) Structures for amyloid fibrils. *Febs journal* 272: 5950-5961.
- Mannini B, Mulvihill E, Sgromo C, Cascella R, Khodarahmi R, Ramazzotti M, Dobson CM, Cecchi C et Chiti F (2014) Toxicity of protein oligomers is rationalized by a function combining size and surface hydrophobicity. *ACS Chemical biology* 9: 2309-2317.

- Martel A, Antony L, Gerelli Y, Porcar L, Fluit A, Hoffmann K, Kiesel I, Vivaudou M, Fragneto G et de Pablo JJ (2017) Membrane permeation versus amyloidogenicity: A multitechnique study of islet amyloid polypeptide interaction with model membranes. *Journal of the American chemical society* 139: 137-148.
- Martin B, Lopez de Maturana R, Brenneman R, Walent T, Mattson MP et Maudsley S (2005) Class II G protein-coupled receptors and their ligands in neuronal function and protection. *Neuromolecular medicine* 7: 3-36.
- Martin DJ et Ramirez-Alvarado M (2010) Comparison of amyloid fibril formation by two closely related immunoglobulin light chain variable domains. *Amyloid* 17: 129-136.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM et Green DR (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal of experimental medicine* 182: 1545-1556.
- Masini M, Bugliani M, Lupi R, del Guerra S, Boggi U, Filipponi F, Marselli L, Masiello P et Marchetti P (2009) Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia* 52: 1083-1086.
- Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, Becker C, Franchi L, Yoshihara E, Chen Z, et al. (2010) Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nature immunology* 11: 897-904.
- Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Göke B, Thorens B et Drucker DJ (2003) International union of pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacological reviews* 55: 167.
- McDermott MT et Kidd GS (1987) The role of calcitonin in the development and treatment of osteoporosis. *Endocrine reviews* 8: 377-390.
- McLaurin J, Franklin T, Zhang X, Deng J et Fraser PE (1999) Interactions of Alzheimer amyloid-beta peptides with glycosaminoglycans effects on fibril nucleation and growth. *European journal of biochemistry* 266: 1101-1110.

- Meier JJ, Kaye R, Lin C-Y, Gurlo T, Haataja L, Jayasinghe S, Langen R, Glabe CG et Butler PC (2006) Inhibition of human IAPP fibril formation does not prevent β -cell death: evidence for distinct actions of oligomers and fibrils of human IAPP. *American journal of physiology - endocrinology and metabolism* 291: E1317-E1324.
- Meng F, Abedini A, Plesner A, Verchere CB et Raleigh DP (2010) The flavanol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide, disaggregates amyloid fibrils and protects cultured cells against IAPP induced toxicity. *Biochemistry* 49: 8127-8133.
- Meng F, Abedini A, Song B et Raleigh DP (2007) Amyloid formation by pro-islet amyloid polypeptide processing intermediates: examination of the role of protein heparan sulfate interactions and implications for islet amyloid formation in type 2 diabetes. *Biochemistry* 46: 12091-12099.
- Meng F, Marek P, Potter KJ, Verchere CB et Raleigh DP (2008) Rifampicin does not prevent amyloid fibril formation by human islet amyloid polypeptide but does inhibit fibril thioflavin-T interactions: implications for mechanistic studies of beta-cell death. *Biochemistry* 47: 6016-6024.
- Meng F et Raleigh DP (2011) Inhibition of glycosaminoglycan-mediated amyloid formation by islet amyloid polypeptide and proIAPP processing intermediates. *Journal of molecular biology* 406: 491-502.
- Mirzabekov TA, Lin M-c et Kagan BL (1996) Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin. *Journal of biological chemistry* 271: 1988-1992.
- Moore SJ, Sonar K, Bharadwaj P, Deplazes E et Mancera RL (2018) Characterisation of the structure and oligomerisation of islet amyloid polypeptides (IAPP): A review of molecular dynamics simulation studies. *Molecules (Basel, Switzerland)* 23: 2142.
- Morfis M, Christopoulos A et Sexton PM (2003) RAMPs: 5 years on, where to now? *Trends in pharmacological sciences* 24: 596-601.
- Mosselman S, Hoppener JW, Lips CJ et Jansz HS (1989) The complete islet amyloid polypeptide precursor is encoded by two exons. *FEBS Letter* 247: 154-158.

- Mosselman S, Hoppener JW, Zandberg J, van Mansfeld AD, Geurts van Kessel AH, Lips CJ et Jansz HS (1988) Islet amyloid polypeptide: identification and chromosomal localization of the human gene. *FEBS Letter* 239: 227-232.
- Motta A, Andreotti G, Amodeo P, Strazzullo G et Castiglione Morelli MA (1998) Solution structure of human calcitonin in membrane-mimetic environment: the role of the amphipathic helix. *Proteins* 32: 314-323.
- Mukherjee A, Morales-Scheihing D, Salvadores N, Moreno-Gonzalez I, Gonzalez C, Taylor-Presse K, Mendez N, Shahnawaz M, Gaber AO, Sabek OM, et al. (2017) Induction of IAPP amyloid deposition and associated diabetic abnormalities by a prion-like mechanism. *Journal of experimental medicine* 214: 2591-2610.
- Mulloy B, Forster MJ, Jones C et Davies DB (1993) N.m.r. and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin. *Biochemical journal* 293 (Pt 3): 849-858.
- Mutt V, Jorpes JE et Magnusson S (1970) Structure of porcine secretin. The amino acid sequence. *European journal of biochemistry* 15: 513-519.
- Nagel-Steger L, Owen MC et Strodel B (2016) An account of amyloid oligomers: facts and figures obtained from experiments and simulations. *ChemBioChem* 17: 657-676.
- Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M et Takeda T (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Analytical biochemistry* 177: 244-249.
- Nanga RPR, Brender JR, Vivekanandan S et Ramamoorthy A (2011) Structure and membrane orientation of IAPP in its natively amidated form at physiological pH in a membrane environment. *Biochimica et biophysica acta* 1808: 2337-2342.
- Nanga RPR, Brender JR, Xu J, Hartman K, Subramanian V et Ramamoorthy A (2009) Three-dimensional structure and orientation of rat islet amyloid polypeptide protein in a membrane environment by solution NMR spectroscopy. *Journal of the American chemical society* 131: 8252-8261.

- Naot D, Musson DS et Cornish J (2018) The activity of peptides of the calcitonin family in bone. *Physiological reviews* 99: 781-805.
- Naot D, Musson DS et Cornish J (2019) The activity of peptides of the calcitonin family in bone. *Physiological reviews* 99: 781-805.
- Nedumpully-Govindan P, Kakinen A, Pilkington EH, Davis TP, Chun Ke P et Ding F (2016) Stabilizing off-pathway oligomers by polyphenol nanoassemblies for IAPP aggregation inhibition. *Scientific reports* 6: 19463.
- Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AO, Riekel C, Grothe R et Eisenberg D (2005) Structure of the cross-[beta] spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435: 773-778.
- Nespovitaya N, Gath J, Barylyuk K, Seuring C, Meier BH et Riek R (2016) Dynamic assembly and disassembly of functional β -endorphin amyloid fibrils. *Journal of the american chemical society* 138: 846-856.
- Neumann J-M, Couvineau A, Murail S, Lacapère J-J, Jamin N et Laburthe M (2008) Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? *Trends in biochemical sciences* 33: 314-319.
- Nguyen PT, Andraka N, De Carufel CA et Bourgault S (2015) Mechanistic contributions of biological cofactors in islet amyloid polypeptide amyloidogenesis. *Journal of diabetes research* 2015: 515307.
- Nicolson TJ, Bellomo EA, Wijesekara N, Loder MK, Baldwin JM, Gyulkhandanyan AV, Koshkin V, Tarasov AI, Carzaniga R, Kronenberger K, et al. (2009) Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants. *Diabetes* 58: 2070-2083.
- Nilsson MR (2016) Insulin amyloid at injection sites of patients with diabetes. *Amyloid* 23: 139-147.
- Nishi M, Chan SJ, Nagamatsu S, Bell GI et Steiner DF (1989) Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 86: 5738-5742.

- O'Brien TD, Westermark P et Johnson KH (1990) Islet amyloid polypeptide and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in amyloid and tumor cells of canine pancreatic endocrine tumors. *Veterinary pathology* 27: 194-198.
- Opie EL (1901) On the relation of chronic interstitial pancreatitis to the islands of langerhans and to diabetes melutus. *The Journal of Experimental Medicine* 5: 397-428.
- Oskarsson ME, Singh K, Wang J, Vlodaysky I, Li J-p et Westermark GT (2015) Heparan sulfate proteoglycans are important for islet amyloid formation and islet amyloid polypeptide-induced apoptosis. *Journal of the biological chemistry* 290: 15121-15132.
- Otzen D et Riek R (2019) Functional amyloids. *Cold spring harbor perspectives in biology* 11: a033860.
- Overington JP, Al-Lazikani B et Hopkins AL (2006) How many drug targets are there? *Nature reviews drug discovery* 5: 993-996.
- Padrick SB et Miranker AD (2002) Islet amyloid: phase partitioning and secondary nucleation are central to the mechanism of fibrillogenesis. *Biochemistry* 41: 4694-4703.
- Palhano FL, Lee J, Grimster NP et Kelly JW (2013) Toward the molecular mechanism(s) by which EGCG treatment remodels mature amyloid fibrils. *Journal of the American chemical society* 135: 7503-7510.
- Pankov R, Markovska T, Antonov P, Ivanova L et Momchilova A (2006) The plasma membrane lipid composition affects fusion between cells and model membranes. *Chemical-biological interactions* 164: 167-173.
- Papy-Garcia D, Christophe M, Huynh MB, Fernando S, Ludmilla S, Sepulveda-Diaz JE et Raisman-Vozari R (2011) Glycosaminoglycans, protein aggregation and neurodegeneration. *Current protein and peptide science* 12: 258-268.
- Paravastu AK, Leapman RD, Yau WM et Tycko R (2008) Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 105: 18349-18354.

- Park YJ, Lee S, Kieffer TJ, Warnock GL, Safikhan N, Speck M, Hao Z, Woo M et Marzban L (2012) Deletion of Fas protects islet beta cells from cytotoxic effects of human islet amyloid polypeptide. *Diabetologia* 55: 1035-1047.
- Parthier C, Reedtz-Runge S, Rudolph R et Stubbs MT (2009) Passing the baton in class B GPCRs: peptide hormone activation via helix induction? *Trends in biochemical sciences* 34: 303-310.
- Patil SM, Mehta A, Jha S et Alexandrescu AT (2011) Heterogeneous amylin fibril growth mechanisms imaged by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochemistry* 50: 2808-2819.
- Patil SM, Xu S, Sheftic SR et Alexandrescu AT (2009) Dynamic alpha-helix structure of micelle-bound human amylin. *The Journal of biological chemistry* 284: 11982-11991.
- Pepys MB, Rademacher TW, Amatayakul-Chantler S, Williams P, Noble GE, Hutchinson WL, Hawkins PN, Nelson SR, Gallimore JR, Herbert J, et al. (1994) Human serum amyloid P component is an invariant constituent of amyloid deposits and has a uniquely homogeneous glycostructure. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of Academy* 91: 5602-5606.
- Perez-Castells J, Martin-Santamaria S, Nieto L, Ramos A, Martinez A, Pascual-Teresa B et Jimenez-Barbero J (2012) Structure of micelle-bound adrenomedullin: a first step toward the analysis of its interactions with receptors and small molecules. *Biopolymers* 97: 45-53.
- Peterson FC, Elgin ES, Nelson TJ, Zhang F, Hoeger TJ, Linhardt RJ et Volkman BF (2004) Identification and characterization of a glycosaminoglycan recognition element of the C chemokine lymphotactin. *Journal of biological chemistry* 279: 12598-12604.
- Petkova AT, Yau W-M et Tycko R (2006) Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Biochemistry* 45: 498-512.
- Pham VI et Sexton PM (2004) Photoaffinity scanning in the mapping of the peptide receptor interface of class II G protein-coupled receptors. *Journal of peptide science* 10: 179-203.

- Potter KJ, Werner I, Denroche HC, Montane J, Plesner A, Chen Y, Lei D, Soukhatcheva G, Warnock GL, Oberholzer J, et al. (2015) Amyloid formation in human islets is enhanced by heparin and inhibited by heparinase. *American journal of transplantation* 15: 1519-1530.
- Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA et Foord SM (2002) International union of pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacological reviews* 54: 233.
- Puchtler H et Sweat F (1965) Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *Journal of histochemistry and cytochemistry* 13: 693-694.
- Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, Frangione B, Kagan B, Ghiso J et Lal R (2005) Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 102: 10427-10432.
- Quittot N, Sebastiao M, Al-Halifa S et Bourgault S (2018) Kinetic and conformational insights into islet amyloid polypeptide self-assembly using a biarsenical fluorogenic probe. *Bioconjugate chemistry* 29: 517-527.
- Quittot N, Sebastiao M et Bourgault S (2017) Modulation of amyloid assembly by glycosaminoglycans: from mechanism to biological significance. *Biochemistry and cell biology* 95: 329-337.
- Raleigh D, Zhang X, Hastoy B et Clark A (2017) The beta-cell assassin: IAPP cytotoxicity. *Journal of molecular endocrinology* 59: R121-R140.
- Relini A, De Stefano S, Torrassa S, Cavalleri O, Rolandi R, Gliozzi A, Giorgetti S, Raimondi S, Marchese L, Verga L, et al. (2008) Heparin strongly enhances the formation of beta2-microglobulin amyloid fibrils in the presence of type I collagen. *Journal of biological chemistry* 283: 4912-4920.
- Ridgway Z, Eldrid C, Zhyvoloup A, Ben-Younis A, Noh D, Thalassinos K et Raleigh DP (2020) Analysis of proline substitutions reveals the plasticity and sequence sensitivity of human IAPP amyloidogenicity and toxicity. *Biochemistry* 59: 742-754.

- Ritter SL et Hall RA (2009) Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature reviews molecular cell biology* 10: 819-830.
- Rivera JF, Gurlo T, Daval M, Huang CJ, Matveyenko AV, Butler PC et Costes S (2011) Human-IAPP disrupts the autophagy/lysosomal pathway in pancreatic beta-cells: protective role of p62-positive cytoplasmic inclusions. *Cell death differ* 18: 415-426.
- Robinson RM, Blakeney EW, Jr. et Mattice WL (1982) Lipid-induced conformational changes in glucagon, secretin, and vasoactive intestinal peptide. *Biopolymers* 21: 1271-1228.
- Rocken C, Linke RP et Saeger W (1992) Immunohistology of islet amyloid polypeptide in diabetes mellitus: semi-quantitative studies in a post-mortem series. *Virchows arch a pathol anat histopathol* 421: 339-344.
- Roden M et Shulman GI (2019) The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature* 576: 51-60.
- Röder C, Kupreichyk T, Gremer L, Schäfer LU, Pothula KR, Ravelli RBG, Willbold D, Hoyer W et Schröder GF (2020) Cryo-EM structure of islet amyloid polypeptide fibrils reveals similarities with amyloid- β fibrils. *Nature structural molecular biology* 27: 660-667.
- Rodriguez Camargo DC, Tripsianes K, Buday K, Franko A, Göbl C, Hartlmüller C, Sarkar R, Aichler M, Mettenleiter G, Schulz M, et al. (2017) The redox environment triggers conformational changes and aggregation of hIAPP in Type II Diabetes. *Scientific reports* 7: 44041.
- Roy A, Kucukural A et Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols* 5: 725-738.
- Sandwall E, O'Callaghan P, Zhang X, Lindahl U, Lannfelt L et Li J-P (2010) Heparan sulfate mediates amyloid-beta internalization and cytotoxicity. *Glycobiology* 20: 533-541.
- Sargent DF et Schwyzer R (1986) Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 5774-5778.

- Saridaki T, Zampagni M, Mannini B, Evangelisti E, Taddei N, Cecchi C et Chiti F (2012) Glycosaminoglycans (GAGs) suppress the toxicity of HypF-N prefibrillar aggregates. *Journal of molecular biology* 421: 616-630.
- Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJ, McFarlane HT, et al. (2007) Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447: 453-457.
- Scheck RA et Schepartz A (2011) Surveying Protein Structure and Function Using Bis-Arsenical Small Molecules. *Accounts of chemical research* 44: 654-665.
- Schlamadinger DE et Miranker AD (2014) Fiber-dependent and -independent toxicity of islet amyloid polypeptide. *Biophysical journal* 107: 2559-2566.
- Sebastiao M, Quittot N et Bourgault S (2017) Thioflavin T fluorescence to analyse amyloid formation kinetics: Measurement frequency as a factor explaining irreproducibility. *Analytical biochemistry* 532: 83-86.
- Sebastiao M, Quittot N, Marcotte I et Bourgault S (2019) Glycosaminoglycans induce amyloid self-assembly of a peptide hormone by concerted secondary and quaternary conformational transitions. *Biochemistry* 58: 1214-1225.
- Sekar R et Chow BK (2013) Role of secretin peptide family and their receptors in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Hormone and metabolic research* 45: 945-954.
- Sekar R, Wang L et Chow BK (2017) Central control of feeding behavior by the secretin, PACAP, and glucagon family of peptides. *Frontiers in endocrinology (Lausanne)* 8: 18.
- Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, Arnsdorf MF et Lindquist SL (2000) Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* 289: 1317.
- Sexton PM, Paxinos G, Kenney MA, Wookey PJ et Beaumont K (1994) In vitro autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain. *Neuroscience* 62: 553-567.

- Sezgin E, Kaiser HJ, Baumgart T, Schwille P, Simons K et Levental I (2012) Elucidating membrane structure and protein behavior using giant plasma membrane vesicles. *Nature protocols* 7: 1042-1051.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, et al. (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature medicine* 14: 837-842.
- Sherwood NM, Krueckl SL et McRory JE (2000) The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocrine reviews* 21: 619-670.
- Shigihara N, Fukunaka A, Hara A, Komiya K, Honda A, Uchida T, Abe H, Toyofuku Y, Tamaki M, Ogihara T, et al. (2014) Human IAPP-induced pancreatic β cell toxicity and its regulation by autophagy. *The journal of clinical investigation* 124: 3634-3644.
- Shorter J et Lindquist S (2005) Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nature reviews genetics* 6: 435-450.
- Singh K, Senthil V, Arokiaraj AWR, Leprince J, Lefranc B, Vaudry D, Allam AA, Ajarem J et Chow BKC (2016) Structure-activity relationship studies of N- and C-terminally modified secretin analogs for the human secretin receptor. *PLoS ONE* 11: e0149359.
- Solomon B (2005) Generation of anti- β -amyloid antibodies via phage display technology towards Alzheimer's disease vaccination. *Vaccine* 23: 2327-2330.
- Solomon JP, Bourgault S, Powers ET et Kelly JW (2011) Heparin binds 8 kDa gelsolin cross-beta-sheet oligomers and accelerates amyloidogenesis by hastening fibril extension. *Biochemistry* 50: 2486-2498.
- Soragni A, Yousefi S, Stoeckle C, Soriaga AB, Sawaya MR, Kozlowski E, Schmid I, Radonjic-Hoesli S, Boutet S, Williams GJ, et al. (2015) Toxicity of eosinophil MBP is repressed by intracellular crystallization and promoted by extracellular aggregation. *Molecular cell* 57: 1011-1021.
- Stoppini M et Bellotti V (2015) Systemic Amyloidosis: Lessons from $\beta(2)$ -Microglobulin. *The journal of biological chemistry* 290: 9951-9958.

- Subramanian SL, Hull RL, Zraika S, Aston-Mourney K, Udayasankar J et Kahn SE (2012) cJUN N-terminal kinase (JNK) activation mediates islet amyloid-induced beta cell apoptosis in cultured human islet amyloid polypeptide transgenic mouse islets. *Diabetologia* 55: 166-174.
- Sun J, Murata T et Shigemori H (2020) Inhibitory activities of phenylpropanoids from *Lycopus lucidus* on amyloid aggregation related to Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Journal of natural medicines* 74: 579-583.
- Sunde M et Blake CC (1998) From the globular to the fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Quarterly reviews of biophysics* 31: 1-39.
- Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB et Blake CC (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *Journal of molecular biology* 273: 729-739.
- Tam JK, Lee LT, Jin J et Chow BK (2014) Molecular evolution of GPCRs: Secretin/secretin receptors. *Journal of molecular endocrinology* 52: T1-14.
- Tan YV, Couvineau A, Murail S, Ceraudo E, Neumann JM, Lacapere JJ et Laburthe M (2006) Peptide agonist docking in the N-terminal ectodomain of a class II G protein-coupled receptor, the VPAC1 receptor. Photoaffinity, NMR, and molecular modeling. *Journal of biological chemistry* 281: 12792-12798.
- Tchoumi Neree A, Nguyen PT et Bourgault S (2015) Cell-Penetrating Ability of Peptide Hormones: Key Role of Glycosaminoglycans Clustering. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 27391-27400.
- Tchoumi Neree A, Nguyen PT, Chatenet D, Fournier A et Bourgault S (2014) Secondary conformational conversion is involved in glycosaminoglycans-mediated cellular uptake of the cationic cell-penetrating peptide PACAP. *FEBS Letter* 588: 4590-4596.
- Templin AT, Mellati M, Soininen R, Hogan MF, Esser N, Castillo JJ, Zraika S, Kahn SE et Hull RL (2019) Loss of perlecan heparan sulfate glycosaminoglycans lowers body weight and decreases islet amyloid deposition in human islet amyloid polypeptide transgenic mice. *Protein engineering, design and selection* 32: 95-102.

- Teoh CL, Su D, Sahu S, Yun S-W, Drummond E, Prelli F, Lim S, Cho S, Ham S, Wisniewski T, et al. (2015) Chemical Fluorescent Probe for Detection of A β Oligomers. *Journal of the American chemical society* 137: 13503-13509.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C et Karamanos NK (2016) Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews* 97: 4-27.
- Thomas CM, Asa SL, Ezzat S, Sawka AM et Goldstein D (2019) Diagnosis and pathologic characteristics of medullary thyroid carcinoma-review of current guidelines. *Current oncology (Toronto, Ont)* 26: 338-344.
- Thompson LD, Pantoliano MW et Springer BA (1994) Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: Identification of the heparin binding domain. *Biochemistry* 33: 3831-3840.
- Tomasello MF, Sinopoli A et Pappalardo G (2015) On the environmental factors affecting the structural and cytotoxic properties of IAPP peptides. *Journal of diabetes research* 2015: 918573-918573.
- Tsiolaki PL, Nasi GI, Baltoumas FA, Louros NN, Magafa V, Hamodrakas SJ et Iconomidou VA (2018) alphaCGRP, another amyloidogenic member of the CGRP family. *Journal of structural biology* 203: 27-36.
- Tu L-H, Serrano Arnaldo L, Zanni Martin T et Raleigh Daniel P (2014) Mutational analysis of preamyloid intermediates: The role of His-Tyr interactions in islet amyloid formation. *Biophysical journal* 106: 1520-1527.
- Tu L-H, Young LM, Wong AG, Ashcroft AE, Radford SE et Raleigh DP (2015) Mutational analysis of the ability of resveratrol to inhibit amyloid formation by islet amyloid polypeptide: Critical evaluation of the importance of aromatic:inhibitor and histidine:inhibitor interactions. *Biochemistry* 54: 666-676.
- Tycko R (2015) Amyloid polymorphism: Structural Basis and Neurobiological Relevance. *Neuron* 86: 632-645.
- Umetsu Y, Tenno T, Goda N, Shirakawa M, Ikegami T et Hiroaki H (2011) Structural difference of vasoactive intestinal peptide in two distinct membrane-mimicking environments. *Biochimica and biophysica acta* 1814: 724-730.

- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, et al. (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological reviews* 61: 283-357.
- Vidal J, Verchere CB, Andrikopoulos S, Wang F, Hull RL, Cnop M, Olin KL, LeBoeuf RC, O'Brien KD, Chait A, et al. (2003) The effect of apolipoprotein E deficiency on islet amyloid deposition in human islet amyloid polypeptide transgenic mice. *Diabetologia* 46: 71-79.
- Villardaga JP, Di Paolo E, Bialek C, De Neef P, Waelbroeck M, Bollen A et Robberecht P (1997) Mutational analysis of extracellular cysteine residues of rat secretin receptor shows that disulfide bridges are essential for receptor function. *European journal of biochemistry* 246: 173-180.
- Wälti MA, Ravotti F, Arai H, Glabe CG, Wall JS, Böckmann A, Güntert P, Meier BH et Riek R (2016) Atomic-resolution structure of a disease-relevant A β (1–42) amyloid fibril. *Proceedings of the national academy of Sciences of the United States of America* 113: E4976-E4984.
- Wang H, Cao P et Raleigh DP (2013) Amyloid formation in heterogeneous environments: Islet amyloid polypeptide glycosaminoglycan interactions. *Journal of molecular biology* 425: 492-505.
- Wang H, Ridgway Z, Cao P, Ruzsicska B et Raleigh DP (2015) Analysis of the ability of pramlintide to inhibit amyloid formation by human islet amyloid polypeptide reveals a balance between optimal recognition and reduced amyloidogenicity. *Biochemistry* 54: 6704-6711.
- Wang L, Li Y, Lu T et Li F (2014) The effects of organic solvents on the membrane-induced fibrillation of human islet amyloid polypeptide and on the inhibition of the fibrillation. *Biochimica and biophysica acta* 1838: 3162-3170.
- Wang S-T, Lin Y, Hsu C-C, Amdursky N, Spicer CD et Stevens MM (2017) Probing amylin fibrillation at an early stage via a tetracysteine-recognising fluorophore. *Talanta* 173: 44-50.
- Wasmer C, Lange A, Van Melckebeke H, Siemer AB, Riek R et Meier BH (2008) Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science* 319: 1523-1526.

- Watkins HA, Au M et Hay DL (2012) The structure of secretin family GPCR peptide ligands: implications for receptor pharmacology and drug development. *Drug Discovery Today* 17: 1006-1014.
- Wei L, Jiang P, Xu W, Li H, Zhang H, Yan L, Chan-Park MB, Liu X-W, Tang K, Mu Y, et al. (2011) The molecular basis of distinct aggregation pathways of islet amyloid polypeptide. *The journal of biological chemistry* 286: 6291-6300.
- Wesen E, Gallud A, Paul A, Lindberg DJ, Malmberg P et Esbjorner EK (2018) Cell surface proteoglycan-mediated uptake and accumulation of the Alzheimer's disease peptide Abeta(1-42). *Biochimica and biophysica acta biomembrane* 1860: 2204-2214.
- Westermarck GT et Westermarck P (2011) Localized amyloids important in diseases outside the brain – lessons from the islets of Langerhans and the thoracic aorta. *FEBS journal* 278: 3918-3929.
- Westermarck P (2011) Amyloid in the islets of Langerhans: Thoughts and some historical aspects. *Upsala journal of medical sciences* 116: 81-89.
- Westermarck P, Andersson A et Westermarck GT (2011) Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiological reviews* 91: 795-826.
- Westermarck P, Engström U, Johnson KH, Westermarck GT et Betsholtz C (1990) Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 87: 5036-5040.
- Westermarck P, Wernstedt C, Wilander E, Hayden DW, O'Brien TD et Johnson KH (1987) Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 84: 3881-3885.
- Westermarck P, Wernstedt C, Wilander E et Sletten K (1986) A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochemical and biophysical research communication* 140: 827-831.

- Westwell-Roper C, Dai DL, Soukhatcheva G, Potter KJ, van Rooijen N, Ehses JA et Verchere CB (2011) IL-1 blockade attenuates islet amyloid polypeptide-induced proinflammatory cytokine release and pancreatic islet graft dysfunction. *Journal of immunology* 187: 2755-2765.
- Wieprecht T, Dathe M, Schumann M, Krause E, Beyermann M et Bienert M (1996) Conformational and functional study of magainin 2 in model membrane environments using the new approach of systematic double-D-amino acid replacement. *Biochemistry* 35: 10844-10853.
- Williams C et Hill SJ (2009) GPCR signaling: understanding the pathway to successful drug discovery. *Methods in molecular biology* 552: 39-50.
- Williamson JA et Miranker AD (2007) Direct detection of transient alpha-helical states in islet amyloid polypeptide. *Protein science* 16: 110-117.
- Wiltzius JJW, Sievers SA, Sawaya MR, Cascio D, Popov D, Riek C et Eisenberg D (2008) Atomic structure of the cross- β spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein science : A publication of the protein society* 17: 1467-1474.
- Wolfe LS, Calabrese MF, Nath A, Blaho DV, Miranker AD et Xiong Y (2010) Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye thioflavin T. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 107: 16863-16868.
- Wolwertz ML, Nguyen PT, Quittot N et Bourgault S (2016) Probing the role of lambda6 immunoglobulin light chain dimerization in amyloid formation. *Biochimica and biophysica acta* 1864: 409-418.
- Wong AG, Wu C, Hannaberry E, Watson MD, Shea J-E et Raleigh DP (2016) Analysis of the amyloidogenic potential of pufferfish (*Takifugu rubripes*) islet amyloid polypeptide highlights the limitations of Thioflavin-T assays and the difficulties in defining amyloidogenicity. *Biochemistry* 55: 510-518.
- Wray V, Nokihara K et Naruse S (1998) Solution structure comparison of the VIP/PACAP family of peptides by NMR spectroscopy. *Annals of the New York academy of sciences* 865: 37-44.

- Yamamura T, Dong LM et Yamamoto A (1999) Characterization of apolipoprotein E7 (Glu(244)-->Lys, Glu(245)-->Lys), a mutant apolipoprotein E associated with hyperlipidemia and atherosclerosis. *Journal of lipid research* 40: 253-259.
- Yanagi K, Ashizaki M, Yagi H, Sakurai K, Lee Y-H et Goto Y (2011) Hexafluoroisopropanol induces amyloid fibrils of islet amyloid polypeptide by enhancing both hydrophobic and electrostatic interactions. *The journal of biological chemistry* 286: 23959-23966.
- Yonemoto IT, Kroon GJA, Dyson HJ, Balch WE et Kelly JW (2008) Amylin proprotein processing generates progressively more amyloidogenic peptides that initially sample the helical state. *Biochemistry* 47: 9900-9910.
- Young A (1997) Role of amylin in nutrient intake - animal studies. *Diabetic medicine* 14 suppl 2: S14-18.
- Young A (2005) Historical Background. Dans *Advances in pharmacology*. Vol 52. Academic press.
- Young ID, Ailles L, Narindrasorasak S, Tan R et Kisilevsky R (1992) Localization of the basement membrane heparan sulfate proteoglycan in islet amyloid deposits in type II diabetes mellitus. *Archives of pathology and laboratory medicine* 116: 951-954.
- Young LM, Cao P, Raleigh DP, Ashcroft AE et Radford SE (2014) Ion mobility spectrometry–mass spectrometry defines the oligomeric intermediates in amylin amyloid formation and the mode of action of inhibitors. *Journal of the american chemical society* 136: 660-670.
- Zhang F, Liang X, Pu D, George KI, Holland PJ, Walsh ST et Linhardt RJ (2012) Biophysical characterization of glycosaminoglycan-IL-7 interactions using SPR. *Biochimie* 94: 242-249.
- Zhang H, Qiao A, Yang L, Van Eps N, Frederiksen KS, Yang D, Dai A, Cai X, Zhang H, Yi C, et al. (2018) Structure of the glucagon receptor in complex with a glucagon analogue. *Nature* 553: 106-110.
- Zhang S, Liu H, Yu H et Cooper GJ (2008) Fas-associated death receptor signaling evoked by human amylin in islet beta-cells. *Diabetes* 57: 348-356.

- Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9: 40.
- Zhang Y, Sun B, Feng D, Hu H, Chu M, Qu Q, Tarrasch JT, Li S, Sun Kobilka T, Kobilka BK, et al. (2017) Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein. *Nature* 546: 248-253.
- Zhu L, Tamvakopoulos C, Xie D, Dragovic J, Shen X, Fenyk-Melody JE, Schmidt K, Bagchi A, Griffin PR, Thornberry NA, et al. (2003) The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). *Journal of biological chemistry* 278: 22418-22423.
- Ziegler A et Seelig J (2008) Binding and clustering of glycosaminoglycans: a common property of mono- and multivalent cell-penetrating compounds. *Biophysical journal* 94: 2142-2149.
- Zürn A, Klenk C, Zabel U, Reiner S, Lohse MJ et Hoffmann C (2010) Site-specific, orthogonal labeling of proteins in intact cells with two small biarsenical fluorophores. *Bioconjugate chemistry* 21: 853-859.