

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RELATIONS STRUCTURE-AUTO-ASSEMBLAGE DE L'ISLET AMYLOID
POLYPEPTIDE : VERS UNE COMPRÉHENSION DE LA CONTRIBUTION DU
DOMAINE LEU12-VAL17

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
MATHILDE FORTIER

AVRIL 2022

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire 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.04-2020). 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

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Professeur Steve Bourgault, de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche, de m'avoir fait confiance au courant de mon parcours académique, mais surtout de m'avoir encouragée et de m'avoir donné une si grande opportunité. Je le remercie également de sa patience et de ses conseils judicieux.

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues de laboratoire (passés et présents), Trang, Magaryta, Mélanie, Vy, Mathew, Nadjib, Félix, Salma, Ximena, Noé, Vinay, Élisabeth, Guillaume et Dominic pour leur entraide, leur temps ainsi que leurs précieux conseils et pour tous les beaux moments passés ensemble.

Je tiens à remercier les organismes subventionnaires, le Fonds de recherche du Québec-Nature et technologies (FRQNT), pour leur soutien financier dans la réalisation de mon projet de maîtrise.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, mes amis(es), mes collègues du centre de Tai Chi et de Kung Fu, pour leur soutien moral, leur écoute, leur patience et leurs encouragements.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	ix
RÉSUMÉ.....	xi
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Islet amyloid polypeptide (IAPP).....	1
1.1.1 Découverte de l'IAPP	1
1.1.2 Phylogénie de l'IAPP.....	1
1.1.3 Peptides de la famille de la calcitonine.....	3
1.1.4 Expression et maturation <i>in vivo</i> de l'IAPP	4
1.1.5 Ensemble conformationnel secondaire	6
1.1.6 Récepteurs de IAPP.....	7
1.1.7 Activités biologiques.....	9
1.2 Dépôts amyloïdes pancréatiques et diabète de type II.....	12
1.2.1 Physiopathologie du diabète	12
1.2.2 Dépôts amyloïdes de l'IAPP dans les ilots de Langerhans.....	13
1.3 Fibres amyloïdes.....	14
1.3.1 Aspects structuraux des fibres amyloïdes	14
1.3.2 Les fibres amyloïdes de l'IAPP.....	15
1.3.3 Mécanisme d'auto-assemblage	16
1.3.4 Modèles des intermédiaires transitoires de la phase de nucléation chez l'IAPP.....	18
1.3.5 Facteurs extrinsèques influençant l'auto-assemblage des peptides amyloïdogéniques	22
1.3.6 Résidus et domaines influençant l'auto-assemblage de l'IAPP	26
1.3.6.1 Implication du pont disulfure (Cys2-Cys7).....	26
1.3.6.2 Rôle des résidus aromatiques.....	27
1.3.6.3 Rôle inhibiteur des résidus proline chez l'IAPP de rongeurs.	28
1.3.6.4 Capacité d'auto-assemblage des fragments de l'IAPP.....	29
1.4 Cytotoxicité de l'IAPP.....	30

1.4.1	Relations entre structure quaternaire et cytotoxicité.....	30
1.4.2	Mécanismes de cytotoxicité	31
1.4.2.1	Perturbation membranaire.....	32
1.4.2.2	Stress du réticulum endoplasmique (RE).....	34
1.4.2.3	Autres mécanismes intracellulaires.....	36
1.5	Problématique, hypothèses et objectifs.....	38
1.5.1	Problématique	38
1.5.2	Hypothèses	38
1.5.3	Objectifs	39
CHAPITRE II ARTICLE.....		41
2.1	Résumé	43
2.2	Abstract.....	44
2.3	Introduction.....	45
2.4	Materials and methods.....	48
2.4.1	Peptide Synthesis, Purification and Monomerization	48
2.4.2	Kinetics of Amyloid Formation Monitored by ThT Fluorescence	49
2.4.3	Self-Assembly under Fully Quiescent Conditions.....	49
2.4.4	ThT and ANS Fluorescence Spectroscopy	50
2.4.5	Circular Dichroism Spectroscopy	50
2.4.6	Transmission Electron Microscopy.....	50
2.4.7	Atomic Force Microscopy.....	51
2.4.8	Lipid Membrane Leakage	51
2.4.9	Cell viability measurements.....	52
2.5	Results and Discussion	53
2.5.1	The Fragment Leu12-Val17 Self-Assembles into β -Sheet-Rich Fibrils .	53
2.5.2	<i>Ala-Scan</i> Reveals Key Side Chains Contributions of the 12-17 Domain for Amyloid Formation	55
2.5.3	Residue Side Chains of IAPP 12-17 Segment Modulate Lipid Membrane Perturbation and Contribute to Cytotoxicity	60
2.5.4	Destabilizing the Local Conformation by Pro Incorporation Modulates IAPP Self-Assembly	63
2.5.5	Glycine Substitution within the 13-16 Segment Site-Specifically Affects IAPP Self-Assembly	66
2.5.6	Successive Incorporation of α -Methylalanine at Positions Phe15 and Leu16 Inhibits IAPP Amyloid Formation.....	69
2.5.7.	Modulating the Conformation of the Ala13-Leu16 Segment Alters IAPP Cytotoxicity.....	72

2.6	Conclusions.....	73
2.7	Supporting information.....	75
	CHAPITRE III DISCUSSION.....	84
3.1	Capacité du fragment LANFVL à former des fibres amyloïdes.....	85
3.2	La substitution successive des résidus du domaine Leu12-Val17 par une alanine révèle le rôle crucial des chaînes latérales hydrophobes au sein du processus d'auto-assemblage de l'IAPP.....	87
3.3	L'incorporation successive de résidus modifiant localement le squelette peptidique aux positions Ala13-Leu16 module l'auto-assemblage de l'IAPP ..	89
3.4	Les chaînes latérales des résidus du domaine Leu12-Val17 jouent un rôle clé dans la cytotoxicité médiée de l'IAPP ..	94
3.5	La modification locale du squelette peptidique aux positions Ala13-Leu16 module significativement la cytotoxicité de l'IAPP ..	96
	CHAPITRE IV CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	99
	BIBLIOGRAPHIE	101

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Alignement de séquence des peptides de la famille CT	4
1.2 Différentes étapes de la production de l'IAPP mature	6
1.3 Structure secondaire de l'IAPP en présence de micelles SDS à pH 7.3	7
1.4 Récepteurs de l' <i>Islet amyloid polypeptide</i>	8
1.5 Activation des récepteurs de l' <i>Islet amyloid polypeptide</i>	9
1.6 Organisation structurale de l' <i>Islet amyloid polypeptide</i>	16
1.7 Représentation des trois phases du mécanisme d'auto-assemblage de l'IAPP	17
1.8 Modèles hypothétiques des intermédiaires de la phase de nucléation lors de l'auto-assemblage de l' <i>Islet amyloid polypeptide</i>	20
1.9 Différentes voies transitionnelles entre les différentes conformations de hIAPP monomère.....	21
1.10 Les espèces toxiques de IAPP correspondent aux intermédiaires de la phase de nucléation.....	31
1.11 Mécanismes hypothétiques de la perturbation membranaire causée par l'IAPP	34
1.12 Mécanismes intracellulaires hypothétiques par lesquels l'IAPP pourrait induire une cytotoxicité	37
2.1 Amyloidogenicity of the 12-17 region of IAPP	54
2.2 Effects of Ala substitution within the 12-17 domain on the kinetics of IAPP self-assembly	56
2.3 Effect of Ala-substitution within the 12-17 segment of IAPP on amyloid formation.....	59
2.4 Lipid vesicle perturbation and cytotoxicity of Ala-substituted derivatives.	61

2.5	Effects of Pro substitution within the 13-16 segment of IAPP on amyloid self-assembly	65
2.6	Effects of Gly substitution within the 13-16 segment on IAPP self-assembly	68
2.7	Effects of backbone α -methylation within 13-16 segment on IAPP self-assembly	71
2.8	Cytotoxicity of Pro, Gly and Aib substituted IAPP.....	73
2.S1	ThT and ANS fluorescence of IAPP ₁₂₋₁₇	76
2.S2	<i>In silico</i> analysis of alanine substitution within the 12-17 domain	77
2.S3	TEM image of F15A IAPP after 168h incubation.....	78
2.S4	Effect of substitutions at position Asn14 on amyloid formation.....	79
2.S5	Effect of substitutions at position Phe15 on amyloid formation	80
2.S6	TEM image of F15P IAPP after 168h incubation	81
2.S7	TEM image of F15G IAPP after 168h incubation.....	82
2.S8	TEM image of F15Aib IAPP after 168h incubation.....	83
3.1	Évaluation de la stabilité du repliement hélicoïdal chez les analogues Pro par une surface inductrice.....	90
3.2	Évaluation de la stabilité du repliement hélicoïdal chez les analogues Gly par une surface inductrice.....	92
3.3	Évaluation de la stabilité du repliement hélicoïdal chez les analogues Aib par une surface inductrice.....	93
3.2	Évaluation de la stabilité du repliement hélicoïdal chez les analogues de l'Ala scan.....	96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Séquences primaires de l'IAPP répertoriées chez plusieurs espèces.....	3
1.2 Modifications de l'IAPP influençant son caractère amyloïdogénique	29
2.S1 Mass spectrometry analysis of peptides	75

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

A β	Peptide amyloïde- β
Aib	Acide aminoisobutyrique
AM	Adrénomédulline
AM2	Adrénomédulline 2
AMY	Amyline
ANS	Acide 8-Anilino-1-naphthalenesulfonique
AP	<i>Area postrema</i>
CD	Dichroïsme circulaire
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CHO	Cellules d'ovaires d'hamsters chinois
CHO-P	Classe stable de cellules CHO transfectées avec la sélectine-P
COS-7	Cellules rénales de singes africains
CPE	Carboxypeptidase E
Cryo-EM	Cryomicroscopie électronique
CTR	Récepteur de la calcitonine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAG	Glycosaminoglycane
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G

HFIP	Hexafluoroisopropanol
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IAPP	<i>Islet amyloid polypeptide</i>
hIAPP	Isoforme de l'IAPP chez l'homme
rIAPP	Isoforme de l'IAPP chez le rat
PAM	<i>Peptidylglycine α-amidating monooxygenase</i>
PC1/3	Prohormone convertase 1/3
PC2	Prohormone convertase 2
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RAMP	<i>Receptor-activity modifying protein</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RE	Réticulum endoplasmique
TEM	Microscopie électronique à transmission
TFA	Acide trifluoroacétique
TFE	2,2,2-Trifluoroéthanol
ThT	Thioflavine T

RÉSUMÉ

Il existe de nombreuses maladies associées au repliement erroné de protéines, et de leur agrégation et accumulation tissulaire subséquentes. Alors que ces amyloïdoses affectent une portion importante de la population, le manque de compréhension du mécanisme d'auto-assemblage et de la structure des espèces quaternaires associées à la dégénérescence tissulaire empêche le développement d'approches thérapeutiques efficaces et ciblées. L'*islet amyloid polypeptide* (IAPP) est une hormone peptidique de 37 résidus co-sécrétée avec l'insuline par les cellules β -pancréatiques. L'IAPP exerce plusieurs fonctions physiologiques, dont la régulation du glucose sanguin et l'inhibition de la sécrétion de glucagon. Nonobstant ses activités biologiques, l'IAPP est fortement enclin à l'agrégation et sa déposition tissulaire subséquente est associée à la pathogenèse du diabète de type II. De même, ce caractère amyloïdogénique limite grandement l'utilisation de l'IAPP dans la thérapie du diabète. À cet effet, plusieurs études ont cherché à définir les domaines contribuant à l'auto-assemblage amyloïde de l'IAPP, et la majorité de celles-ci ont ciblé le segment Ser20-Ser29. Toutefois, peu d'études ont révélé la contribution du domaine Leu12-Val17, et ce malgré son hydrophobicité élevée. De plus, plusieurs hypothèses ont été proposées quant aux intermédiaires transitoires responsables de l'oligomérisation, dont le modèle des intermédiaires hélicoïdaux, stipulant que la conformation en hélice- α favoriserait l'auto-reconnaissance, via le domaine Leu12-Val17. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était d'élucider l'implication du domaine Leu12-Val17 et des intermédiaires hélicoïdaux dans l'auto-assemblage de l'IAPP. En appliquant diverses substitutions ciblées, il a été observé que les chaînes latérales hydrophobes des positions 12, 15 et 17 sont critiques dans l'auto-assemblage. La substitution successive par une proline en positions 13 à 15 a accéléré l'agrégation de l'IAPP, suggérant que les intermédiaires hélicoïdaux ne constituent pas une espèce quaternaire sur la voie amyloïdogénique. Les résultats émanant de cette étude pourraient permettre une meilleure compréhension des domaines déclenchant le processus de fibrillation, supportant le développement d'inhibiteurs spécifiques de l'amyloïdogénèse de l'IAPP.

Mots clés: Islet amyloid polypeptide, Fibres amyloïdes, Auto-assemblage, Cytotoxicité, Conformations secondaires et quaternaires

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Islet amyloid polypeptide (IAPP)

1.1.1 Découverte de l'IAPP

En 1901, Opie a observé une dégénérescence d'apparence cristalline au niveau des îlots de Langerhans chez des patients atteints du diabète de type II (Opie, 1901). Ces dépôts furent d'abord caractérisés comme étant un mélange d'insuline, de fragments d'insuline ou de proinsuline (Pearse *et al.*, 1972; Westermark et Wilander, 1983). Néanmoins, 86 ans après l'observation initiale de Opie, deux groupes de recherche ont indépendamment défini ces dépôts comme étant majoritairement composés d'une hormone neuropancréatique, à laquelle ils donnèrent le nom amyline (Cooper *et al.*, 1988) ou *islet amyloid polypeptide* (IAPP) (Westermark *et al.*, 1987). Aujourd'hui, le nom IAPP est plus couramment utilisé qu'amyline. L'IAPP se compose de 37 résidus (Cooper *et al.*, 1987), et est co-exprimé et co-sécrété avec l'insuline par les cellules β pancréatiques (Moore et Cooper, 1991). Bien qu'associé à une maladie de type amyloïdose, l'IAPP exerce plusieurs fonctions physiologiques.

1.1.2 Phylogénie de l'IAPP

À ce jour, l'IAPP a été caractérisé à maintes reprises chez différentes espèces, et la séquence primaire a été déterminée chez plusieurs de celles-ci (tableau 1.1). Il est possible d'observer une certaine conservation de la séquence primaire aux extrémités

N- et C-terminales, alors que la région 20-29 présente quant à elle une faible similarité de séquence entre les espèces (Akter *et al.*, 2016). La forte conservation des deux extrémités semble indiquer que ces régions jouent un rôle important dans les fonctions physiologiques de l'IAPP (Nishi *et al.*, 1989a). Du côté de la région 20-29, il s'agit du cœur amyloïdogénique, une région encline à l'agrégation amyloïde (Glennner *et al.*, 1988; Porat *et al.*, 2004; Tenidis *et al.*, 2000; Westermark *et al.*, 1990). Contrairement aux humains, les rongeurs ne peuvent pas développer le diabète de type II et leur isoforme ne s'agrège pas en fibres amyloïdes (Betsholtz *et al.*, 1989). L'IAPP chez le rat (rIAPP) diffère de 6 résidus par rapport à l'isoforme humaine (hIAPP), dont 5 résidus se retrouvent dans la région 20-29 de la séquence et 3 de ses substitutions correspondent à une substitution par un résidu Pro (aux positions Ala25, Ser28 et Ser29) (tableau 1.1). Cet acide aminé est un puissant perturbateur de feuillets- β (MacArthur et Thornton, 1991; Moriarty et Raleigh, 1999; Smith *et al.*, 1994), structure secondaire adoptée par l'IAPP une fois le processus d'auto-assemblage. Ce résidu est d'ailleurs reconnu pour inhiber l'auto-assemblage amyloïde (Abedini *et al.*, 2016; Kraus, 2016; Westermark *et al.*, 1990). Le faible caractère amyloïdogénique de rIAPP pourrait être attribué au grand nombre de modifications des résidus dans la région 20-29 ainsi qu'à la présence des 3 prolines (Westermark *et al.*, 1990).

Tableau 1.1 Séquences primaires de l'IAPP répertoriées chez plusieurs espèces (Akter *et al.*, 2016).

Espèce	Séquence primaire			
Humain	¹ KCNTATCAT	QRLANFLVHS	SNNFGAILSS	TNVGSNTY ³⁷
Chat	¹ KCNTATCAT	QRLANFL IRS	SNN L GAIL S P	TNVGSNTY ³⁷
Chien	¹ KCNTATCAT	QRLANFLV RT	SNN L GAIL S P	TNVGSNTY ³⁷
Hamster	¹ KCNTATCAT	QRLANFLVHS	NNL G P V L S P	TNVGSNTY ³⁷
Ours	¹ KCNTATCAT	QRLANFLV RS	GNN L G A I L S P	TNVGSNTY ³⁷
Rat	¹ KCNTATCAT	QRLANFLV RS	SNN L G P V L P P	TNVGSNTY ³⁷
Singe	¹ KCNTATCAT	QRLANFLV RS	SNNFG T ILSS	TNVGS D TY ³⁷
Vache	¹ K G TATC E T	QRLANFL A P S	S N K L G A I F S P	T K M G S NTY ³⁷
Poisson globe	¹ KCNTATC V T	QRL A D F L V R S	S N T I G T V Y A P	TNVGS T TY ³⁷
Furet	¹ KCNTATC V T	QRLANFLV RS	SNN L G A I L L P	T D V GSNTY ³⁷

Les résidus en rouges correspondent à ceux qui diffèrent de la séquence chez l'homme

1.1.3 Peptides de la famille de la calcitonine

L'IAPP fait partie de la famille des peptides de la calcitonine. Cette famille comprend 6 peptides: l'IAPP, la calcitonine, l'adrénomedulline 1 et 2 ainsi que les deux formes des peptides reliés au gène calcitonine (α CGRP et β CGRP) (Barwell *et al.*, 2012; Roh *et al.*, 2004). Ces peptides affichent une taille allant de 32 à 52 résidus et sont associés à de maintes fonctions physiologiques. Ainsi, leurs récepteurs correspondent à des cibles thérapeutiques pour plusieurs maladies telles l'ostéoporose, le diabète, l'insuffisance lymphatique ou encore les maladies cardiovasculaires (Barwell *et al.*, 2012). Les deux types de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) de cette famille de peptides sont le *calcitonin receptor* (CTR) et le *calcitonin receptor-like receptor* (CLR) tel qu'illustré à la figure 1.4. Enfin, les peptides de cette famille présentent des caractéristiques semblables tel le pont disulfure, une région pouvant adopter une conformation en hélice- α et une extrémité C-terminale amidée. Malgré leurs similarités, ces peptides n'ont qu'une faible homologie de séquence (figure 1.1).

```

hCT      -C■NLST■C■MLGTYTQ-----DFN■K■FHTF■P■QTAIG■VGAP
hAMY     KC-NTATCATQRLANF■LVHSS-NNFGAILSS-TN■VG■SNTY
hαCGRP   AC-DTATC■VTHRLA■GL■LSRSG-GVVK■NNFV■P■-TN■VG■SKAF
hβCGRP   AC-NTATC■VTHRLA■GL■LSRSG-GMVK■SNFV■P■-TN■VG■DKAF
hAM      GC-RFGTC■TVQKLA■HQIYQFT-DKD■K■DNVAP■RSKIS■PQGY
hAM2     GC-VLGT■C■QVQNL■SHRL■WQLMGPAGRQDSAP■VDPSSPHSY

```

Figure 1.1. Alignement de séquence des peptides de la famille CT (adaptée de Hay *et al.*, 2018). Alignement de séquence des peptides de la famille CT chez l'homme, en omettant les portions N-terminales de l'AM et AM2. Les résidus identiques entre les peptides sont surlignés en vert. Les résidus en gris affichent une similarité allant de 70 à 100%. AM: Adrénomédulline; AMY: Amyline/IAPP; CT: Calcitonine; CGRP: calcitonin gene-related peptide.

1.1.4 Expression et maturation *in vivo* de l'IAPP

Tel que mentionné précédemment, l'IAPP est un peptide de 37 acides aminés (Cooper *et al.*, 1987) contenant un pont disulfure et une extrémité C-terminale amidée (Westermarck *et al.*, 2011). On retrouve une seule copie du gène de l'IAPP sur le bras court du chromosome 12 (Westermarck *et al.*, 2011; Wimalawansa, 1997). Le gène du PreproIAPP contient notamment 3 exons, dont les deux derniers encodent la préprohormone complète (Ahrén *et al.*, 1998; Mosselman *et al.*, 1989; Nishi *et al.*, 1989b; Westermarck *et al.*, 2011). De plus, les gènes de l'IAPP et de l'insuline contiennent des éléments promoteurs similaires (German *et al.*, 1992), et sont ainsi régulés par le facteur de transcription PDX1 suite à une stimulation au glucose (German *et al.*, 1995; Ohlsson *et al.*, 1993; Watada *et al.*, 1996). Cette régulation d'expression des deux hormones par les cellules β pancréatiques est considérée comme étant parallèle (Kahn *et al.*, 1991; Mulder *et al.*, 1996).

L'IAPP est exprimé initialement en une prepro-molécule de 89 résidus (figure 1.2) (Akter *et al.*, 2016; Westermarck *et al.*, 2011). Le peptide signal de 22 acides aminés est clivé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) afin d'obtenir ProIAPP d'une longueur de 67 acides aminés. ProIAPP est ensuite clivé par deux endoprotéases, la

prohormone convertase 2 (PC2) et la prohormone convertase 1/3 (PC1/3), ainsi que par la carboxypeptidase E (CPE) au niveau de l'appareil de Golgi et des vésicules sécrétoires (Akter *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2013; Westermark *et al.*, 2011). Ce clivage est pH dépendant est également subi par la prohormone insuline (Westermark *et al.*, 2011). La PC2 effectue le clivage du segment N-terminal de ProIAPP entre le segment Lys-Arg aux positions 10 et 11, alors que la portion C-terminale du peptide est clivée après le motif dibasique Lys50-Arg51 par la PC(1/3) (Marzban *et al.*, 2004). En absence de PC(1/3), il est aussi possible que PC2 puisse effectuer le clivage de proIAPP à l'extrémité C-terminale (Wang *et al.*, 2001). La CPE est en mesure de cliver l'Arg et la Lys restantes après le passage de la PC(1/3), laissant alors un résidu Gly à l'extrémité C-terminale, qui sera utilisé comme donneur d'azote afin d'amider le résidu Tyr, une réaction effectuée par le complexe *peptidylglycine α -amidating monooxygenase* (PAM) (Cao *et al.*, 2013; Marzban *et al.*, 2005; Marzban *et al.*, 2004). La formation du pont disulfure à l'extrémité N-terminale de l'IAPP se produit quant à elle dans la lumière du RE (Asthana *et al.*, 2018). L'IAPP mature est entreposé avec l'insuline à l'intérieur des granules de sécrétion, jusqu'à ce qu'un stimulus engendre leur co-sécrétion par les cellules β pancréatiques (Akter *et al.*, 2016; Kahn *et al.*, 1990; Lukinius *et al.*, 1989; Stridsberg *et al.*, 1993). L'IAPP se retrouve à une concentration molaire d'environ 1% par rapport à celle de l'insuline dans les granules de sécrétion (Hull *et al.*, 2004), concentrations respectives de 1 mM pour l'IAPP et 100 mM pour l'insuline (Kanatsuka *et al.*, 1989).

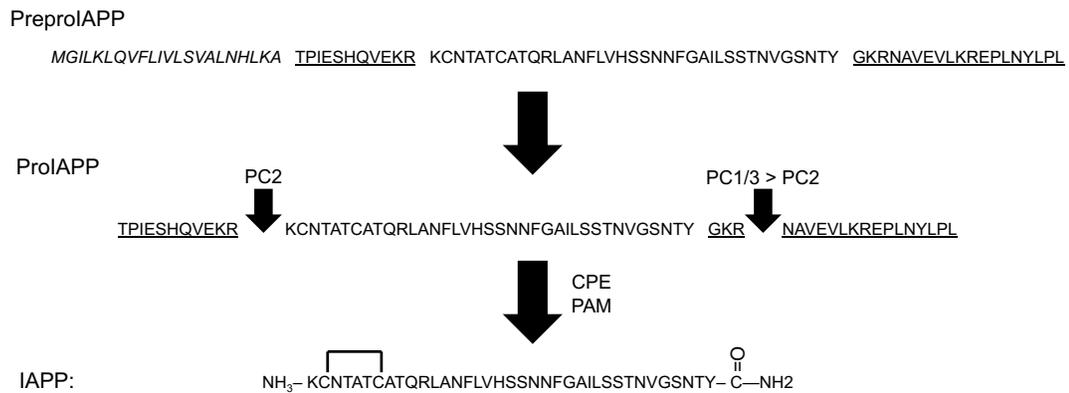


Figure 1.2. Différentes étapes de la maturation de l'IAPP (Akter *et al.*, 2016).

La séquence primaire de la préprohormone est composée de 89 résidus (PreproIAPP). Le peptide signal de 22 acides aminés est représenté en italique, les régions N- et C-terminales de proIAPP sont soulignées. La séquence primaire de proIAPP est d'une longueur de 67 résidus. ProIAPP est clivé par les prohormones convertases PC(1/3) et PC2 aux deux sites dibasiques conservés représentés par les flèches (↓). L'extrémité C-terminale amidée est produite à la suite de la transformation effectuée par les enzymes CPE et PAM. Enfin, la séquence primaire est composée de 37 acides aminés chez l'IAPP mature. Le peptide biologiquement actif possède une extrémité C-terminal amidée ainsi qu'un pont disulfure entre Cys2 et Cys7. PC(1/3): Prohormone convertase 1/3; PC2: Prohormone convertase 2; CPE : Carboxypeptidase E; PAM: *Peptidyl amidating monooxygenase*.

1.1.5 Ensemble conformationnel secondaire

L'IAPP affiche une structure native principalement désordonnée, tout comme la calcitonine, α -synucléine ou encore le peptide amyloïde- β (A β) (Chiti et Dobson, 2017). Cependant, le segment 5-20 de la séquence primaire peut adopter une conformation hélicoïdale de manière transitoire (Williamson *et al.*, 2009). En présence d'un milieu imitant les membranes plasmiques, la conformation hélicoïdale de IAPP se trouve alors stabilisée entre les segments 5-17 et 20-27 (figure 1.3) (Cao *et al.*, 2013; Nanga *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2009). Les résidus 1-19 permettraient aussi à l'IAPP de se lier aux membranes biologiques, interactions pouvant contribuer à l'auto-assemblage en fibres amyloïdes (Abedini et Raleigh, 2009a; Nanga *et al.*, 2011; Williamson *et al.*, 2009). De plus, la conformation hélicoïdale adoptée par l'IAPP

semble correspondre à la forme bioactive de l'hormone peptidique (Wu et Shea, 2013). Toutefois, l'IAPP est aussi en mesure d'adopter une autre structure secondaire, riche en feuillet β qui correspond à sa forme amyloïde et agrégée.

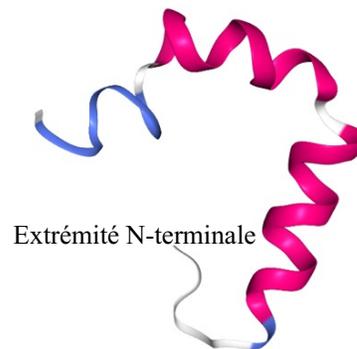


Figure 1.3. Structure secondaire de l'IAPP en présence de micelles SDS à pH 7.3 (PDB 2L86) déterminée par la résonance magnétique nucléaire solide (RMN) en solution (Nanga *et al.*, 2011).

1.1.6 Récepteurs de IAPP

L'IAPP est en mesure de lier faiblement les récepteurs à la calcitonine (CTR). Cependant, son affinité pour ces derniers se retrouve augmentée lorsque le CTR se retrouve associé à l'une des trois protéines RAMPs (*receptor activity-modifying proteins*), modifiant alors la sélectivité du complexe hétérodimérique pour l'IAPP. Ainsi, IAPP pourrait interagir avec un total de 4 récepteurs, tel que le montre la figure 1.4 (Cao *et al.*, 2013); toutefois son affinité envers les récepteurs AMY1 et AMY3 est la plus grande (Alexander *et al.*, 2017; Hay *et al.*, 2018).

Au niveau de l'activation de ses récepteurs, l'extrémité C-terminale de l'IAPP semble initier la liaison, afin d'optimiser le positionnement du segment N-terminal. L'interaction impliquant l'extrémité N-terminale semble moduler un changement

conformationnel du récepteur et donc, l'activation de celui-ci. La protéine G associée au complexe se retrouve ainsi activée et permet l'augmentation de la production d'AMPC par son association avec l'adénylate cyclase, tel que schématisé à la figure 1.5 (Bower et Hay, 2016).

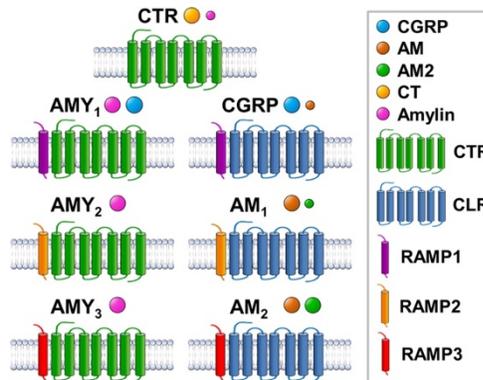


Figure 1.4. Récepteurs de l'*Islet amyloid polypeptide*.

Composition et classification actuelle des récepteurs de la famille de la calcitonine chez l'homme. Les différents ligands sont illustrés par des sphères de grosseur différente représentant leur affinité relative pour chaque récepteur (Hay et al., 2018).

Il est aussi important de noter que la région N-terminale (résidus 1-19) de l'IAPP est nécessaire pour la liaison à haute affinité à ces récepteurs (Barwell *et al.*, 2012). En effet, les peptides faisant partie de la famille de la calcitonine, une fois liés à leur récepteur, adoptent une conformation en hélice- α et effectuent maintes interactions hydrophobes et électrostatiques afin de stabiliser la conformation active du récepteur (Barwell *et al.*, 2012). De surcroît, il est important de noter que l'affinité d'IAPP pour les différentes combinaisons de CTR et RAMP n'est pas toujours la même, et peut même varier selon le type cellulaire. Par exemple, les complexes CTR-RAMP1 et CTR-RAMP3 affichent une forte affinité avec IAPP dans les cellules COS-7, alors que

dans les cellules CHO-P, une forte affinité de toutes les combinaisons CTR-RAMP (1,2 et 3) est observable pour l'IAPP (Tilakaratne *et al.*, 2000).

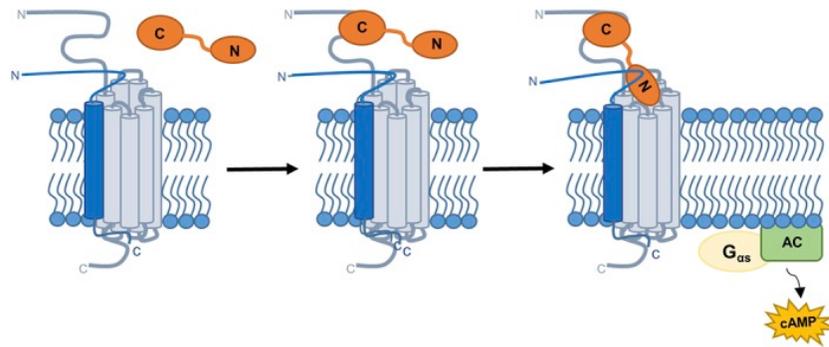


Figure 1.5. Activation des récepteurs de l'*Islet amyloid polypeptide* (Bower et Hay, 2016).

Schématisation du modèle à 2 domaines en ce qui concerne la liaison de l'IAPP et l'activation du récepteur. À partir de la gauche, le peptide rencontre un GPCR à 7 domaines transmembranaires associé à une protéine RAMP au niveau de la membrane plasmique. L'extrémité C-terminale du peptide se lie à l'extrémité N-terminale du récepteur. Cette liaison induit alors l'alignement de l'extrémité N-terminale du peptide avec la région juxta membranaire du récepteur, facilitant ainsi l'activation de la protéine G associée au complexe GPCR-RAMP. La protéine G stimule l'adénylyl cyclase (AC), dont la résultant est une augmentation de la production d'AMPc.

1.1.7 Activités biologiques

À ce jour, les fonctions physiologiques de l'IAPP ne sont que partiellement caractérisées. Ceci est en partie dû au fait qu'il est difficile de différencier expérimentalement le rôle physiologique du rôle pathophysiologique (Westermarck *et al.*, 2011). En outre, il est excessivement difficile d'évaluer expérimentalement l'effet pharmacologique exact de l'IAPP, puisque le CTR existe sous différentes formes de variants d'épissage, et ce selon l'espèce. L'épissage alternatif permet d'avoir ou non une séquence supplémentaire de 16 acides aminés au sein de la première boucle intracellulaire, venant ainsi moduler son couplage avec les protéines G (G_s , G_q). De plus, le CTR s'exprime seul à la surface cellulaire; son expression transitoire dans

certaines systèmes peut mener à l'obtention de populations hétérogènes des complexes CTR/RAMP (Hay *et al.*, 2018). Ainsi, en termes d'activité biologique, l'IAPP exerce deux catégories d'effets physiologiques.

D'une part, l'IAPP exercerait une fonction au sein des cellules des îlots de Langerhans en tant que molécule paracrine. L'effet exact de l'IAPP en tant que molécule paracrine demeure malgré tout le sujet de discussion. De même, *in vivo* chez l'homme, il semblerait que seule une forte concentration de l'IAPP, bien au-delà de celle retrouvée dans des conditions physiologiques, puisse avoir un réel impact sur la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose. Dans cette étude, après injection de forte concentration d'IAPP exogène, les sujets voyaient leur sécrétion d'insuline grandement diminuée (Bretherton-Watt *et al.*, 1992). Du côté des études réalisées *in vitro*, les résultats obtenus sont plutôt contradictoires concernant la régulation de la sécrétion de l'insuline induite par l'IAPP (Westermarck *et al.*, 2011). Certaines études exposent que l'IAPP inhibe la sécrétion d'insuline même à très faibles concentrations (Dégano *et al.*, 1993) (Kogire *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 2011), alors que d'autres études proposent que l'hormone peptidique n'exerce aucun impact significatif (Broderick *et al.*, 1991; O'Brien *et al.*, 1991). En outre, Akesson et son équipe ont proposé une dualité d'action induite par l'IAPP sur la régulation d'insuline, et ce selon les conditions. Sous conditions basales, l'IAPP stimule la sécrétion d'insuline, alors qu'à de fortes concentrations, l'IAPP inhibe sa sécrétion (Åkesson *et al.*, 2003).

D'autre part, l'action physiologique médiée par l'IAPP en tant qu'hormone impliquerait le système nerveux central. En effet, plusieurs sites de liaisons de l'IAPP sont retrouvés dans le cerveau, incluant le noyau accumbens et l'*area postrema* (AP) (Christopoulos *et al.*, 1995), suggérant que cette hormone peut passer la barrière hématoencéphalique suite à sa production dans les îlots de Langerhans. De ce fait, l'IAPP correspond à l'inhibiteur universel du glucagon (Åkesson *et al.*, 2003). Après

sa sécrétion par les cellules β pancréatiques, l'IAPP circulerait dans le sang jusqu'à l'*area postrema* pour se lier à ses récepteurs spécifiques (CTR-RAMP₁ / RAMP₃). L'activation du récepteur enclencherait une cascade de signalisation causant la production de GMPc et la sécrétion de noradrénaline par les neurones AP. Les neurones AP stimuleraient ensuite d'autres régions du cerveau, enclenchant ultimement les actions physiologiques exercées par l'IAPP (Hay *et al.*, 2015; Lutz, 2010). Cette inhibition de sécrétion de glucagon a été observée à la fois chez les humains et les rats. Selon l'étude menée par Silvestre *et al.*, lorsque des rats anesthésiés, auxquels on a mis un clamp euglycémique, sont exposés à une injection intraveineuse de L-arginine couplée à celle de l'IAPP, ceux-ci ont vu leur sécrétion de glucagon considérablement réduite. Toutefois, l'effet glucagonostatique de l'IAPP serait extérieur au pancréas, puisque des résultats similaires n'ont pas été obtenus chez des îlots pancréatiques isolés (Silvestre *et al.*, 2001). Enfin, une autre étude menée sur des patients souffrant de diabète de type I a été réalisée dans le but de comprendre l'effet glucagonostatique du peptide. Via l'utilisation d'un analogue synthétique de l'IAPP, le pramlintide, les auteurs ont observé une réduction de la sécrétion de glucagon à la suite des repas ainsi que diminution du taux sanguin de glucose. Un effet semblable à long terme a été observé à la suite d'un traitement par le pramlintide d'une durée de 14 jours avec une fréquence d'injection de 3 fois par jour (Fineman *et al.*, 2002).

En tant que neurohormone, l'IAPP exercerait aussi un effet sur la satiété et sur la vidange gastrique (Westermarck *et al.*, 2011). L'effet stimulateur de l'IAPP sur la satiété gastrique semble d'ailleurs provenir de son action directe sur les neurones AP (Lutz, 2010). Du côté de la vidange gastrique, l'IAPP l'inhibe (Reidelberger *et al.*, 2001) via sa liaison au niveau du cerveau (Arnelo *et al.*, 1996) et non par une action sur les fibres nerveuses du nerf vague afférent tel que le ferait la cholécystokinine (CCK) (Wickbom *et al.*, 2008). Enfin, l'IAPP agit sur le métabolisme osseux via une diminution de l'activité de résorption (Muff *et al.*, 1995), en inhibant l'activité des ostéoclastes (Zaidi

et al., 1990). L'IAPP a également un effet vasodilatateur, quoique moins efficace que celui exercé par le CGRP (Muff *et al.*, 1995). En somme, les fonctions physiologiques de l'IAPP demeurent encore aujourd'hui que partiellement caractérisées.

1.2 Dépôts amyloïdes pancréatiques et diabète de type II

1.2.1 Physiopathologie du diabète

Le diabète est considéré comme étant un trouble métabolique caractérisé par une concentration sanguine élevée et anormale du glucose (Kalofoutis *et al.*, 2007). Il existe notamment 2 types de diabète. Le diabète de type I est la résultante d'une destruction auto-immune des cellules β pancréatiques, cellules responsables de la sécrétion de l'insuline (Atkinson *et al.*, 2014). Ce premier type est aussi défini comme étant insulino-dépendant; les patients souffrant de cette forme dépendent entièrement d'une source exogène d'insuline pour survivre (Kalofoutis *et al.*, 2007). Le diabète de type II quant à lui n'est pas insulino-dépendant, et se caractérise par une hyperglycémie, une résistance à l'insuline et une déficience dans la production d'insuline bioactive par les cellules β (Kalofoutis *et al.*, 2007; Olokoba *et al.*, 2012). Celui-ci résulte d'un mélange entre des facteurs génétiques, environnementaux et des habitudes de vie (Olokoba *et al.*, 2012).

Du côté de la physiopathologie du diabète de type II, cette dernière est le produit d'une combinaison de 2 facteurs: un dysfonctionnement de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques et une résistance à l'insuline (Galicía-García *et al.*, 2020; Olokoba *et al.*, 2012). De plus, la défaillance des boucles de rétroaction entre la sécrétion de l'insuline et ses fonctions exécutées cause une hausse anormalement élevée de la concentration sanguine de glucose. La résistance à l'insuline enclenche une réduction de l'absorption du glucose par les muscles, le foie et les tissus adipeux ainsi qu'une augmentation de la production de glucose par le foie (Galicía-García *et*

al., 2020). Cette diminution de la gestion du glucose amène les adipocytes à libérer leurs acides gras libres. Ces acides gras libres peuvent ensuite inhiber l'action médiée par l'insuline au niveau du foie, favorisant une augmentation de la gluconéogenèse et induisant une amplification de l'hyperglycémie sanguine (Kalofoutis *et al.*, 2007). Cet excès de glucose et d'acides gras peut induire un dysfonctionnement des cellules β pancréatiques par l'activation de plusieurs voies de signalisation, dont notamment un stress du RE, un stress oxydatif, une dérégulation du flux de Ca^2 et une activation de l'apoptose, causant d'importants dommages cellulaires (Galicia-Garcia *et al.*, 2020). La forte concentration sanguine de glucose est aussi responsable d'une augmentation de la synthèse de l'insuline et de l'IAPP, pouvant conduire à l'agrégation amyloïde de l'IAPP (Galicia-Garcia *et al.*, 2020). Ces différents mécanismes responsables du dysfonctionnement des cellules β engendrent une rupture de l'intégrité des îlots pancréatiques ainsi qu'une perturbation de la communication entre les cellules au sein de l'îlot. Ces événements contribuent ainsi à une mauvaise régulation de l'insuline et du glucagon, en plus d'ultimement de causer une amplification de l'hyperglycémie (Galicia-Garcia *et al.*, 2020). En résumé, les patients souffrant de cette pathologie sont sujets à des complications à long et court terme, qui peuvent mener à une mort prématurée (Olokoba *et al.*, 2012).

1.2.2 Dépôts amyloïdes de l'IAPP dans les îlots de Langerhans

Les dépôts amyloïdes ont été initialement découverts au niveau des îlots de Langerhans chez des patients souffrant de diabète de type II (Opie, 1901), alors que sa principale composante, l'IAPP, n'a été qu'identifiée qu'après plusieurs décennies (Cooper *et al.*, 1988; Cooper *et al.*, 1987; Westermark *et al.*, 1987). On soupçonne l'IAPP d'être associé au diabète de type II étant donné que des agrégats ont été retrouvés dans l'espace extracellulaire des cellules β pancréatiques chez plus de 90% des patients souffrant de cette maladie (Westermark *et al.*, 2011). Bien que l'agrégation amyloïde de l'IAPP soit associée au diabète de type II (Bell, 1952), il semblerait qu'elle se

produise aussi chez des patients sains, mais à plus faible degré (Bell, 1959; Westermark, 1972). Étant donné que des dépôts de IAPP ont été retrouvés des individus sains, que ces dépôts soient beaucoup moins prononcés que dans les pancréas atteints de la maladie, et que des cellules β saines et bien granulées aient été retrouvées dans des ilots contenant une forte quantité de dépôts, il semblait alors qu'il n'y a aucun lien entre l'agrégation de l'IAPP et le diabète de type II. Nonobstant, plusieurs études ont démontré que la déposition de l'IAPP est associée à une réduction du volume des ilots de Langerhans ainsi qu'à une réduction de la masse de cellules β saines (Clark *et al.*, 1988; Westermark, 1973; Westermark et Grimelius, 1973; Westermark et Wilander, 1978). Cette réduction du volume semblait être néanmoins une explication suffisante pour l'inaptitude de la réponse à l'insuline observée dans le cadre de la maladie (Westermark *et al.*, 2011). Il a été démontré que les cellules β à proximité des dépôts amyloïdes étaient infiltrées par un grand nombre de fibres amyloïdes (Westermark, 1973). Il est raisonnable de soupçonner que la fonction exercée par de telles cellules se retrouverait ainsi compromise. De plus, certaines études ont indiqué que l'interaction entre les fibres d'IAPP et la membrane plasmique mène à une dérégulation du flux de Ca^{2+} , ce qui pourrait fortement compromettre les fonctions exercées par les cellules β pancréatiques (Kawahara *et al.*, 2000). En somme, ces études suggèrent fortement qu'un lien entre le diabète de type II et la présence de l'IAPP sous forme insoluble et agrégée dans les ilots de Langerhans existe.

1.3 Fibres amyloïdes

1.3.1 Aspects structuraux des fibres amyloïdes

En ce qui concerne la structure commune des fibres amyloïdes, qu'elles soient générées en laboratoire ou extraites de patients souffrant d'amyloïdoses (diabète de type II, Alzheimer, Parkinson), ces dernières, une fois observées en microscopie électronique ou à force atomique, possèdent habituellement un diamètre de 7 à 13 nm (Chiti et

Dobson, 2017). Ces fibres sont aussi généralement composées de 2 à 8 protofilaments, ayant un diamètre approximatif de 2 à 7 nm, qui sont entrelacés ou associés tels des rubans (Chiti et Dobson, 2017). Malgré cela, il a été possible d'observer des fibres monoprotofilamenteuses (Paravastu *et al.*, 2008; Wasmer *et al.*, 2008). Ces fibres voient leurs brins- β orientés perpendiculairement le long de l'axe de la fibre grandissante et sont assemblées en une structure quaternaire appelée feuillets- β croisés (Chiti et Dobson, 2017). Cette caractéristique structurale a d'ailleurs été initialement détectée via diffraction des rayons X pour être par la suite confirmée par la transformée de Fourier (spectroscopie infrarouge), la RMN à l'état solide et la diffraction aux rayons X (Chiti et Dobson, 2017).

1.3.2 Les fibres amyloïdes de l'IAPP

Du côté de l'IAPP, ce peptide possède plusieurs caractéristiques générales structurales des fibres amyloïdes. Les fibres de l'IAPP sont habituellement composées de 2 à 8 protofilaments dans lesquels des feuillets- β croisés orientés perpendiculairement le long de l'axe sont retrouvés (figure 1.6A, B). Une distance de 10 Å sépare deux brins- β antiparallèles, alors que les feuillets- β se retrouvent à une distance de 4.7 Å (Quittot *et al.*, 2017). Plusieurs études ont caractérisé plus amplement la structure atomique de l'IAPP au sein des fibres amyloïdes matures. Dans le premier modèle, l'IAPP adopte une conformation en U, qu'on représente comme 2 brins- β antiparallèles connectés par une boucle (figure 1.6C). Selon ce modèle obtenu à l'aide de la RMN, les résidus 18-27 de la séquence primaire sont compris dans la région dite boucle, alors que les deux brins- β impliquent respectivement les résidus 8-17 et 28-37. L'extrémité N-terminale (1-7) reste sous une conformation aléatoire (Luca *et al.*, 2007). Toutefois, en 2020, trois études réalisées en cryo-microscopie électronique (cryo-EM) ont découvert que la structure atomistique serait composée de 3 brins- β au lieu de 2 (figure 1.6D) (Cao *et al.*, 2020; Gallardo *et al.*, 2020; Röder *et al.*, 2020). Cette notion de polymorphisme de la structure moléculaire de l'IAPP a aussi été retrouvée *in vivo* chez des patients

souffrant de diabète de type II. En effet, Cao et son équipe ont obtenus quatre types différents de fibres à la suite de leur extraction des ilots pancréatiques. Ces quatre types fibrillaires pourraient d'après les auteurs provenir de différentes combinaisons des trois protofilaments enroulés (Cao *et al.*, 2021).

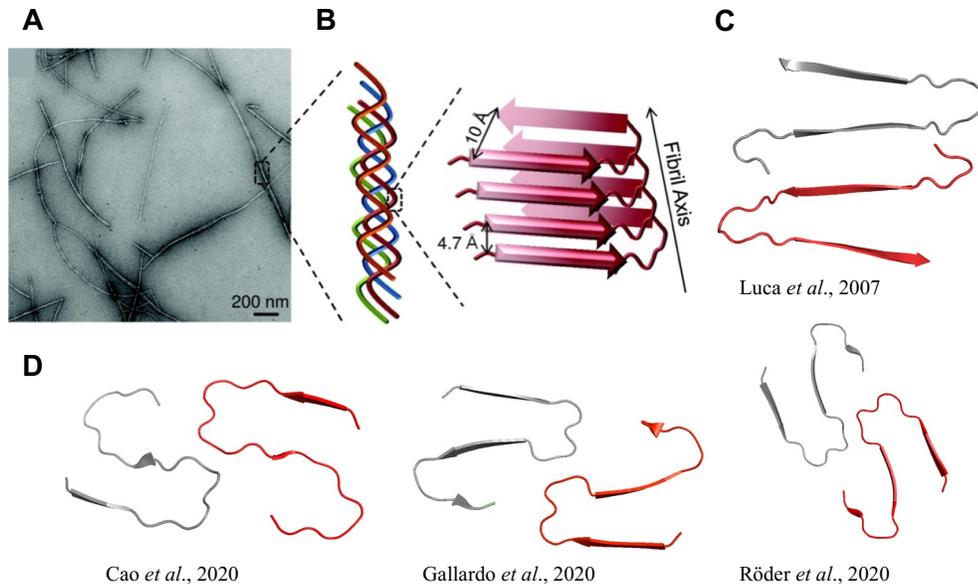


Figure 1.6. Organisation structurale de l'*Islet amyloid polypeptide*.

A) Image de microscopie électronique de fibres amyloïdes de l'IAPP obtenue par auto-assemblage (Quittot *et al.*, 2017). B) Schématisation de l'organisation hiérarchique d'une fibre amyloïde (Quittot *et al.*, 2017). C) Schématisation du modèle RMN solide d'un dimère d'IAPP au sein d'un protofilament (Luca *et al.*, 2007). D) Schématisation PYMOL des modèles de cryo-microscopie électronique (cryo-EM) d'un dimère d'IAPP au sein d'un protofilament (PDB 7M64; 6ZRF; 6Y1A) (Cao *et al.*, 2020; Gallardo *et al.*, 2020; Röder *et al.*, 2020).

1.3.3 Mécanisme d'auto-assemblage

L'auto-assemblage de peptides et protéines amyloïdogéniques est généralement décrit comme étant un processus de polymérisation nucléée (Bemporad et Chiti, 2012). Ce modèle se caractérise par la formation d'un noyau oligomérique thermodynamiquement défavorable, constituant alors l'étape limitante du processus (Abedini *et al.*, 2016). Une fois que ce noyau est formé, la suite du processus survient

rapidement via l'addition de monomères compétents, ou d'oligomères aux extrémités grandissantes des protofilaments (Abedini *et al.*, 2016). Il est possible de diviser ce processus en trois phases: (i) la nucléation, (ii) l'élongation et (iii) la saturation (figure 1.7) (Abedini *et al.*, 2016; Westermark *et al.*, 2011). Initialement, le peptide amyloïdogénique oscille entre sa forme intrinsèquement désordonnée, ou partiellement dénaturée, et une série de conformations intermédiaires, avant de former ultimement un noyau stable, amorçant ainsi la phase d'élongation (Buchanan *et al.*, 2013). Cette phase de nucléation survient à un rythme plutôt lent, étant donné les interactions peu favorables entre monomères (Quittot *et al.*, 2017), en plus de l'importante barrière énergétique à franchir pour l'atteinte du noyau stable (Buchanan *et al.*, 2013). Ensuite, l'ajout de monomères et/ou d'oligomères au noyau favorise l'élongation des protofilaments et des fibres amyloïdes. La phase de saturation est ainsi définie par l'apparition des fibres matures, qu'on peut détecter via plusieurs sondes, ou visualiser par microscopie à force atomique et par microscopie électronique (Iannuzzi *et al.*, 2015; Westermark *et al.*, 2011).

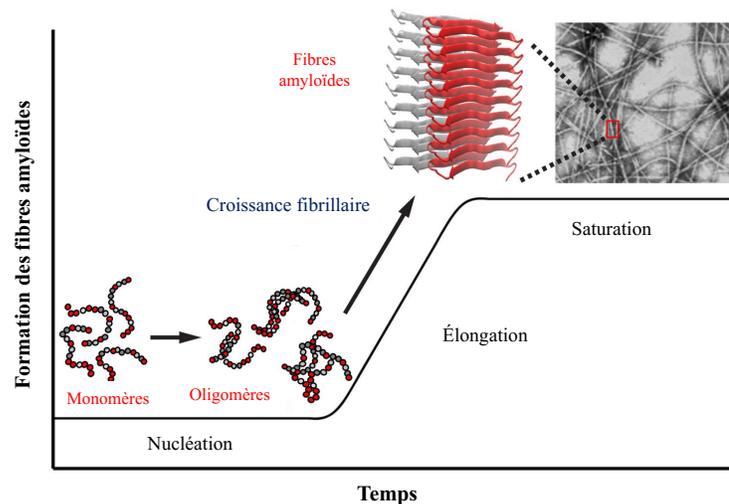


Figure 1.7. Représentation des trois phases du mécanisme d'auto-assemblage de l'IAPP (adaptée de Abedini *et al.*, 2016).

D'autres modèles mécanistiques ont été proposés, tels que la polymérisation descendante (Hurshman *et al.*, 2004), la conversion directe des monomères (Prusiner, 1982), ou encore la conversion conformationnelle nucléée (Lee *et al.*, 2011). Outre les phases de nucléation et d'élongation, il est fort probable que des processus secondaires survenant puissent avoir un important impact sur la cinétique du processus (Chiti et Dobson, 2017). L'un de ces événements correspond à la fragmentation, dans lequel un agrégat fibrillaire se fragmente en plusieurs morceaux. Il y a aussi les réactions de nucléation secondaires, où la surface des fibres catalyse la formation de nouveaux noyaux compétents (Chiti et Dobson, 2017). Ces deux exemples de processus secondaires sont en mesure d'augmenter le nombre d'agrégats compétents en croissance, et causent alors une accélération de la vitesse du processus d'auto-assemblage (Chiti et Dobson, 2017).

1.3.4 Modèles des intermédiaires transitoires de la phase de nucléation chez l'IAPP

Il existe plusieurs hypothèses quant aux intermédiaires présents lors du réarrangement moléculaire au courant de la phase de nucléation de l'auto-assemblage amyloïde de l'IAPP. Il est possible de les diviser en trois modèles, qui sont non exclusifs.

Le premier modèle correspond au modèle des intermédiaires hélicoïdaux. Celui-ci propose qu'il existe un équilibre entre la forme aléatoire et celle en hélice- α de l'IAPP. Ces intermédiaires hélicoïdaux transitoires faciliteraient l'alignement des extrémités C-terminales de 2 dimères d'IAPP en brins- β antiparallèles, et permettrait l'augmentation de la concentration locale, générant une réduction de la barrière énergétique nécessaire à la formation des brins- β (Wiltzius *et al.*, 2009). Ce positionnement des brins permettrait d'induire un empilage côte à côte des feuillettes- β , dont la résultante serait la continuité du processus d'auto-assemblage (figure 1.8A) (Wiltzius *et al.*, 2009). Cette association du peptide en dimères serait alors

thermodynamiquement dépendante de la formation de l'hélice- α à l'extrémité N-terminale, des résidus Ala5 à Asn22 (Abedini et Raleigh, 2009a; Hebda et Miranker, 2009). Williamson et ses collaborateurs ont proposé le mécanisme suivant: l'IAPP, initialement sous sa conformation native désordonnée, affiche en solution une structure en hélice transitoire, et cette structure en hélice est stabilisée en présence de membranes lipidiques. Cette structure hélicoïdale du peptide ne s'étend qu'à une partie de séquence primaire, soit des résidus 5 à 22. À la surface membranaire, l'IAPP pourrait se regrouper en oligomères hélicoïdaux parallèles facilitant une nucléation du domaine non hélicoïdal, une région fortement encline à l'agrégation amyloïde. Cette nucléation subséquente et l'élongation résultante mèneraient à la formation de fibres amyloïdes matures. Les auteurs suggèrent aussi que ce mécanisme survient en solution, mais à moins grande échelle (Williamson *et al.*, 2009). En d'autres mots, ce regroupement d'oligomères hélicoïdaux permettrait une augmentation locale de la région fortement amyloïdogénique menant à la formation intermoléculaire de feuillets- β (Abedini et Raleigh, 2009a). Cependant, il faut tout de même se rappeler que ces intermédiaires hélicoïdaux du réarrangement moléculaire n'accélèrent pas toujours le processus. Si ces derniers sont trop stables, ils pourraient le ralentir et cela constituerait ainsi une trappe cinétique (Abedini et Raleigh, 2009a). Une étude réalisée sur l'analogue D-hIAPP, ayant eu une incorporation de résidus D en position Phe15 et Leu16 qui déstabilise le repliement hélicoïdal du peptide, révèle notamment que les espèces intermédiaires hélicoïdales ne constitueraient pas une espèce de la voie d'auto-assemblage amyloïde, que ce soit dans un environnement aqueux ou en présence de

membranes lipidiques (De Carufel *et al.*, 2015). Devant cette divergence d'opinions, ce modèle demeure actuellement sujet de discussion.

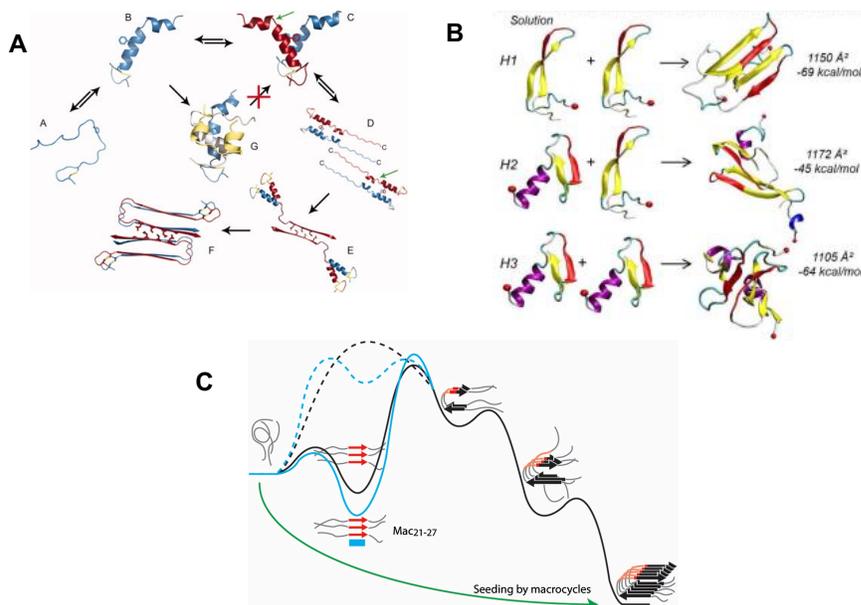


Figure 1.8. Modèles hypothétiques des intermédiaires de la phase de nucléation lors de l'auto-assemblage de l'*Islet amyloid polypeptide*. A) Modèle des intermédiaires hélicoïdaux (Wiltzius *et al.*, 2009). B) Modèle des intermédiaires en conformation épingle (Dupuis *et al.*, 2011). C) Modèle des intermédiaires en conformation brins- β (Buchanan *et al.*, 2013).

Le second modèle, le modèle en épingle à cheveux (β -*hairpin*), propose plutôt qu'il existe un équilibre entre les trois conformations de IAPP sous forme monomérique: forme aléatoire, forme hélice- α /*coil*, et la forme en épingle. Cependant, il n'y aurait que la forme épingle qui permettrait la continuité du processus de formation de fibres amyloïdes (figure 1.8B) (Dupuis *et al.*, 2011a). Au travers de cette conformation, IAPP verrait ses résidus 12 à 28 inclus dans la structure en épingle. Le premier brin engloberait les résidus 12-18, alors que le second brin impliquerait les résidus 22-28. Les résidus 19-21 correspondent à la boucle connectant les deux brins antiparallèles (Mirecka *et al.*, 2016). Selon Mirecka et son équipe, les extrémités N- et C-terminales, correspondant respectivement à 1-11 et 29-37, demeurent alors sous forme aléatoire (Mirecka *et al.*, 2016). Une étude réalisée par Singh et son équipe dévoile l'équilibre

existant entre les 3 formes de l'IAPP sous forme monomérique; cependant seule l'atteinte de la conformation β -*hairpin* permettrait la continuité du processus (figure 1.9). Il existerait deux voies entre ces 3 structures. La première voie constitue le passage de l'hélice vers le β -*hairpin*. Les résidus 7-17 verraient un changement de conformation allant de la structure hélicoïdale vers celle en épingle. Une importante étape de cette transition correspondrait à une réduction de la surface accessible au solvant des résidus hydrophobes (L16, V17, F23, G24, A25, I26, L27), causant l'effondrement hydrophobe de la structure oligomérique. Le tout serait alors suivi de la formation d'un coude au niveau de la région 20-23, causant l'initiation du *zipping process* menant ultimement à la structure en épingle. La seconde voie partirait aussi de l'hélice- α , mais passerait plutôt par la conformation aléatoire avant d'atteindre la structure en épingle. La rotation du résidu F15 de l'extérieur (région riche en solvant) vers l'intérieur du peptide causerait un dé-enroulement de l'hélice, menant vers la structure désordonnée, transition vers l'épingle (Singh *et al.*, 2013).

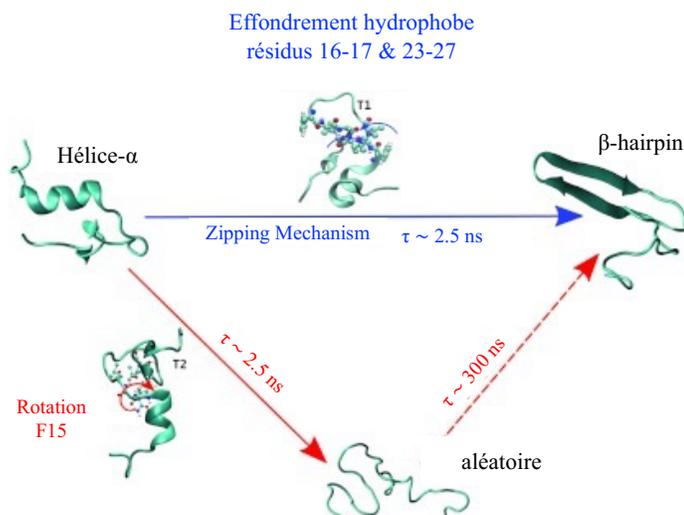


Figure 1.9. Différentes voies transitionnelles entre les différentes conformations de hIAPP monomère adaptée de Singh *et al.*, 2013.

Enfin, Buchanan et son équipe (2013) suggèrent plutôt l'hypothèse suivante: le peptide sous forme native et désordonnée verrait, par diverses forces tels l'empilement aromatique ou l'effondrement hydrophobe, sa région 20-29 former un brin- β . Ce brin devrait alors franchir une barrière énergétique avant d'adopter une structure en boucle dans le noyau en conformation en U. Cette conformation quaternaire oligomérique constituerait ainsi l'une des transitions conformationnelles vers l'atteinte du noyau stable (figure 1.8C) (Buchanan *et al.*, 2013). En effet, en utilisant des peptides macrocycliques en forme de feuillets- β , les auteurs ont pu confirmer l'hypothèse selon laquelle la région ²³FGAIL²⁷ constituerait un oligomère compétent lors de la phase de nucléation. Les peptides macrocycliques, composés de 2 brins- β antiparallèles connectés par 2 ornithines, reconnaissent une région cible de l'IAPP, tout en empêchant l'élongation de la fibre due à la contrainte des quatre ponts hydrogènes internes et à l'incapacité de former des ponts H externes (Buchanan *et al.*, 2013). Des cinq macrocycles, seul celui ciblant la région 21-27 de la séquence primaire de IAPP ralentit considérablement le processus, voir l'inhibe. Ces résultats obtenus par les auteurs révèlent alors que le processus de formation de fibres amyloïdes passe possiblement par un intermédiaire contenant un brin- β au niveau du segment FGAIL. Ils suggèrent aussi que c'est la nature amyloïdogénique de cette région qui lui permet de former un empilement de plusieurs copies du peptide (Buchanan *et al.*, 2013). Ainsi donc, il existe plusieurs hypothèses émises quant aux intermédiaires de la phase de nucléation, néanmoins aucun consensus n'est suggéré actuellement. Comme pour le polymorphisme structural des fibres, ces mécanismes, et d'autres peuvent survenir en parallèle.

1.3.5 Facteurs extrinsèques influençant l'auto-assemblage des peptides amyloïdogéniques

Bien que le mécanisme d'auto-assemblage des peptides amyloïdogéniques ne soit pas entièrement compris, plusieurs facteurs extrinsèques pouvant l'influencer ont été

identifiés. Un des premiers facteurs constitue les forces mécaniques, telle l'agitation. L'agitation augmente notamment le taux de fragmentation, un type de réaction secondaire se produisant lors de la phase de nucléation, mais aussi le transport de la masse associé à la nucléation primaire (Grigolato *et al.*, 2017). De la même étude, il a été démontré que l'interface hydrophobe initie le processus d'auto-assemblage en promouvant la nucléation primaire hétérogène (Grigolato *et al.*, 2017). Ce type de surface est en mesure d'attirer les peptides, ce qui a pour effet d'induire un changement de conformation ou encore d'augmenter la concentration locale, dont la résultante est l'accélération du processus d'auto-assemblage (Grigolato *et al.*, 2017). L'hydrophobicité de surface dans laquelle le peptide s'auto-assemble en combinaison avec l'agitation influence la cinétique du processus et la structure finale des fibres (Grigolato *et al.*, 2017; Sebastiao *et al.*, 2017).

L'ajout de membranes lipidiques dans le milieu cause aussi une accélération du processus de fibrillisation (Cox *et al.*, 2006; Khondker *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017a). Certaines études ont démontré que l'IAPP voyait son auto-assemblage accélérer en présence de vésicules lipidiques synthétiques (Knight et Miranker, 2004; Zhang *et al.*, 2017a). Cependant, plusieurs propriétés des membranes peuvent avoir différents effets sur l'auto-assemblage, incluant la composition membranaire, le type de lipide, ou encore la courbure de la membrane (Terakawa *et al.*, 2018). Ces exemples de facteurs n'ont pas toujours un effet accélérateur. Par exemple, il a d'ailleurs été observé que plus le diamètre de la vésicule synthétique était grand, moins la formation des fibres était favorisée (Terakawa *et al.*, 2018). Le type de lipide peut aussi constituer un élément important. En effet, en présence de liposomes zwitterionique 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) ou cationique 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium propane (DOTAP), aucune augmentation de l'intensité de fluorescence de la Thioflavine T (ThT) n'a été observée, suggérant qu'aucune fibre n'a été produite, et ce même après 8h d'incubation (Knight et Miranker, 2004). La ThT est un fluorophore couramment utilisé pour la détection des fibres amyloïdes (Nilsson, 2004). En effet,

une fois lié aux fibres, la ThT se retrouve coincée dans une conformation restreignant une rotation autour de la liaison C-C entre les 2 noyaux aromatiques. Pour se débarrasser de son énergie, elle émet alors un photon pouvant être ainsi détecté comme une hausse de la fluorescence (Sulatskaya *et al.*, 2011). La composition de la couche de phospholipides constitue alors un facteur d'importance. Les auteurs ont d'ailleurs observé une accélération optimale à une composition membranaire de 70% de lipides anioniques (7:3; DOPC:DOPG) (Knight et Miranker, 2004).

Le pH a aussi un réel impact sur le processus d'auto-assemblage. En effet, dans les granules de sécrétion dont le pH se situe à 5.5, l'auto-assemblage de l'IAPP semble inhibé (Abedini et Raleigh, 2005). Dans le contexte de l'environnement de la matrice extracellulaire, soit à un pH de 7.4, on retrouve l'IAPP sécrétée sous hormone active et mature. Toutefois, ce pH physiologique favorise l'auto-assemblage de l'IAPP (Abedini et Raleigh, 2005). Jha et son équipe (2014) ont mené des expériences afin de mesurer l'impact du pH sur la fibrillation de l'IAPP. L'équipe a réalisé plusieurs cinétiques d'auto-assemblage en faisant varier le pH du milieu entre 3 et 8.5. Via utilisation de la ThT, Jha et al. (2014) se sont rendu compte que l'auto-assemblage était davantage accéléré lors d'une augmentation du pH. Avec un changement d'un milieu acide vers un environnement basique, le temps de latence diminue considérablement alors que le taux de croissance et l'intensité de fluorescence se retrouvent augmentés (Jha *et al.*, 2014). Une autre étude avait d'ailleurs démontré que l'IAPP avait une plus forte tendance à former des fibres en milieu basique qu'acide (Patil *et al.*, 2011). En effet, à pH 5.5, la chaîne latérale du résidu His18 se retrouve protonée, étant donné que son pKa est d'une valeur d'environ 6. La présence de cette charge positive en position His18 engendre alors un ralentissement du processus d'agrégation amyloïde (Khemtemourian *et al.*, 2017).

Enfin, les glycosaminoglycanes (GAGs), de longues chaînes linéaires de polysaccharides sulfatées composées de répétitions de disaccharides (Bishop *et al.*,

2007; Praillet *et al.*, 1998), sont aussi reconnus pour accélérer le processus d'auto-assemblage chez les peptides amyloïdogéniques *in vitro*. Les peptides sous forme amyloïdogéniques, sous forme monomériques ou oligomériques, interagissent avec les GAGs via des liaisons électrostatiques. Ces interactions augmentent de la concentration locale et donc promeuvent l'agrégation (Bourgault *et al.*, 2011; Motamedi-Shad *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2015; Solomon *et al.*, 2011). L'IAPP, à pH physiologique, contient une nette charge positive, et peut de ce fait se lier aux GAGs via interactions électrostatiques (Nguyen *et al.*, 2015). En effet, suite à des analyses de spectroscopie RMN, il a été observé que l'héparine (un type de GAGs) se liait au segment N-terminal du peptide (Jha *et al.*, 2011), segment contenant 4 charges positives potentielles: le groupement amine- α , Lys1, Arg11 et His18. De plus, au moyen du dichroïsme circulaire, il a été possible d'observer qu'en présence de GAGs, l'IAPP et proIAPP voyaient un changement de conformation passant de la forme aléatoire à celle en hélice- α (Abedini *et al.*, 2006; De Carufel *et al.*, 2013), et que cette structure hélicoïdale se transformait rapidement en feuillets- β . De surcroît, il est suggéré que les GAGs induisent une accélération de l'auto-assemblage de l'IAPP, et ce via liaison du segment N-terminal chargé positivement à la surface des GAGs sulfatés. Cette liaison induit également la formation d'une hélice- α . La concentration peptidique locale se voit augmentée, entraînant alors une association du segment amyloïdogénique de plusieurs molécules d'IAPP dont la résultante se traduit par une accélération drastique d'espèces riches en feuillets- β (Nguyen *et al.*, 2015). Enfin, une étude récente a approfondi un peu plus l'impact des GAGs. La présence de ces derniers a réduit la concentration minimale de l'IAPP nécessaire pour induire la mort cellulaire et la perméabilisation membranaire. Les GAGs contribuaient à la cytotoxicité du peptide soit par une augmentation de la concentration de IAPP à la surface cellulaire ou encore par une activation de l'assemblage du peptide en espèces oligomériques cytotoxiques (Quittot *et al.*, 2021). En somme, les GAGs présents à la surface membranaire potentialisent la cytotoxicité de l'IAPP sans altérer les paramètres cinétiques du processus (Quittot *et al.*, 2021).

1.3.6 Résidus et domaines influençant l'auto-assemblage de l'IAPP

La séquence primaire de l'IAPP influence grandement la capacité du peptide à s'auto-assembler en fibres amyloïdes. Maintes études au travers des dernières décennies ont été réalisées afin de mieux comprendre les résidus clés impliqués dans le processus d'auto-assemblage, et ce via des substitutions ciblées. Plusieurs études ont aussi fragmenté le peptide en plusieurs régions afin de mesurer la capacité intrinsèque de chaque région à former des fibres amyloïdes.

1.3.6.1 Implication du pont disulfure (Cys2-Cys7)

Le pont disulfure entre Cys2 et Cys7 constitue une modification post-traductionnelle nécessaire aux fonctions physiologiques de l'IAPP (Hay *et al.*, 2015). Bien que le pont disulfure permette la stabilisation d'une conformation hélicoïdale au niveau de l'extrémité N-terminale (Williamson *et al.*, 2009), il se pourrait qu'il ne soit pas impliqué à l'obtention d'une structure riche en feuillets- β lors d'un processus d'auto-assemblage. La contribution de cette modification post-traductionnelle demeure partagée au sein de la communauté. Selon une étude, la réduction du pont disulfure, via l'introduction d'un groupement carboxyamidométhyle (CAM) ou via le retrait de la région K1-C7, n'affecte pas la morphologie des fibres amyloïdes matures, mais ralentit la nucléation secondaire (Koo et Miranker, 2005). De manière plus récente, la substitution des résidus Cys par Ser semble aussi mener à un ralentissement de l'auto-assemblage de l'IAPP via une prolongation du temps de nucléation (Quittot *et al.*, 2018). Toutefois, selon certaines expériences de dynamiques moléculaires, le retrait du pont disulfure entraînerait une réduction du polymorphisme des espèces oligomériques dont la résultante serait une accélération du processus (Wineman-Fisher *et al.*, 2016). Cette absence de consensus s'explique par un manque de reproductibilité entre laboratoires, l'auto-assemblage de l'IAPP étant très sensible à différents facteurs extrinsèques (pH, agitation, température, surface) (Cao *et al.*, 2013).

1.3.6.2 Rôle des résidus aromatiques

Un autre élément pouvant influencer l'auto-assemblage est la présence de résidus aromatiques. En effet, la contribution des acides aminés aromatiques a largement été étudiée au sein des peptides A β et IAPP (Armstrong *et al.*, 2011; Marek *et al.*, 2007; Tracz *et al.*, 2004; Tu et Raleigh, 2013b), étant donné leur présence dans la séquence primaire. La structure aromatique contribue à l'empilage π - π , un élément clé possiblement promoteur de l'auto-assemblage amyloïde de ses peptides (Gazit, 2002), faisant alors des interactions aromatiques-aromatiques ou aromatiques-hydrophobes un intérêt d'étude. Il a été reporté que les 3 résidus aromatiques de l'IAPP ne sont pas essentiels au processus d'auto-assemblage, leur substitution par une leucine n'empêchant pas la formation de fibres amyloïdes (Marek *et al.*, 2007; Tu et Raleigh, 2013b). Toutefois, leur présence peut jouer un rôle dans les paramètres cinétiques. En effet, l'équipe de Tu et Raleigh, via une substitution par une leucine en position Phe15, Phe23 et Tyr37, ont observé que chacun des résidus affichait une contribution différente au processus, Tyr37 ayant la contribution la plus importante (voir tableau 1.2) (Tu et Raleigh, 2013b). Les auteurs suggèrent que le résidu Phe15 est impliqué dans les premières étapes de l'oligomérisation. Phe15 se retrouve dans la région 8-22 pouvant former une hélice- α , nécessaire à l'association initiale du peptide en dimères. L'hypothèse des intermédiaires hélicoïdaux serait d'autant plus soutenue par les résultats des substitutions en position Phe15 par divers acides aminés ayant un indice d'hydrophobicité semblable, mais des propensions hélice- α et feuillets- β distincts. Plus l'acide aminé possède une propension hélice- α élevée et celle des feuillets- β faible, plus le temps de nucléation est réduit (Tu et Raleigh, 2013b). Ainsi, bien que les résidus aromatiques ne soient pas essentiels à la formation de fibres, ils jouent un rôle clé dans les paramètres cinétiques. D'autres facteurs sont aussi à considérer au niveau de la nature du résidu, tels que la taille, la propension hélice- α et feuillets- β , l'indice d'hydrophobicité (Tracz *et al.*, 2004).

1.3.6.3 Rôle inhibiteur des résidus proline chez l'IAPP de rongeurs.

La séquence primaire de l'IAPP chez les rongeurs diffère de 6 résidus. Le peptide rIAPP est souvent utilisé comme contrôle négatif dans les études puisqu'il ne forme pas de fibres amyloïdes *in vitro* (Betsholtz et al., 1989) et n'est pas toxique pour les cellules β pancréatiques (Abedini et al., 2016). Le très faible caractère amyloïdogénique de rIAPP serait possiblement attribué à la présence de trois prolines dans la région 20-29 (Westermarck et al., 1990). Ridgway et son équipe ont caractérisé le rôle individuel de chaque proline retrouvée dans la séquence de rIAPP afin de pouvoir identifier celle responsable de la perte du caractère amyloïdogénique (tableau 1.2). Ils ont successivement incorporé une proline aux positions Ala25, Ser28 et Ser29 dans la séquence de hIAPP, puis ont aussi réalisé des doubles mutants (A25P/S28P, A25P/S29P, S28P/S29P). Les auteurs ont évalué le caractère amyloïdogénique et cytotoxique chez chacun des analogues, pour observer que la substitution S28P réduit considérablement la cytotoxicité et la capacité d'auto-assemblage du peptide (Ridgway et al., 2020). La substitution S29P est celle la plus modeste, alors que A25P cause un ralentissement de l'auto-assemblage sans pour autant l'inhiber complètement. En somme, cette étude révèle alors la puissance du rôle inhibiteur de la substitution S28P (Ridgway et al., 2020).

Tableau 1.2 Modifications de l'IAPP influençant son caractère amyloïdogénique.

But de l'étude	Modifications	Effet sur l'auto-assemblage	Références
Rôle du pont disulfure	Réduction du pont disulfure via ajout du groupement CAM.	+/- (Réduit la nucléation secondaire)	(Koo et Miranker, 2005)
Création d'une nouvelle sonde	Réduction du pont via substitution par Ser (S2S7)	-	(Quittot <i>et al.</i> , 2018)
Rôle des résidus aromatiques	F15L	+	(Tu et Raleigh, 2013b)
	F23L	-	
	Y37L	--	
	F15L / F23L	--	
	F15L / Y37L	-	
	F23L / Y37L	---	
	F15L / F23L / Y37L	----	
	F15I	--	
	F15NLe	--	
	F15TLe	---	
Contribution inhibitrice des résidus proline chez rIAPP	A25P	--	(Ridgway <i>et al.</i> , 2020)
	S28P	----	
	S29P	-	
	A25P / S28P	----	
	A25P / S29P	--	
	S28P / S29P	----	

TLe: tert-leucine; NLe: norleucine; CAM: carboxyamidométhyle;
+ : accélère la formation de fibres amyloïdes; +/-: n'a pas d'effet significatif;
-: faible ralentissement; --: ralentissement; ---: ralentissement considérable;
----: inhibition

1.3.6.4 Capacité d'auto-assemblage des fragments de l'IAPP

Concernant les domaines de l'IAPP responsables de son auto-assemblage, multiples études sur des fragments de l'IAPP ont été faites. L'extrémité N-terminale (résidus Lys1-Cys7) du peptide ne serait pas en mesure d'influencer de façon importante la formation des fibres amyloïdes et leur morphologie finale; toutefois, elle peut affecter les paramètres cinétiques du processus (Goldsbury *et al.*, 2000). Du côté de la région 20-29, plusieurs études ont démontré que de courts peptides comprenant cette séquence

affichaient une forte capacité d'auto-assemblage en une structure fibrillaire riche en feuillets- β (Goldsbury *et al.*, 2000; Westermark *et al.*, 1990). Du côté de l'extrémité C-terminale de l'IAPP (résidus Thr30-Tyr37), le fragment de cette dernière a démontré une capacité auto-assemblage en fibres en solution, peu importe l'emploi de la séquence primaire de hIAPP ou rIAPP (Nilsson et Raleigh, 1999). Enfin, une autre région bien conservée entre les espèces, le domaine Ala8-Ser20 affiche une capacité d'auto-assemblage en fibres, dont la morphologie s'apparente beaucoup à celle observée chez les fibres amyloïdes (Jaikaran *et al.*, 2001). En effet, l'équipe de Scrocchi a découvert les séquences minimales ayant cette capacité amyloïdogénique au sein du domaine Ala8-Ser20: il s'agit du peptide Leu12-Val17 ainsi que du fragment Phe15-Ser20 (Scrocchi *et al.*, 2003). Toutefois, il est important de noter que la majorité de ses études ont été réalisées à l'aide de fragments de l'IAPP ou encore des dérivés de l'IAPP₈₋₃₇. L'auto-assemblage amyloïde étant un processus complexe faisant intervenir plusieurs facteurs, il est fort possible qu'il nécessite l'interaction de plusieurs domaines à différents stades. Les études réalisées sur le peptide complet sont ainsi nécessaires.

1.4 Cytotoxicité de l'IAPP

1.4.1 Relations entre structure quaternaire et cytotoxicité

La déposition tissulaire de l'IAPP est intrinsèquement associée au diabète de type II (Westermark *et al.*, 2011). En effet, des agrégats ont été retrouvés dans les ilots Langerhans pancréatiques chez plus de 90% des patients souffrant de cette maladie (Westermark *et al.*, 2011). La perte de la viabilité cellulaire serait en lien avec la formation d'agrégats d'IAPP, la quantité de cellules vivantes étant grandement inférieure au sein des ilots pancréatiques contenant des dépôts du peptide (Brender *et al.*, 2012). Il a été initialement proposé que la perte de viabilité cellulaire était causée par les fibres amyloïdes (Lorenzo *et al.*, 1994). Cependant, maintes récentes études ont démontré que cette dégénérescence pancréatique serait plutôt induite par des espèces

non fibrillaires, des oligomères et/ou le processus d'auto-assemblage (Cao *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2015). D'ailleurs, l'étude menée par Abedini et son équipe en 2016 démontre que la cytotoxicité induite par IAPP est dépendante du temps d'auto-assemblage; les fibres n'étant pas toxiques pour les cellules, alors que les espèces intermédiaires de la voie amyloïdogénique le sont (figure 1.10) (Abedini *et al.*, 2016).

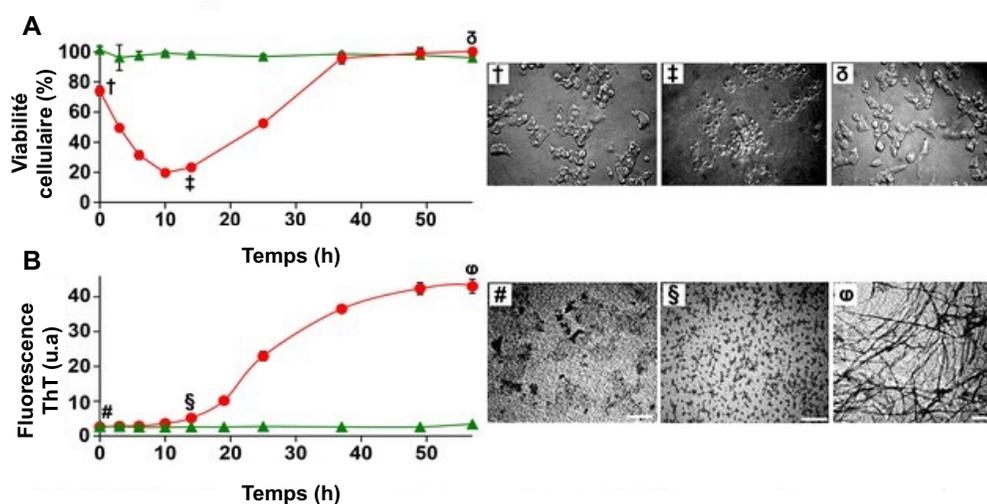


Figure 1.10. Les espèces toxiques de IAPP correspondent aux intermédiaires de la phase de nucléation (Abedini *et al.*, 2016). A) Essai de réduction alamarBlue en fonction du temps sur des cellules- β (INS-1) de rat traitées avec hIAPP (●) et rIAPP (▲). Images de microscopies à contraste de phase: (†) cellules viables à temps zéro, (‡) cellules- β apoptotiques incubées avec des espèces préfibrillaires, (δ) cellules viables à la suite de leur incubation avec les fibres matures. Le réactif alamarBlue utilise la capacité réductrice intrinsèque des cellules vivantes pour convertir la résazurine en résosfurine fluorescente. B) Cinétique de l'auto-assemblage de hIAPP (●) et rIAPP (▲) mesurée par la thioflavine T. Image de microscopie électronique: (#) hIAPP non toxique à temps initial, (§) intermédiaires toxiques de la nucléation, (φ) fibres amyloïdes (échelle: 200 nm).

1.4.2 Mécanismes de cytotoxicité

Il existe de nombreuses hypothèses quant à la toxicité induite par les intermédiaires oligomériques de l'IAPP sur les cellules β pancréatiques; cependant le mécanisme

exact demeure encore méconnu à ce jour. Ces différentes hypothèses incluent entre autres la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), le stress du réticulum endoplasmique (RE), une réponse d'inflammation ou encore des dommages à la membrane plasmique (Westermarck *et al.*, 2011).

1.4.2.1 Perturbation membranaire

La perturbation membranaire correspond à l'une des hypothèses proposées lors d'une accumulation extracellulaire du peptide, à la suite de son exocytose des vésicules sécrétoires. Cette théorie propose plusieurs mécanismes pour la perte de l'intégrité membranaire induite par l'IAPP et de ses espèces quaternaires (figure 1.11A). Une première voie correspond à l'insertion des oligomères ou des espèces préfibrillaires de l'auto-assemblage (Abedini *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2015), au sein de la membrane plasmique. Ces intermédiaires formeraient alors un canal ionique (Anguiano *et al.*, 2002; Lashuel *et al.*, 2002; Mirzabekov *et al.*, 1996; Porat *et al.*, 2003; Westermarck *et al.*, 2011). Lors de la préparation de ses espèces *in vitro*, une grande variété de structures préfibrillaires peuvent être obtenues: oligomères préfibrillaires et protofilaments en forme d'anneau. Kaye et ses collaborateurs ont remarqué que les protofilaments préformés n'étaient pas en mesure de perméabiliser les bicouches lipidiques alors que les oligomères le pouvaient. Ils ont suggéré qu'un oligomère se lie à la membrane, recrutent d'autres oligomères, et ceux-ci forment ensuite la structure en anneau, pouvant mimer un canal ionique (figure 1.11B) (Kayed *et al.*, 2009). Cette capacité de formation de pores est proposée comme étant un mécanisme universel de cytotoxicité pour les protéines amyloïdogéniques. L'analyse de la composition de ces complexes oligomériques en présence de bicouches lipidiques artificielles révèle que ces derniers vont des dimères aux octamères. Dans le cas de l'IAPP, ses pores pourraient être formés de trimères jusqu'aux hexamères (Quist *et al.*, 2005).

La seconde voie de perturbation de l'intégrité membranaire suggère que la pression induite par la croissance des fibres amyloïdes à la surface membranaire en cause la rupture de la bicouche (Engel *et al.*, 2008; Westermarck *et al.*, 2011). Un autre modèle basé sur l'absorption de IAPP à la surface propose que la portion N-terminale du peptide (Lys1-Ser19) se retrouve insérée au travers de la membrane plasmique (Engel *et al.*, 2006; Khemtémourian *et al.*, 2008). Cette région de l'IAPP étant alors insérée laisse le segment 20-29 suffisamment accessible pour s'assembler et l'élongation résultante peut forcer la rupture de l'intégrité membranaire (Engel *et al.*, 2008; Engel *et al.*, 2006). L'importante différence de ce modèle réside dans le fait que ce sont les monomères qui interagissent avec la membrane plutôt que les oligomères et les espèces préfibrillaires. Quoiqu'il en soit, le processus demeure assez complexe à déterminer, étant donné les multiples facteurs le modulant, tels les chaperonnes, la concentration du peptide, la composition et fluidité membranaire, ou encore le pH du milieu (Calloni *et al.*, 2008).

Enfin, de manière plus récente, un autre modèle hypothétique de la perturbation membranaire a été suggéré par Dong et son équipe. En faible concentration dans un environnement lipidique, l'IAPP s'insère dans la bicouche sous sa conformation en hélice- α et permet la formation de pores ioniques. Si l'IAPP est très concentré, le peptide monomérique s'agrège à la surface membranaire. Les oligomères pourraient causer une rupture de l'intégrité via un mécanisme non spécifique de fragmentation (figure 1.11C) (Dong *et al.*, 2018).

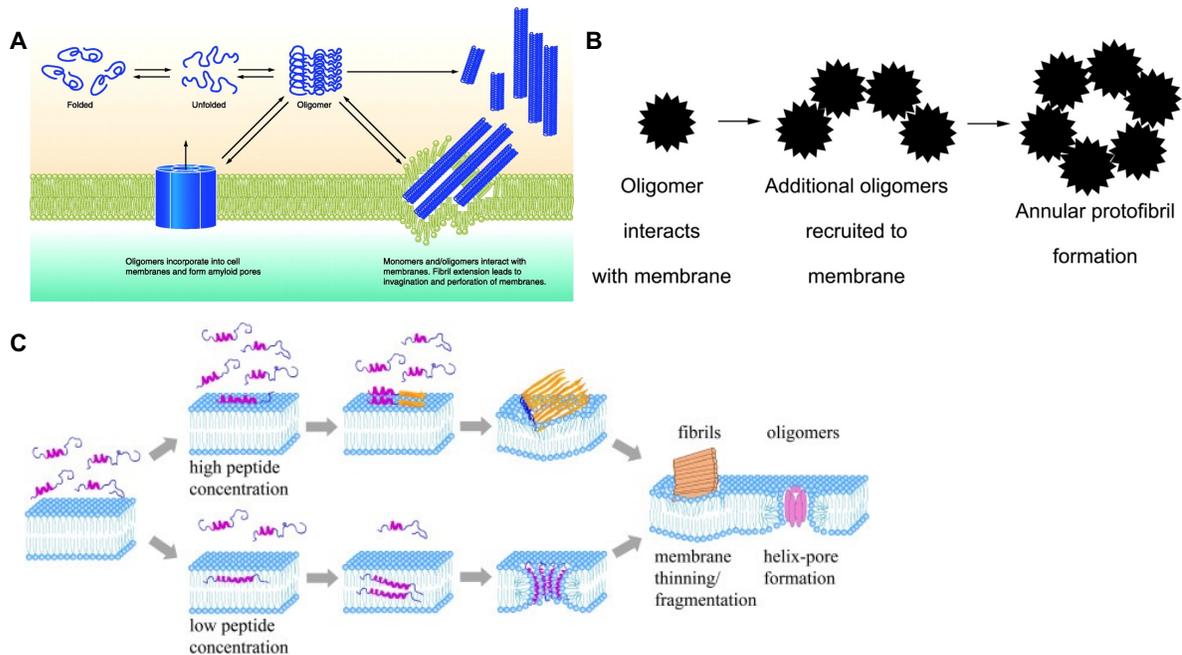


Figure 1.11. Mécanismes hypothétiques de la perturbation membranaire causée par l'IAPP. A) Modèle des 2 mécanismes de perturbation membranaire (Westermarck *et al.*, 2011). B) Modèle de l'insertion des oligomères au travers de la membrane plasmique (Kayed *et al.*, 2009). C) Modèle récent des 2 mécanismes de perturbation membranaire possibles (Dong *et al.*, 2018).

1.4.2.2 Stress du réticulum endoplasmique (RE)

Le réticulum endoplasmique (RE) est un compartiment cellulaire essentiel au bon repliement des protéines et pour certaines modifications post-traductionnelles (Flamment et Foufelle, 2013; Westermarck *et al.*, 2011). Un système de contrôle qualité assure le bon repliement protéique des protéines au niveau du RE avant leur exportation vers l'appareil de Golgi. Différentes voies de signalisation sont régulées par 3 senseurs de stress qui font partie du système UPR (*unfolding protein response*): ATF6, IRE1 et PERK (Flamment et Foufelle, 2013; Westermarck *et al.*, 2011). La résistance périphérique à l'insuline observée dans le cadre du diabète de type II peut compenser pendant un certain temps par augmentation de la synthèse de l'insuline (Flamment et

Foufelle, 2013; Westermark *et al.*, 2011). Cette forte augmentation de synthèse peptidique peut malheureusement entraîner un stress du RE, et être possiblement liée à la cytotoxicité induite par IAPP (Westermark *et al.*, 2011).

Du côté du lien de la cytotoxicité de l'IAPP, il a été démontré qu'une forte augmentation de la concentration proIAPP au niveau du RE pouvait activer le système UPR. ProIAPP nouvellement synthétisé se retrouvait aussi étiqueté pour les différentes voies de dégradation (Raleigh *et al.*, 2017; Westermark *et al.*, 2011). Une surexpression de proIAPP, tout aussi amyloïdogénique que l'IAPP mature (Exley *et al.*, 2010), affecterait le fonctionnement normal du système de RE, pouvant même causer une surcharge du système UPR, un stress significatif et ultimement la mort de la cellule (Raleigh *et al.*, 2017). Étant donné que l'IAPP est enclin à l'agrégation et qu'il est fortement présent dans les ilots Langerhans pancréatiques, l'agrégation intracellulaire de l'IAPP pourrait induire un stress du RE et conduire à l'apoptose. Selon les découvertes de l'équipe de Butler, une surexpression de hIAPP chez le rat déclenchait l'apoptose et réduisait la présence de cellules β vivantes (Butler *et al.*, 2004; Matveyenko et Butler, 2006). Par ailleurs, une importante concentration nucléaire de la protéine CHOP a été aussi retrouvée chez des sections pancréatiques de patients diabétiques, et non pas chez les sujets sains (Huang *et al.*, 2007). Malgré ce qui a été observé dans les études précédentes, il reste qu'il n'y a pas encore une association claire entre la surexpression de l'IAPP et le stress du réticulum endoplasmique. En effet, Hull et son équipe n'ont pas été en mesure de détecter un stress du RE induit par hIAPP chez les ilots pancréatiques humains et de souris après une culture des cellules en présence de forte et faible concentration de glucose (Hull *et al.*, 2009).

1.4.2.3 Autres mécanismes intracellulaires

La déposition observée habituellement dans le cadre du diabète de type II est dite extracellulaire. Or, il est plausible que cette agrégation a été initiée de façon intracellulaire. Dans les cellules β pancréatiques, l'autophagie est nécessaire au maintien des granules sécrétoires (Halban, 1991) ainsi qu'au renouvellement des mitochondries dysfonctionnelles (Ashrafi et Schwarz, 2013). Certaines observations réalisées dans des ilots pancréatiques de souris transgéniques exprimant l'isoforme humaine de l'IAPP révèlent un matériel cytoplasmique intracellulaire répondant positivement à la thioflavine S (sonde parente à la ThT) qui est liée à p62, une protéine impliquée dans l'autophagie (Rivera *et al.*, 2014). Cette observation semble indiquer que les espèces fibrillaires de l'IAPP sont reconnues par le système autophagique pour leur dégradation. De plus, chez des souris transgéniques déficientes au niveau du système autophagique, la quantité d'hIAPP se retrouve augmentée, indiquant alors que l'autophagie régule la quantité d'IAPP présente dans les cellules (Meier *et al.*, 2014; Rivera *et al.*, 2014; Westermark *et al.*, 2011).

Il est aussi possible de penser que les granules sécrétoires constituent une autre cible de la cytotoxicité de l'IAPP (figure 1.12). Les ProIAPP et proinsuline sont transférées du Golgi vers les granules de sécrétion (Raleigh *et al.*, 2017), celles-ci contenant les enzymes nécessaires à la maturation des 2 hormones (PC1/3, PC2, PAM). Les ilots des souris transgéniques dépourvues de la PC2 exprimant hIAPP sont beaucoup moins vivants que ceux des souris ayant la PC2 fonctionnelle, suggérant alors que proIAPP est plus cytotoxique que sa forme mature (Courtade *et al.*, 2017). Les vésicules contiennent notamment de nombreux éléments inhibiteurs de l'amyloïdogénèse (pH acide, forte concentration en insuline/proinsuline et en Zn^{2+}) (Kanatsuka *et al.*, 1989; Raleigh *et al.*, 2017). La proinsuline et l'insuline sous forme hétérodimérique sont reconnues pour former un complexe avec l'IAPP et ainsi inhiber son assemblage en fibres amyloïdes (Knight *et al.*, 2008; Larson et Miranker, 2004; Wiltzius *et al.*, 2009).

Toutefois, dans le cas de surproduction de l'IAPP, ces éléments inhibiteurs ne sont pas toujours en mesure de prévenir l'agrégation, résultant en une accumulation de proIAPP et d'IAPP assemblés (Raleigh *et al.*, 2017; Westermark *et al.*, 2011). Cette accumulation dans les vésicules sécrétoires peut causer une rupture de la membrane de la vésicule et le matériel fibrillaire peut alors s'accumuler dans le cytosol (Westermark, 2011). En résumé, il est encore difficile de savoir ce qui cause exactement la mort des cellules β pancréatiques et plusieurs hypothèses sont toujours le sujet de recherches actives.

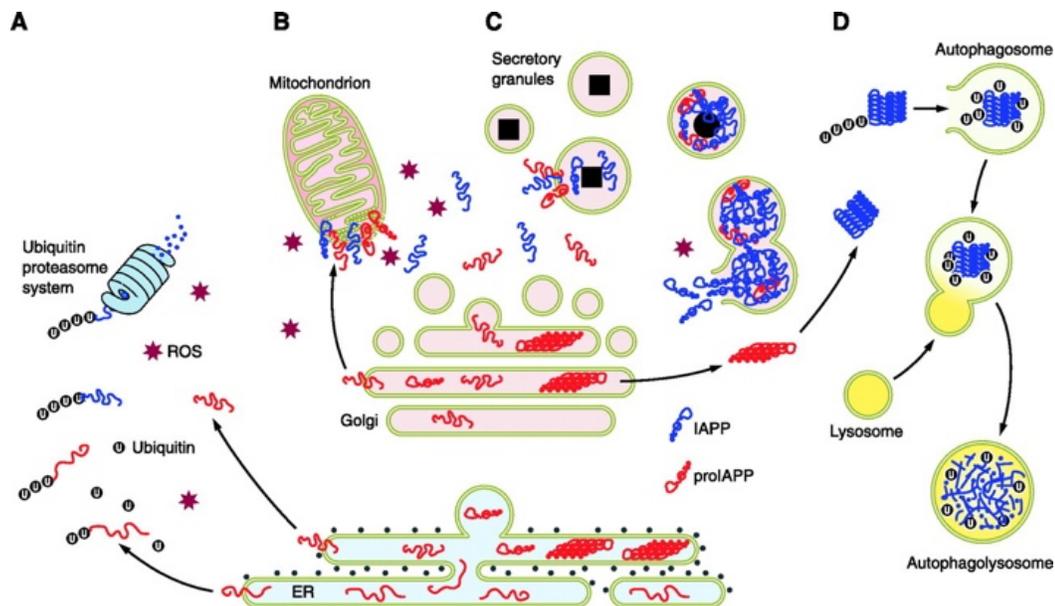


Figure 1.12. Mécanismes intracellulaires hypothétiques par lesquels l'IAPP pourrait induire une cytotoxicité (Westermark *et al.*, 2011). A) Les protéines non repliées dans le RE sont transportées en dehors du compartiment pour être dégradées par le système ubiquitine-protéasome (UPS). B) Les oligomères cytotoxiques à la suite de la surexpression de proIAPP ou de IAPP sont retrouvés dans le cytosol. Ils peuvent venir perforer la membrane des mitochondries et causer un stress oxydatif et une production de ROS. C) Une accumulation de IAPP et de proIAPP dans les vésicules peut causer une rupture de la membrane de la vésicule et le matériel fibrillaire peut s'accumuler dans le cytosol. D) Des agrégats matures ne peuvent malheureusement pas être dégradés par le protéasome. Ils seront ubiquitinés et déclencheront une autophagie particulière qu'on appelle agréphagie. Les autophagosomes intègrent les agrégats et fusionnent avec un lysosome pour former un autophagolysosome. Un dysfonctionnement de l'une des voies décrites peut mener à d'importantes conséquences sur le milieu intracellulaire et induire l'apoptose.

1.5 Problématique, hypothèses et objectifs

1.5.1 Problématique

L'administration de l'IAPP couplée à celle de l'insuline normalise les fluctuations des niveaux de glucose, et ce à un meilleur degré d'efficacité que celui de l'insuline seule, dans le cadre de thérapies du diabète de type I et II. Toutefois, l'IAPP est très enclin à l'agrégation amyloïde et est cytotoxique sous sa conformation quaternaire oligomérique, ce qui empêche son utilisation dans la lutte contre le diabète (Akkati *et al.*, 2011; Akter *et al.*, 2016; Allard *et al.*, 2005; Kruger et Gloster, 2004; Lebovitz, 2010). C'est pour ces raisons que le pramlintide, un analogue non amyloïdogénique et non toxique de l'IAPP ayant des prolines aux positions Ala25, Ser28 et Ser29, a été développé. Bien qu'approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) (Kruger et Gloster, 2004; Ratner *et al.*, 2004), cet analogue n'est toutefois pas soluble sous conditions physiologiques (Akter *et al.*, 2016). La conception de nouveaux analogues de l'IAPP solubles en conditions physiologiques, non amyloïdogéniques et non cytotoxiques constitue encore aujourd'hui un important domaine de recherche. En outre, le manque de caractérisation des espèces transitoires oligomériques responsables de la dégénérescence pancréatique et le polymorphisme de la structure atomistique de l'IAPP au sein de fibres matures observé *in vitro* et *in vivo* empêchent la compréhension fine de l'amyloïdogénicité et cytotoxicité de l'IAPP. Il est ainsi nécessaire de réaliser des études relation structure/auto-assemblage chez l'IAPP pour découvrir ce qui engendre les mécanismes d'oligomérisation et de cytotoxicité.

1.5.2 Hypothèses

Plusieurs années se sont écoulées depuis que Scrocchi et son équipe ont découvert que les séquences Leu12-Val17 et Phe15-Ser20 de l'IAPP affichent une capacité d'auto-assemblage (Scrocchi *et al.*, 2003). Pourtant, leur étude ne s'est réalisée que sur de

courts fragments de l'IAPP et non pas à l'aide du peptide complet. Selon les résultats obtenus par les auteurs de l'étude, il semble plausible que le domaine Leu12-Val17 constitue une région ayant un impact clé sur le processus d'auto-assemblage de l'IAPP. De plus, tel que décrit par le modèle des intermédiaires hélicoïdaux, l'association de l'IAPP en dimère serait thermodynamiquement dépendante de la formation de l'hélice entre les résidus Ala5-Asn22 (Abedini et Raleigh, 2009a; Hebda et Miranker, 2009). Les résultats des simulations en dynamique moléculaire réalisée par Laghaei et son équipe révèlent que les premières étapes de l'oligomérisation sont induites par une association dimérique hélicoïdale de l'extrémité N-terminale du peptide. Les dimères de l'IAPP présentent de fortes interactions hydrophobes intermoléculaires entre les chaînes latérales des résidus Leu12-Phe15 et Leu12-Leu16. Cette courte région affiche aussi 80% de probabilité d'adopter une structure en hélice- α (Laghaei *et al.*, 2011). De surcroît, il est possible d'émettre l'hypothèse suivante: les résidus du domaine Leu12-Val17 et son ensemble conformationnel local jouent un rôle possiblement crucial dans le processus d'auto-assemblage amyloïde et de la cytotoxicité médiée de l'IAPP.

1.5.3 Objectifs

L'objectif général de ce projet de maîtrise vise à l'élucider la contribution du domaine Leu12-Val17 ainsi que l'implication des intermédiaires hélicoïdaux dans l'auto-assemblage et la cytotoxicité de l'IAPP. Afin de réaliser cet objectif global, les objectifs spécifiques seront ciblés:

- 1) Évaluer la capacité du court fragment IAPP₁₂₋₁₇ à s'auto-assembler en fibres amyloïdes.
- 2) Comprendre la contribution de chaque chaîne latérale de la région Leu12-Val17 dans le processus d'auto-assemblage et de cytotoxicité du peptide, et ce au moyen de substitutions successives par une alanine.

- 3) Explorer le rôle de la flexibilité conformationnelle du squelette peptidique via incorporation successive de Pro/Gly/Aib aux positions Ala13 à Leu16, dans le but de favoriser ou non le repliement hélicoïdal de l'IAPP.

CHAPITRE II

ARTICLE

MECHANISTIC ROLES OF THE HYDROPHOBIC LEU12-VAL17 DOMAIN OF
THE ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE IN SELF-ASSEMBLY AND
CYTOTOXICITY

*Mathilde Fortier^{1,2}, Mélanie Côté-Cyr^{1,2}, Vy Nguyen^{1,2}, Margaryta Babych^{1,2}, Phuong
Trang Nguyen^{1,2} and Steve Bourgault^{1,2*}*

*¹Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale
Centre-Ville, Montreal, H3C 3P8, Canada*

*²Quebec Network for Research on Protein Function, Engineering and Applications,
PROTEO, Canada*

Manuscrit en préparation pour soumission à *Frontiers in Molecular Biosciences*

Contribution des auteurs :

Mathilde Fortier : Conception du projet, exécution des expériences (Synthèse et purification des analogues de l'IAPP, assemblage du court fragment LANFLV, cinétique d'auto-assemblage, spectres d'émission de la ThT et de l'ANS, conformation secondaire des analogues par dichroïsme circulaire, morphologie des assemblages par AFM, essais de perturbation membranaire, essais de la capacité de stabilité de l'hélice- α des analogues par dichroïsme circulaire, essais de cytotoxicité des analogues, visualisation de la cytotoxicité par microscopie confocale), analyse des résultats, préparation des figures, rédaction de l'article.

Mélanie Côté-Cyr : Analyses par microscopie électronique à transmission (TEM).

Vy Nguyen : Support pour les purifications et essais de perturbation membranaire.

Margaryta Babych : Exécution de l'assemblage du court fragment LANFLV, support technique.

Phuong Trang Nguyen : Support technique pour la synthèse des peptides et pour l'analyse en microscopie confocale.

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

2.1 Résumé

L'islet amyloid polypeptide (IAPP) est une hormone glucomodératrice co-sécrétée et co-exprimée avec l'insuline par les cellules β pancréatiques. Néanmoins, ce peptide de 37 résidus est très enclin à l'agrégation et sa déposition tissulaire subséquente en agrégats insoluble dans les ilots de Langerhans est notamment associée au diabète de type II. Le manque de compréhension du mécanisme d'auto-assemblage et de la structure des espèces quaternaires associées à la dégénérescence pancréatique empêchent le développement d'approches thérapeutiques efficaces et ciblées. À cet effet, plusieurs études ont cherché à définir les domaines contribuant à l'auto-assemblage amyloïde de l'IAPP, et la majorité de celles-ci ont ciblé le segment Ser20-Ser29. Toutefois, peu d'études ont révélé la contribution du domaine Leu12-Val17 dans la nucléation et l'oligomérisation, et ce malgré son hydrophobicité élevée. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était d'élucider la contribution mécanistique du domaine Leu12-Val17 dans l'auto-assemblage de l'IAPP et sa cytotoxicité médiée. Les résultats obtenus de l'*Ala-scan* ont révélé le rôle essentiel des chaînes latérales hydrophobes Leu12, Phe15 et Val17 au sein du processus. La déstabilisation de la structure secondaire en hélice- α engendrée par l'incorporation d'un résidu Pro en position Ala13, Asn14 et Phe15 a fortement accéléré l'auto-assemblage de l'IAPP, en comparaison aux analogues Ala respectifs. En modulant la flexibilité du squelette peptidique par l'incorporation successive de Pro, Gly et Aib en position Leu16, l'auto-assemblage de l'IAPP s'est retrouvé fortement réduit, tout comme son caractère cytotoxique. À l'opposé, l'*Ala scan* avait révélé que la chaîne latérale du résidu Leu16 n'était pas essentielle à l'auto-assemblage ni à la cytotoxicité associée. Les résultats de la présente étude soulignent l'importante contribution du domaine Leu12-Val17 à l'agrégation amyloïde et à la cytotoxicité, supportant ainsi le développement d'inhibiteurs spécifiques de l'amyloïdogénèse.

2.2 Abstract

The islet amyloid polypeptide (IAPP) is a glucomodulatory hormone co-secreted with insulin by pancreatic β -cells. This 37-residue peptide is highly prone to aggregation and its deposition into insoluble amyloid fibrils in the islets of Langerhans is associated with type II diabetes. Therapeutic interventions targeting IAPP amyloidogenesis, which contributes to β -cell degeneration, remain elusive owing to a lack of understanding the mechanism of self-assembly and of the quaternary proteospecies mediating toxicity. Countless studies have investigated the contributions of the 20-29 region of IAPP in amyloid self-assembly, while the central hydrophobic domain 12-17 has been the subject of limited studies, notwithstanding its potential key role in oligomerization and/or nucleation. In this context, further investigating the chemical and conformational properties of the Leu12-Val17 region driving IAPP self-assembly and associated cytotoxicity is needed. With the use of biophysics tools such as circular dichroism spectroscopy, ThT and ANS fluorescence and TEM, to evaluate amyloid self-assembly, two series of IAPP full-length were made. Alanine scanning revealed that the hydrophobic side chains of Leu12, Phe15 and Val17 are particularly important for the self-assembly process. Destabilization of the α -helix structure by Pro incorporation promoted amyloid formation when the pyrrolidine ring was introduced at position Ala13, Asn14 and Phe15, in comparison to their respective Ala-substituted counterparts. Modulating the peptide backbone flexibility at position Leu16 through successive incorporation of Pro, Gly and α -aminoisobutyric acid, inhibited amyloid formation and reduced cytotoxicity, while the Leu16 isobutyl side chain was not critical for self-assembly and toxicity. In summary, these results highlight the importance of IAPP 12-17 region for aggregation and cell toxicity, ultimately supporting the development of therapeutic approaches to arrest fibrillization.

Keywords: islet amyloid polypeptide, self-assembly, amyloid fibrils, cytotoxicity, protein aggregation

2.3 Introduction

The islet amyloid polypeptide (IAPP) is a 37-residue peptide hormone that is co-expressed and co-secreted with insulin by pancreatic β -cells (Westermarck *et al.*, 2011). Although its physiological functions are still not fully characterized, IAPP is known to inhibit glucagon secretion, food intake and gastric emptying, ultimately modulating levels of blood glucose (Hay *et al.*, 2015). Coadministration of the IAPP analog pramlintide to diabetic patients with insulin contributes to normalizing glucose levels, more than insulin alone (Kruger *et Gloster*, 2004). Notwithstanding essential physiological functions and therapeutic usage, IAPP is mainly known for its high propensity to aggregate into insoluble amyloid fibrils, which are associated with the pathogenesis of type II diabetes (Westermarck, 2011). Actually, the extracellular deposition of IAPP in the pancreatic islets is observed in over 90% of type II diabetic patients (Westermarck *et al.*, 2011). The process of IAPP aggregation and amyloid deposition correlates closely with pancreatic β -cell mass reduction and loss of function (Kahn, 2000). Different supramolecular structures of IAPP fibrillar assemblies have been reported and these models have highlighted the high polymorphism of amyloid fibrils. As implied by solid-state NMR, each of the monomeric units adopts a U-shaped structure, with two β -strands connected by a chain-reversing loop involving residues 18-27 (Luca *et al.*, 2007). In contrast, three recent Cryo-EM studies revealed that IAPP monomers within fibrils encompass 3 β -strands of various lengths (Cao *et al.*, 2020; Gallardo *et al.*, 2020; Röder *et al.*, 2020). Interestingly, IAPP fibrils seeded with amyloids extracted from diabetic patients, exhibited at least four different atomistic structures, suggesting that pancreatic islet amyloid deposits are heterogenous (Cao *et al.*, 2021). This polymorphism complexifies our understanding of the relationships between IAPP deposition and β -cell degeneration, as different fibrillar architectures could lead to divergent toxicity (Nguyen *et al.*, 2021). Furthermore, compelling biochemical evidence has revealed that oligomers and prefibrillar assemblies are the most culprit proteospecies of the amyloidogenic cascade, while mature fibrils are

usually poorly cytotoxic (Cao *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2015). Highly toxic IAPP oligomers transiently populating the lag phase were found to be soluble, globally flexible, partially structured with solvated aromatic side chains, and to range from dimers up to hexamers (Abedini *et al.*, 2016). This large secondary and quaternary conformational ensemble precludes the structural characterization of proteotoxic oligomers. The polymorphism of IAPP amyloid fibrils and the transient nature of oligomers makes it very challenging to pinpoint the molecular basis of the toxicity of amyloid related assemblies. In this context, it remains critical to elucidate the regions and the side chains driving self-recognition and toxicity, to design therapeutic strategies to arrest IAPP aggregation.

Since its discovery, countless studies have highlighted the key contributions of the 20-29 domain for IAPP self-assembly (Glennner *et al.*, 1988). The fact that the sequence from rodent IAPP (rIAPP) includes 3 β -breaker proline residues within the 20-29 region, and is non-amyloidogenic and non-toxic, further highlights the critical role of this segment (Moriarty et Raleigh, 1999). Short peptides comprising the 20-29 region spontaneously assemble into β -sheet-rich fibrillar structures (Azriel et Gazit, 2001; Babych *et al.*, 2018; Goldsbury *et al.*, 2000; Westermark *et al.*, 1990). A short peptide corresponding to the C-terminal domain was also able to form fibrils in solution (Nilsson et Raleigh, 1999). Intriguingly, while peptides corresponding to the highly conserved 8-20 central region are known to self-assemble into fibrils (Jaikaran *et al.*, 2001), a limited number of structure-aggregation studies have focused on this region. It was reported that the minimal peptide sequences of the 8-20 domain competent to self-associate into amyloids consist of the segments 12-17 and 15-20 (Scrocchi *et al.*, 2003). Besides, residue-specific modifications have been exploited to refine the driving forces of IAPP self-assembly (Cao *et al.*, 2013). While the critical roles of several side chains of the 20-29 region for IAPP aggregation and associated toxicity have been reported, including residues Asn21 (Godin *et al.*, 2019; Koo *et al.*, 2008), Phe23 (Doran *et al.*, 2012; Tu et Raleigh, 2013b), Ser28 (Ridgway *et al.*, 2020; Westermark *et al.*,

1990) and Ser29 (Akter *et al.*, 2018; Ridgway *et al.*, 2020), other regions of IAPP have been less investigated. Within the 8-20 region, Asn14 is likely involved in a critical hydrogen bond network favouring IAPP nucleation (Koo *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2017), whereas the hydrophobic Phe15 participates in IAPP oligomerization (Tu et Raleigh, 2013b; Wiltzius *et al.*, 2009). These previous structure-aggregation studies demonstrated that the process of self-assembly is complex and involves molecular interactions between multiple domains, revealing the importance of conducting such investigation with full-length IAPP.

The present study aims at further deciphering the physicochemical and conformational properties of IAPP contributing to amyloid aggregation and associated cytotoxicity. First, *in silico* analyses performed with AGGRESCAN (Conchillo-Solé *et al.*, 2007), CamSol (Sormanni *et al.*, 2015) and TANGO (Fernandez-Escamilla *et al.*, 2004) predicated two main regions respectively contributing to aggregation, low solubility and β -sheet formation: segments 12-17 and 23-29 (**Figure 2.1**). While the 23-29 domain has been extensively studied, the segment 12-17 has been less investigated. After demonstrating that a short peptide corresponding to the 12-17 domain assembled into fibrillar nanostructures, the importance of each side chain in amyloid formation and cytotoxicity was investigated by successively substituting each residue with Ala (*Ala-scan*). By replacing residues within this segment by amino acids affecting the secondary conformational ensemble, such as Pro, Gly and aminoisobutyric acid (Aib), insights into the mechanisms of amyloid formation were obtained. Our results revealed the critical contributions of the hydrophobic sidechains of Leu12, Phe15 and Val17 in self-assembly as well the importance of backbone flexibility and local secondary structure for amyloid formation.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Peptide Synthesis, Purification and Monomerization

IAPP and its derivatives were synthesized on Rink Amide AM solid support using fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (Fmoc) chemistry (De Carufel *et al.*, 2013). Pseudo-proline derivatives were used to facilitate synthesis and to increase yield (Abedini et Raleigh, 2005). After cleavage from the resin with a mixture of TFA, ethanedithiol, phenol, and water (92/2.5/3/2.5), crude peptides were precipitated with ethyl ether, solubilized in H₂O, and lyophilized. Peptides were first dissolved in acetic acid and diluted in H₂O to 35% to be purified by RP-HPLC using a C18 column (Luna 10 µm C18(2) 100Å LC Column 250 X 21.2 mm). Collected fractions were analyzed by analytical HPLC using a C18 column (Kinetex 5 µm EVO C18 100Å LC Column 150 X 4.6 mm). Accurate mass was validated by mass spectrometry using an Agilent 1200 series HPLC instrument connected to an electrospray time-of-flight mass spectrometer (LC-ESI-TOF). Fractions corresponding to the desired peptide were pooled and oxidation of Cys2 and Cys7 was performed in dimethyl sulfoxide (DMSO) overnight for 16 h. Cyclized peptides were then diluted in 0.06% TFA water before being purified by RP-HPLC. Fractions with purity higher than 95% were pooled and lyophilized. Aliquots of monomerized IAPP were prepared by dissolving the lyophilized peptide in 100% hexafluoro-2-propanol (HFIP) to a concentration of 1 mg/mL. Solution was filtered through a 0.22-µm hydrophilic polyvinylidene difluoride (PVDF) filter, sonicated for 30 min before being lyophilized. The resulting powder was solubilized at 1 mg/mL for a second time in HFIP, sonicated for 30 min, and solution was aliquoted and lyophilized to ensure IAPP monomerization. Monomerized IAPP samples were kept dried at -20 °C until used.

2.4.2 Kinetics of Amyloid Formation Monitored by ThT Fluorescence

Aggregation mixtures were prepared by dissolving the lyophilized peptide at a concentration of 50 μM in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4. Assays were performed at 25 $^{\circ}\text{C}$ without stirring in sealed black-wall clear-bottom 96-well nonbinding surface plates with 100 μL /well. Final peptide concentrations were 12.5 and 25 μM , and thioflavin T (ThT) concentration was fixed at 40 μM . Fluorescence was measured every 10 min (excitation: 440 nm, emission: 485 nm) and data from triplicate wells were averaged, corrected by subtracting the blank control, and plotted as ThT fluorescence vs time. Data were normalized with maximum ThT fluorescence intensity obtained for unmodified IAPP. Data were fitted to a sigmoidal Boltzmann model:

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

where T_{50} is the time required to reach half of the maximum fluorescence intensity, k is the apparent first-order constant, and Y_{\max} and Y_0 are the maximum and initial ThT fluorescence values. Lag time corresponds to $T_{50} - 2/k$. Data of at least six assays performed with different peptide lots were averaged and expressed as the mean \pm S.D. Statistical analysis was performed using Student's t test, and statistically significant difference between IAPP and analogs was established at (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.005$; (***) $p < 0.0005$.

2.4.3 Self-Assembly under Fully Quiescent Conditions

Solutions were prepared by dissolving the peptide at a concentration of 50 μM in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, and were incubated at room temperature without agitation in 1.5 mL *Eppendorf* microtubes. For IAPP₁₂₋₁₇, the lyophilized peptide was dissolved in 20 mM acetate pH 6.5 in the presence of 3% DMSO, or HFIP, at a final concentration of

500 μM and the peptide solution was incubated at 37°C under constant rotational agitation.

2.4.4 ThT and ANS Fluorescence Spectroscopy

At the indicating time of incubation, peptide solutions were diluted to 25 μM in presence of 40 μM ThT, or 25 μM 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS). Fluorescence was measured in 10-mm pathlength microcells using a PTI QuantaMaster spectrofluorometer. For ThT, excitation was set at 440 nm, and the emission spectrum from 450 to 550 nm was recorded. For ANS, the excitation was set at 355 nm, and the emission scan was recorded from 385 to 585 nm.

2.4.5 Circular Dichroism Spectroscopy

After incubation, peptide solutions were diluted in water to 25 μM and incorporated into a 2-mm path length quartz cell. For IAPP₁₂₋₁₇, the solution was diluted to 150 μM . Far-UV CD spectra were recorded from 190 to 260 nm using a Jasco J-815 CD spectropolarimeter at 25 °C. The wavelength step was set at 0.5 nm with an average time of 10 s per scan at each wavelength. Spectra were background-subtracted with buffer solution. Raw data were converted to mean residue ellipticity (MRE):

$$MRE = \frac{\text{Mean residue weight } \left(\frac{g}{mol}\right) \times CD \text{ signal (deg)}}{10 \times \text{pathlength (cm)} \times \text{protein concentration } \left(\frac{g}{mL}\right)}$$

2.4.6 Transmission Electron Microscopy

After incubation, peptide solutions were diluted to 10 μM , or 100 μM for IAPP₁₂₋₁₇, before being applied on glow-discharged carbon films on 300-mesh copper grids. Samples were adsorbed and negatively stained with 1.5% uranyl formate for 45 s.

Images were recorded using a FEI Tecnai G2 Spirit Twin microscope operating at 120 kV and equipped with a Gatan Ultrascan scan 4000 4k × 4k CCD camera system.

2.4.7 Atomic Force Microscopy

After incubation, peptide solutions were diluted in 1% acetic acid to a concentration of 7.5 μM. Samples were immediately applied to freshly cleaved micas, washed twice with deionized water, and air-dried for 24 h. Images were recorded using Veeco/Bruker multimode AFM instrument using ScanAsyst-air mode with a silicon tip (2-12 nm tip radius, 0.4 N/m force) on a nitride lever. Images were taken at 0.977 Hz and 512 scan/min.

2.4.8 Lipid Membrane Leakage

Large unilamellar vesicles (LUVs) were assembled from 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DOPG) at a 9:1 molar ratio (DOPC:DOPG). Lipids were solubilized in 100% chloroform, which was then evaporated. The lipid film was rehydrated in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 70 mM calcein, whose solubility was increased by the addition of 5M NaOH and sonication. The lipid mixture was freeze-thawed five times before being extruded through a 100 nm membrane for 20 cycles. Nonencapsulated calcein was removed by gel filtration using a Sephadex G25 fine resin and 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4, as elution buffer. Final lipid concentration was determined by an inorganic phosphate detection colorimetric assay (Carles, 1956). Lyophilized peptides were solubilized in 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4, at 50 μM prior to dilution into calcein-LUVs, to reach 25 μM peptide and 500 μM phospholipids. Fluorescence was monitored in sealed black-wall, clear-bottom 96-well non-binding surface plates with 100 μL/well. Fluorescence (excitation: 495 nm, emission: 517 nm)

was measured every 10 min over 24 h. 100% leakage (F_{\max}) was determined with 0.2% Triton X-100 and LUV leakage was reported using:

$$\text{Membrane leakage (\%)} = (F - F_{\text{baseline}}) / (F_{\max} - F_{\text{baseline}})$$

Data of at least 4 assays with different peptide lots were averaged and expressed as the mean \pm S.D. Statistical analysis was performed using Student's t test, and statistically significant difference was established at (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.005$; (***) $p < 0.0005$.

2.4.9 Cell viability measurements

Rat INS-1E cells were cultured in treated black-wall clear-bottom 96-well plates at a density of 25 000 cell/well in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate and 50 μM β -mercaptoethanol. After 48 h of incubation at 37°C in 5% CO₂, cells were treated with 50 μL of peptide freshly dissolved in 20 mM Tris HCl, pH 7.4. Cells were incubated with the peptide for 24 h before cell viability was measured with the reduction of 45 μM resazurin. Cell viability (%) was calculated from the ratio of the fluorescence of the treated cells to the vehicle-treated cells. Data of at least five assays performed with different peptide lots were averaged and expressed as the mean \pm S.D. Statistical analysis was performed using Student's t test, and statistically significant difference was established at (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.005$; (***) $p < 0.0005$. For Live/Dead, cells were plated in 12-well plates at density of 250 000 cell/well for 48 h before treatment with 25 μM peptide. After 24 h incubation, 4 μM of ethidium homodimer-1 and 2 μM of calcein-AM were added to the media, and after 30 min of incubation, cells were imaged with a fluorescence confocal Nikon microscope equipped with a 20x objective.

2.5 Results and Discussion

2.5.1 The Fragment Leu12-Val17 Self-Assembles into β -Sheet-Rich Fibrils

Analysis of IAPP amino acid sequence with *in silico* tools AGGRESCAN (Conchillo-Solé *et al.*, 2007), CamSol (Sormanni *et al.*, 2015) and TANGO (Fernandez-Escamilla *et al.*, 2004) revealed two main amyloidogenic regions: the 12-17 domain and the 23-29 segment (**Figure 2.1B**), with the 12-17 region predicted to be the most aggregation-promoting region. Whereas the mechanistic contributions of the 23-29 region in amyloid formation have been abundantly investigated (Buchanan *et al.*, 2013; Goldsbury *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2014), the segment 12-17 has been the subject of a limited number of studies (Kajava *et al.*, 2005; Scrocchi *et al.*, 2003). In this context, we initially evaluated if a short C-amidated peptide encompassing the 12-17 segment (LANFLV) could assemble into amyloid fibrils. As the IAPP₁₂₋₁₇ peptide showed poor solubility, the lyophilized/monomerized peptide was first solubilized in HFIP, or DMSO, before being diluted in 20 mM acetate buffer pH 6.5 to reach a final concentration of 3% of organic solvent and 500 μ M peptide. The LANFLV hexapeptide was incubated at 37°C under constant rotary agitation and periodically analyzed by ThT and ANS fluorescence, CD spectroscopy, and TEM. Far-UV spectroscopy revealed that IAPP₁₂₋₁₇ exhibits mainly a random coil secondary structure after its solubilization into 3% HFIP solution, which evolves into β -sheet after prolonged incubation times, suggesting the formation of amyloid-like assemblies (**Figure 2.1C**). Because of high signal background, CD analysis was not performed in presence of DMSO. TEM imaging performed after 7 days revealed the formation of laterally aligned rod-like fibrils, which were longer in presence of HFIP, in comparison to DMSO (**Figure 2.1D, 2.1E**). These β -sheet-rich fibrillar aggregates showed negative ThT and ANS signals (**Figure 2.S1**), which could be associated with the fact that this segment might not be sufficient to generate π -stacking and/or large hydrophobic surfaces (Biancalana et Koide, 2010). A recent study fragmented IAPP into short peptides and evaluated their amyloidogenicity. A pentapeptide corresponding to the

segment 13-17 (ANFLV) did not form fibrils, even after several days of incubation (Rozniakowski *et al.*, 2020), suggestive of the critical participation of Leu12. Nonetheless, as amyloid self-assembly is very sensitive to the experimental conditions (Khemtémourian *et al.*, 2011), such as the presence of organic solvents (Nichols *et al.*, 2005; Padrick et Miranker, 2002), comparison between studies remains elusive. Overall, these data indicate that a short peptide comprising the predicted aggregation-prone 12-17 region forms fibril-like aggregates, encouraging further investigation to elucidate its contributions to IAPP self-assembly in the context of the full-length peptide.

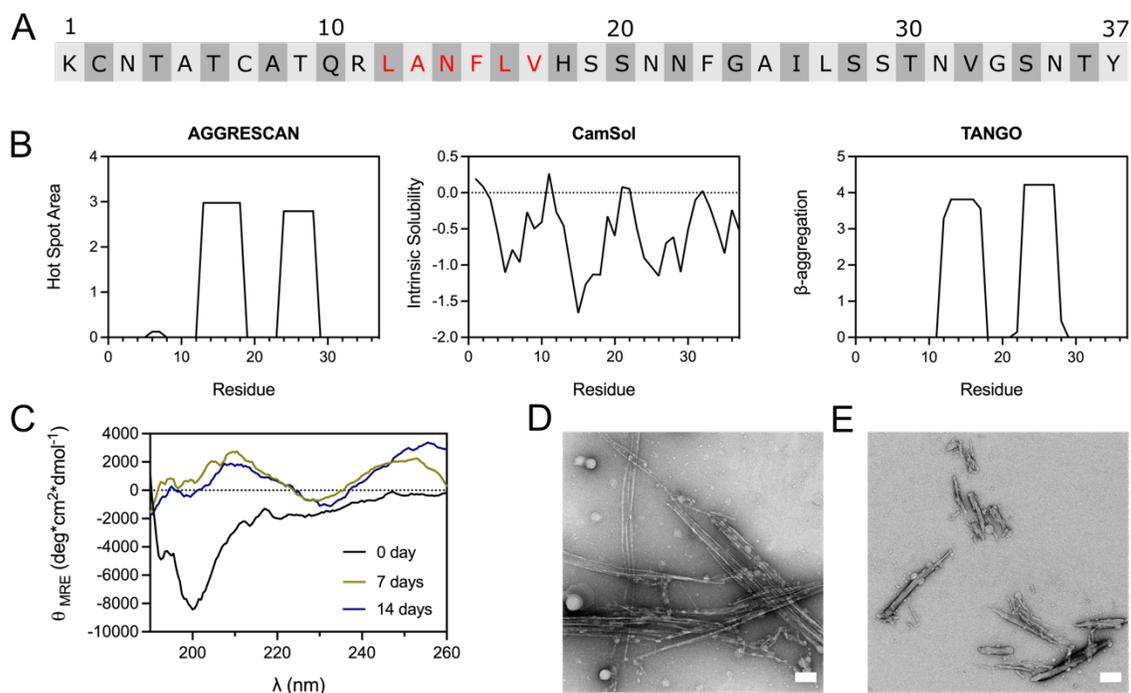


Figure 2.1. Amyloidogenicity of the 12-17 region of IAPP. (A) IAPP primary sequence with the residues of the 12-17 segment indicated in red. (B) Computational predictions performed with AGGRESCAN, CamSol and TANGO, carried out at pH 7.4 and with amidated C-terminus. (C) CD spectra of IAPP₁₂₋₁₇ over incubation time. IAPP₁₂₋₁₇ peptide was solubilized at 500 μ M in 20 mM acetate buffer, pH 6.5, 3% HFIP, and incubated at 37°C under constant agitation. (D, E) TEM images of IAPP₁₂₋₁₇ peptide after 7 days incubation at 500 μ M in presence of 3% HFIP (D) or 3% DMSO (E). Scale bars: 100 nm.

2.5.2 *Ala-Scan* Reveals Key Side Chains Contributions of the 12-17 Domain for Amyloid Formation

Because of the challenges associated with the synthesis and handling of full-length IAPP, previous studies have often been conducted using short fragments (Louros *et al.*, 2015; Rozniakowski *et al.*, 2020; Scrocchi *et al.*, 2003; Wiltzius *et al.*, 2008), or the IAPP₈₋₃₇ segment (Abedini et Raleigh, 2006; Koo *et al.*, 2008; Wiltzius *et al.*, 2009), limiting the scope as amyloid formation is a complex self-recognition process implicating multiple domains of the peptide. To initially probe the contributions of the physicochemical properties of each side chain of the 12-17 region in self-assembly and cytotoxicity, a small peptide library of full length IAPP was prepared by successively incorporating Ala at positions 12 to 17. *In-silico* analysis predicted that the respective replacement of the hydrophobic residues Leu12, Phe15, Leu16 and Val17 by an Ala, decreases IAPP amyloidogenicity, while the N14A substitution increases its aggregation propensity (**Figure 2.S2**). The impact of the successive substitution by Ala on self-assembly was evaluated using a combination of standard biophysical methods. First, kinetics of amyloid formation monitored by ThT fluorescence revealed if the successive alanine replacement within the 12-17 domain inhibits, or delays, amyloid formation (**Figure 2.2**). Under the conditions of the kinetics assay, *i.e.* 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, no agitation, nonbinding surface, unmodified IAPP showed a prototypical sigmoidal curve characteristic of a nucleated polymerization with a lag time of 3.9 ± 1.2 h at 25 μ M (**Figure 2.2B**). In sharp contrast, the analogs L12A and F15A displayed a delayed lag time of respectively 13.5 ± 4.1 h and 14.2 ± 2.2 h, indicative of a key contribution of Leu12 and Phe15 in primary nucleation. At 12.5 μ M concentration, no increase of ThT fluorescence signal could be detected for these two analogs. All alanine substitutions reduced considerably the final ThT fluorescence (**Figure 2.2C**), suggesting either a reduction of the number of amyloids and/or a decrease of consecutive β -strands in the cross- β -sheet quaternary motif (Biancalana et Koide, 2010; Xue *et al.*, 2017).

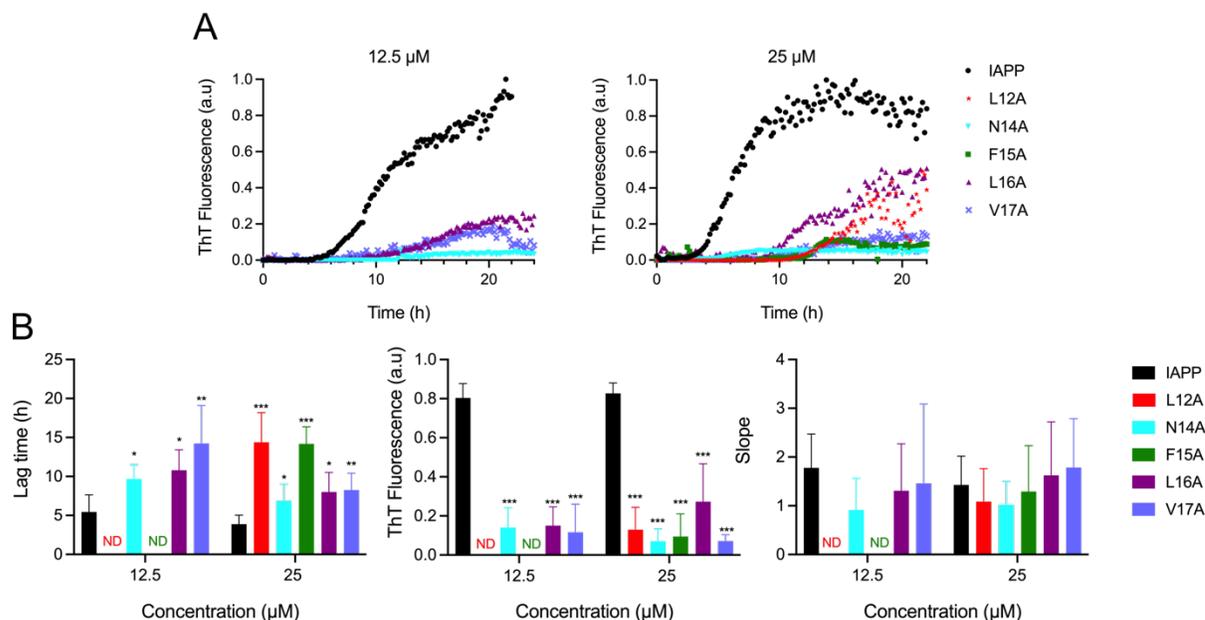


Figure 2.2. Effects of Ala substitution within the 12-17 domain on the kinetics of IAPP self-assembly. (A) Representative kinetics of amyloid formation monitored by ThT fluorescence at a concentration of 12.5 and 25 μM . IAPP and its derivatives were incubated in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, and fluorescence was measured every 10 min. Data obtained from triplicate wells were averaged, corrected by subtracting the vehicle control, and plotted as ThT fluorescence vs time (B) Parameters extracted from ThT kinetics traces. Data represent mean \pm S.E.M. of a least 6 experiments performed in triplicate and significant difference between IAPP, and analogs was established at (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.005$; (***) $p < 0.0005$.

Taking into account that the frequent displacements of the microplate within the fluorimeter induce considerable agitation, which is known to promote amyloid formation through primary (mass transport) and secondary (fibril fragmentation) nucleation (Grigolato *et al.*, 2017; Sebastiao *et al.*, 2017), amyloid formation was evaluated under fully quiescent conditions. IAPP and Ala-substituted analogs were incubated at 50 μM in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 in microcentrifuge tubes and the aggregation mixtures were periodically evaluated by far-UV CD spectroscopy, ThT and ANS fluorescence, and TEM. Under these conditions, unmodified IAPP shifted

from a random coil (minimum around 200 nm) to a β -sheet secondary conformation (minimum at 218 nm) after 24 h of incubation, which was associated with an increase of ThT and ANS fluorescence, and the formation of prototypical fibrils (**Figure 2.3**). In sharp contrast, the L12A derivative remained mainly under a random coil structure after a week of incubation, which was associated with an absence of a ThT-signal and low ANS fluorescence. Surprisingly, long, and twisted fibrils were observed by TEM after 48 h incubation (**Figure 2.3D**), indicating that the Leu \rightarrow Ala substitution at position 12 induces the formation of assemblies characterized with a poorly defined cross- β quaternary organization. The N14A modification induced the appearance of CD spectra characteristic of a helical-like conformation with two minima at 206 and 222 nm between 2 to 24 h incubation, which shifted towards β -sheet after 48 h. TEM analysis revealed a dense network of very thin fibrils after 48 h incubation, which was associated with low ThT fluorescence and high ANS signal (**Figure 2.3**). Asn14 is the only H-bond donor/acceptor residue within the 12-17 domain, and removal of Asn amide side chain could interfere with the protofilament interactions necessary for fibril packaging. It was previously reported that the substitution of Asn14 by Ala inhibits IAPP self-assembly (Koo *et al.*, 2008), although this earlier study was performed using the N-truncated IAPP₈₋₃₇ and under different experimental conditions. Replacement of Phe15 by an alanine delayed the appearance of ThT and ANS-positive signal, and β -sheet-rich assemblies. In fact, no fibrillar aggregates could be observed by TEM after 48 h incubation, underlining the importance of this hydrophobic side chain in amyloid formation. Nonetheless, after prolonged incubation time, *i.e.* 168 h, amyloid fibrils could be observed by TEM for the F15A derivative (**Figure 2.S3**). The precise contribution of Phe15 in IAPP amyloidogenesis remains somewhat ambiguous. While the replacement of Phe15 by Ala, or Ser, accelerated the aggregation of the IAPP₈₋₃₇ fragment (Wiltzius *et al.*, 2009), the F15A substitution within full-length IAPP abrogated its self-assembly (Bakou *et al.*, 2017), as observed herein, highlighting the importance of conducting such studies with the entire peptide. Moreover, substituting

Phe15 by the non-aromatic hydrophobic residue Leu, was shown to accelerate amyloid formation of full-length IAPP under conditions closely related to those used in the present study (Tu et Raleigh, 2013a), suggesting the importance of hydrophobicity within this segment. As observed for unmodified IAPP, a random coil-to- β -sheet conformational conversion was observed after 24 h incubation for L16A derivative, which was associated with a ThT-positive signal and the presence of fibrils. This result is somewhat contradictory with a previous study showing that the L16A substitution reduces substantially IAPP amyloid process, albeit this result was obtained in the presence of 2% HFIP, which is known to markedly alter IAPP self-recognition (Bakou *et al.*, 2017). Finally, substituting Val17 by Ala delayed the conformational transition and led to the formation of short and poorly defined fibrils with low ThT and ANS binding properties (**Figure 2.3**). Overall, as observed with the ThT-based kinetics assay, the hydrophobic side chains of residues Leu12, Phe15 and Val17 are important for the formation of β -sheet-rich fibrillar assemblies.

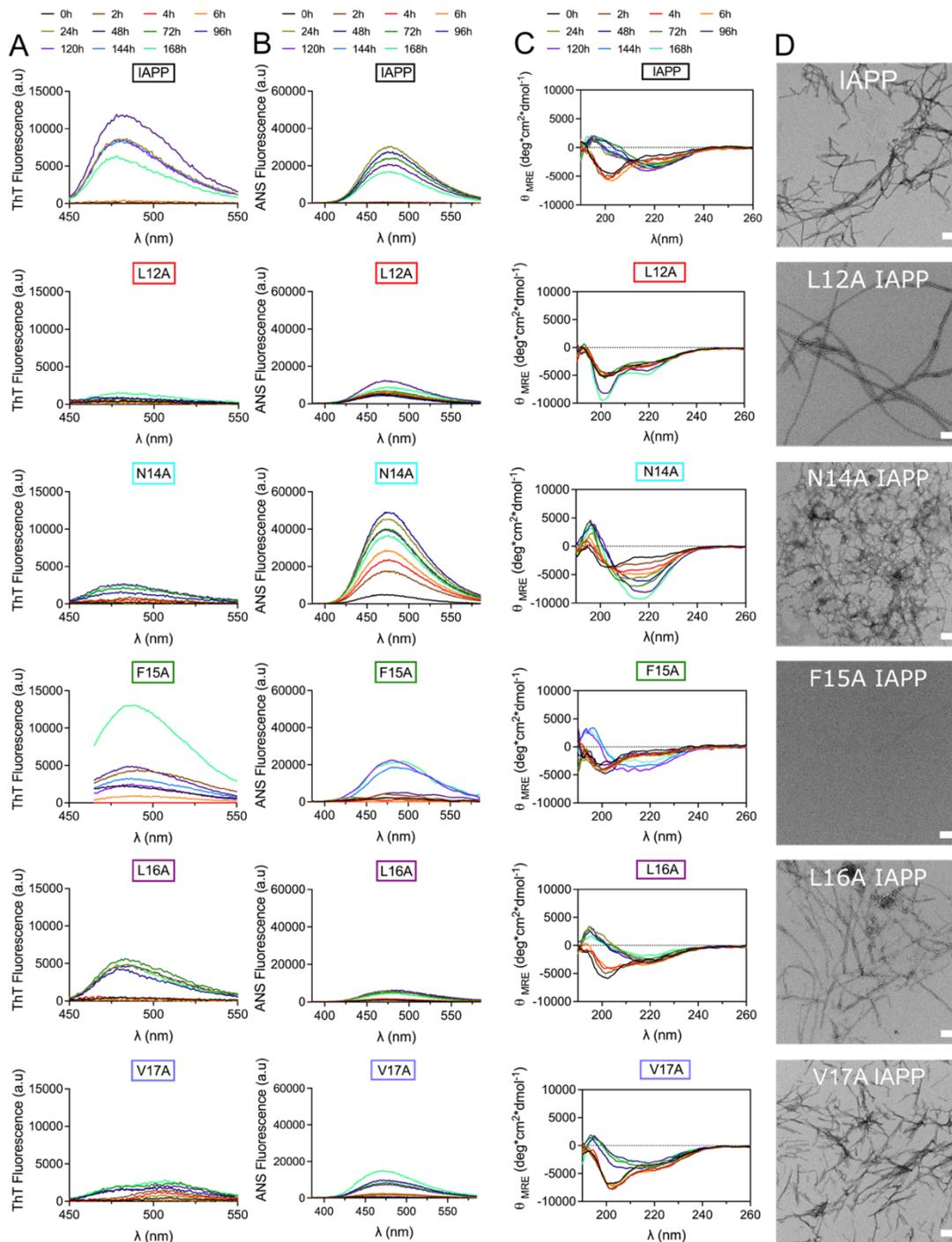


Figure 2.3. Effect of Ala-substitution within the 12-17 segment of IAPP on amyloid formation. (A-D) Peptides were incubated at 50 μ M under quiescent conditions in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, and periodically analysed by (A) ThT fluorescence, (B) ANS fluorescence, (C) CD spectroscopy, and (D) TEM. (D) Scale bar: 100 nm.

2.5.3 Residue Side Chains of IAPP 12-17 Segment Modulate Lipid Membrane Perturbation and Contribute to Cytotoxicity

Considering that the side chains of the 12-17 region are actively participating in IAPP amyloid formation, the impact of the X-to-Ala substitution on membrane perturbation and cytotoxicity was investigated. Whereas multiple studies have indicated that prefibrillar oligomers are the most toxic proteospecies of the amyloidogenic cascade (Abedini *et al.*, 2016; Raleigh *et al.*, 2017), the underlying mechanisms are still the matter of active debates. Among these cellular mechanisms, which include apoptosis, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress (Cadavez *et al.*, 2014; Gurlo *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009; Magzoub et Miranker, 2012; Park *et al.*, 2014), the perturbation of the plasma membrane remains one of the most studied hypotheses of IAPP-mediated cell death (Brender *et al.*, 2012). Perturbation of cell membrane lipid bilayer by the oligomers, and/or the process of amyloid formation, has been associated with pore-like formation and carpet-like mechanisms. The ability of the Ala-substituted derivatives to induce leakage of lipid bilayer was evaluated using synthetic anionic LUVs composed of DOPC and DOPG at molar ratio of 9:1 (DOPC:DOPG). This molar ratio between zwitterionic (DOPC) and anionic (DOPG) lipids is within the range of what has been reported for the composition of the β -pancreatic cell membrane, which is composed between 2.5 to 13 mol % anionic lipids (Sasahara, 2018). LUVs loaded with calcein were incubated in the presence of 25 μ M peptides and the fluorescence was measured every 10 min. For unmodified IAPP, an increase of fluorescence associated with calcein release was observed after 5 h incubation and a fluorescence of 17% of that obtained in presence of Triton X-100 was reached after 10 h (**Figure 2.4A, 2.4B**). Interestingly, successive substitution of Asn14, Phe15 and Val17 by Ala increased the capacity of IAPP to perturb anionic LUVs, with maximum fluorescence respectively reaching 50%, 55% and 34% (**Figure 2.4A, 2.4B**). The analogs L12A and L16A showed a similar capacity to cause calcein release from anionic LUVs, albeit the L16A substitution accelerated lipid bilayer damage. These

observations indicate that although the sequential replacement of residues Leu12, Phe15 and Val17 by Ala delays IAPP amyloid aggregation in homogeneous aqueous solution, these substitutions did not reduce the capacity of the peptide to permeabilize anionic LUVs.

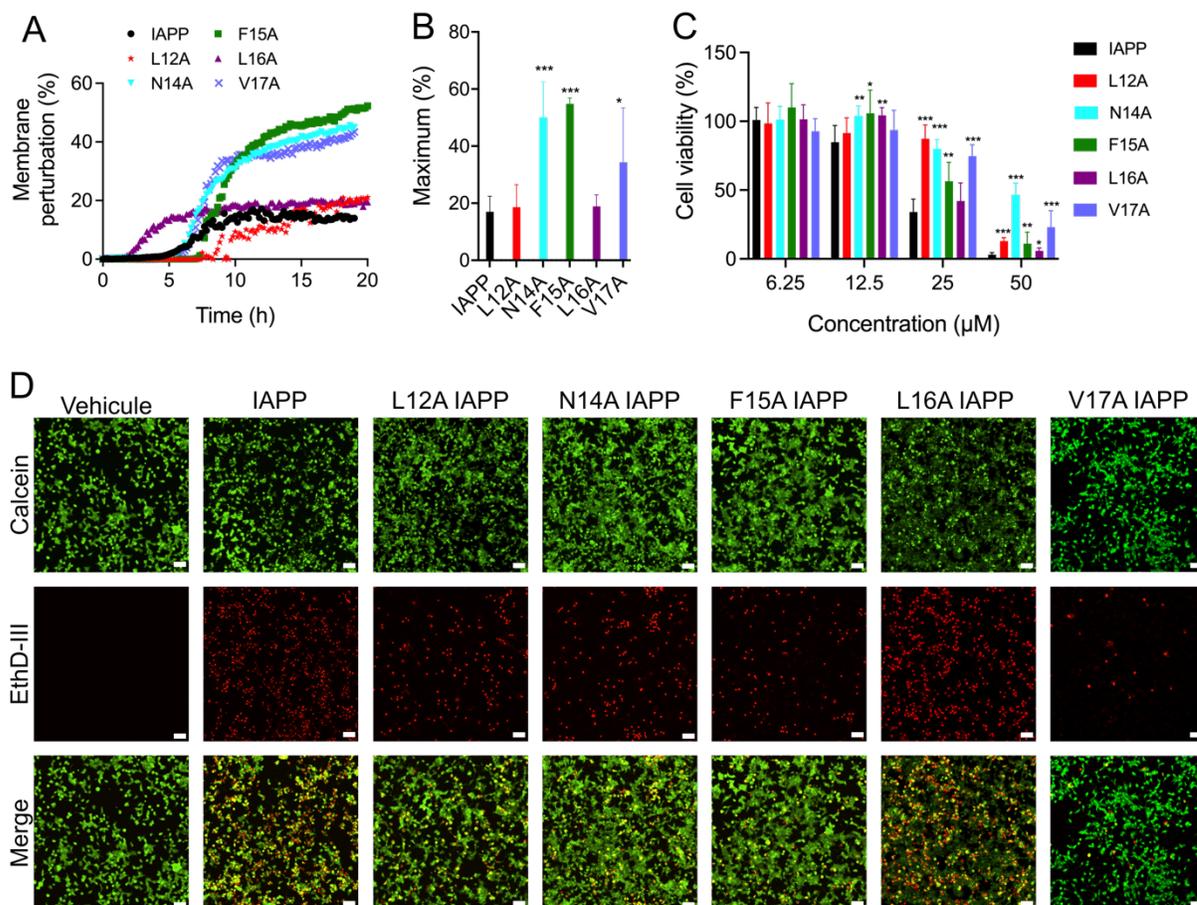


Figure 2.4. Lipid vesicle perturbation and cytotoxicity of Ala-substituted derivatives. (A) Kinetics of lipid membrane perturbation. 500 μM of calcein-loaded LUVs (DOPC:DOPG; 9:1) were exposed to 25 μM peptides in 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4, and fluorescence was measured every 10 min. (B) Maximum membrane perturbation of at least four assays (with different peptide lots). Data are expressed as the mean ± S.D. (C) INS-1E cells were treated with freshly dissolved peptides for 24 h and metabolic activity was measured by means of resazurin reduction. Data of at least five assays were averaged and expressed as the mean ± S.D. (D) Representative fluorescence microscopy images showing the distribution of live (green) and dead (red) INS-1E cells after treatment with 25 μM peptides for 24h. Scale bar: 50 μm. (B, C) Statistically significant difference (between IAPP and analogs) was established at (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.005$; (***) $p < 0.0005$.

As LUVs do not recapitulate the complexity of cell plasma membrane (Quittot *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2017b), and that numerous mechanisms are implicated in IAPP cytotoxicity, we evaluated the capacity of Ala-substituted analogs to affect the viability of the pancreatic-derived cell line INS-1E. Cells were treated with freshly dissolved peptides, perhaps monomeric, and incubated for 24 h before measuring viability with resazurin reduction. IAPP induced a concentration-dependent decrease of metabolic activity, with less than 10% of viability observed at 50 μM (**Figure 2.4C**). While the L16A derivative showed a comparable cytotoxicity to the unmodified peptide, successive replacement of Leu12, Asn14, Phe15 and Val17 reduced IAPP toxicity. Particularly, the amide side chain of Asn-14 appears to play a key role, with 50% of cellular viability measured at 50 μM . Results obtained with resazurin reduction, which is mainly associated with mitochondrial oxidoreductase activity (Magnani et Bettini, 2000), were validated using the LIVE-DEAD viability assay. As observed by fluorescence microscopy, 24 h treatment with 25 μM freshly solubilized IAPP induced a sharp increase in the number of red cells and a decrease of green cells (**Figure 2.4D**). The green fluorescence of calcein-AM is associated with intracellular esterase activity, while the red fluorescence of ethidium homodimer-III is linked to the loss of plasma membrane integrity. Concurring with the resazurin-based assay, the L12A, N14A, F15A and V17A analogs exhibited a decreased toxicity compared to unmodified IAPP, while the L16A peptide caused similar extent of cell death. These results indicate that side chains of the 12-17 domain are implicated in IAPP-mediated cytotoxicity towards pancreatic β -cells, with Leu16 playing a limited role. No correlation between the capacity of the peptides to permeabilize anionic LUVs with their toxicity was observed, highlighting that IAPP-mediated cell death is multifaceted.

2.5.4 Destabilizing the Local Conformation by Pro Incorporation Modulates IAPP Self-Assembly

Different structural models have been proposed regarding the intermediates populating the lag phase and/or initiating amyloid formation, including the β -hairpin model (Dupuis *et al.*, 2011b), the parallel β -sheet model (Buchanan *et al.*, 2013; Maj *et al.*, 2018), and the helical intermediate model (Abedini et Raleigh, 2009b; Hebda et Miranker, 2009). The latter advocates that IAPP self-recognition is thermodynamically linked with secondary helical transition within the 5-20 segment, as observed in coiled-coil motif formation, ultimately aligning the C-terminal region and triggering the formation of intermolecular β -sheets (Wiltzius *et al.*, 2009). Moreover, molecular dynamics simulations revealed that IAPP oligomerization is promoted by helix-helix dimer association involving hydrophobic side chains of the 12-17 region (Laghaei *et al.*, 2011). Accordingly, the potential roles of helical intermediates in IAPP amyloid formation were probed by incorporating residues within the core of the 12-17 segment, *i.e.* at positions 13 to 16, to modulate the local secondary conformational ensemble and/or backbone flexibility, such as Pro, Gly and Aib. First, residues Ala13 to Leu16 were successively substituted by Pro, which is well known to destabilize helical folding (Li *et al.*, 1996) and to inhibit amyloid formation (Moriarty et Raleigh, 1999) owing to its pyrrolidine ring and conformational rigidity. Titration with TFE, a helical-inducing solvent, evaluated by far-UV CD spectroscopy confirmed that consecutive proline incorporation destabilizes IAPP helical folding (**Figure 2.5A, 2.5B**). Next, Pro-substituted peptides were incubated at 50 μ M under fully quiescent conditions and the mixtures were periodically evaluated for amyloid formation. Interestingly, substitution of Ala13 by Pro accelerated amyloid formation, as observed with the random coil \rightarrow β -sheet transition detected after 4 h and with the ThT and ANS positive signal arising after 6 h incubation (**Figure 2.5C, 2.5D, 2.5E**). Prototypical fibrils were observed by TEM, albeit some amorphous aggregates were also detected (**Figure 2.5F**). In comparison to their Ala-substituted counterpart, incorporation of Pro at position Asn14

and Phe15 accelerated IAPP conformational transition. For instance, N14P showed a β -sheet CD signal associated with ThT and ANS fluorescence after 24 h incubation (**Figure 2.5**), whereas N14A needed 48 h to perform this conformational transition (**Figure 2.3**). In fact, AFM images revealed a dense network of fibrils for the N14P peptide after 24 h incubation, while only poorly defined fibrils were observed for the analog N14A (**Figure 2.S4**). Similarly, F15P derivative formed typical fibrils after 96 h incubation, whereas only small aggregates were observed for the F15A analog (**Figure 2.S5**), in agreement with ThT and ANS fluorescence and CD analysis (**Figure 2.5**). These findings regarding analogs A13P, N14P and F15P are intriguing since the incorporation of a Pro residue constitutes a well-known strategy to inhibit amyloid aggregation (Abedini *et al.*, 2007; Abedini et Raleigh, 2006; Kraus, 2016; Ridgway *et al.*, 2020). In sharp contrast, substitution of Leu16 by Pro completely inhibited amyloid formation, as noticed with the absence of a ThT and ANS signal and the random coil conformation observed after 7 days incubation. The inhibitory effect of the L16P substitution is not associated with the absence of the hydrophobic alkane side chain, as L16A showed similar self-assembly propensity to IAPP (**Figure 2.3**), indicating that the conformational rigidity imposed by the pyrrolidine loop is likely the cause. This result concurs with a previous study showing that the H18P substitution into full-length IAPP prevents amyloid formation (Akter *et al.*, 2018). Overall, destabilizing the α -helix by successively incorporating a Pro residue at positions Ala13 to Phe15 accelerates, in comparison to Ala-modified counterparts, the process of self-assembly, whereas the opposite effect was observed at position Leu16. Thus, the effect of X-to-Pro substitution on IAPP self-assembly is site-specific, precluding extrapolation on the hypothesis that α -helical intermediates are on- or off-pathway to amyloid formation (De Carufel *et al.*, 2015).

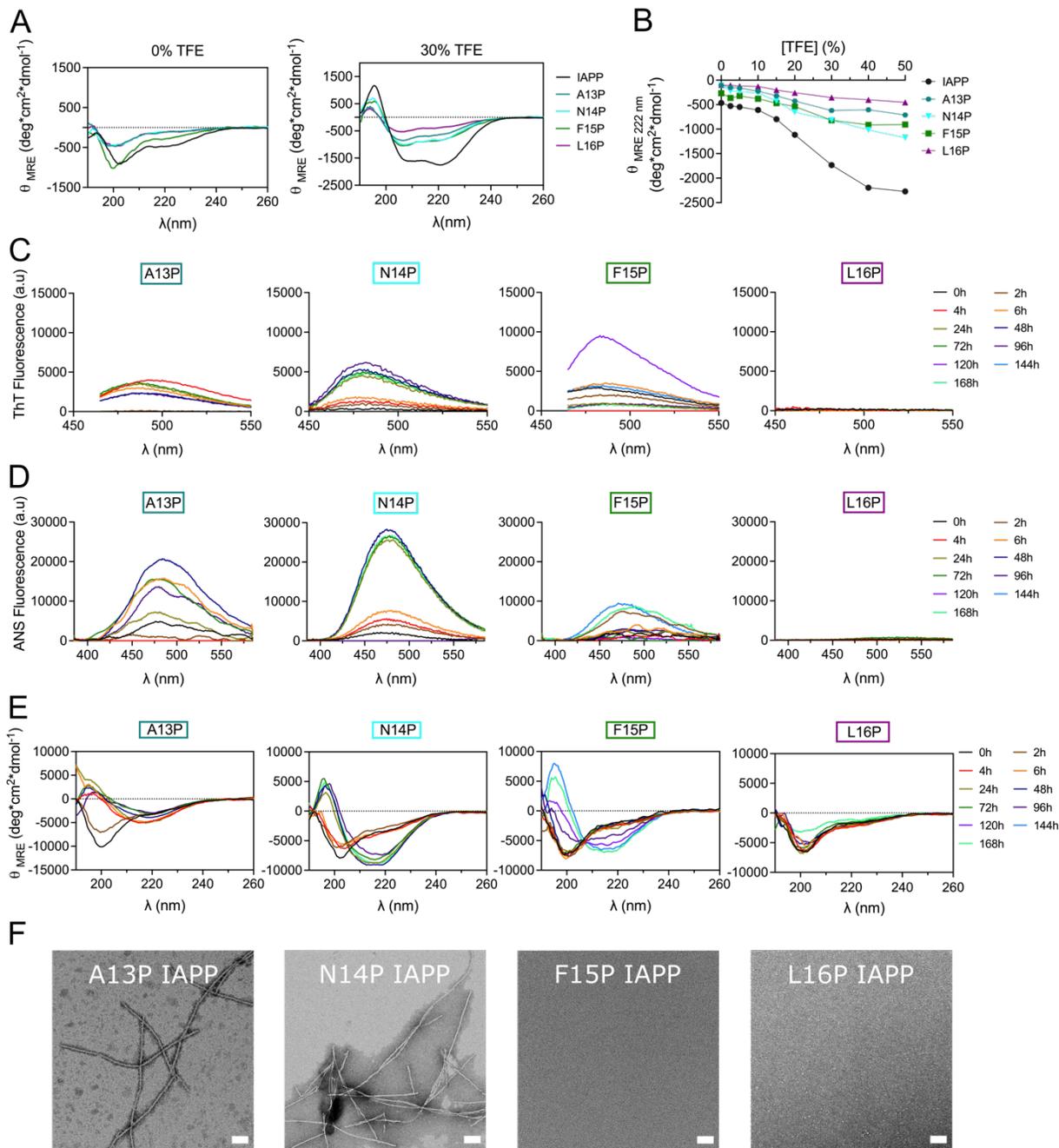


Figure 2.5. Effects of Pro substitution within the 13-16 segment of IAPP on amyloid self-assembly. (A) Far-UV CD spectra of peptides in Tris-HCl 20 mM in presence, or absence, of 30% TFE. (B) Effect of TFE on peptide ellipticity measured at 222 nm. (C-E) Peptides were incubated under quiescent conditions in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a concentration of 50 μM before being diluted at 25 μM for (C) ThT fluorescence,

(D) ANS fluorescence and (E) CD analysis. (F) TEM images obtained after for 48 h incubation. Scale bar: 100 nm.

2.5.5 Glycine Substitution within the 13-16 Segment Site-Specifically Affects IAPP Self-Assembly

Glycine residue, bearing a single hydrogen atom as side chain, was successively introduced into the core of the 12-17 domain to further probe the effect of helical conformation destabilization on amyloid formation. In contrast to Pro, which increases local conformational rigidity, Gly augments peptide backbone flexibility (Nick Pace et Martin Scholtz, 1998). As revealed by TFE titration, consecutive incorporation of Gly at positions Asn14, Phe15 and Leu16 destabilize the propensity of IAPP to adopt an α -helix, whereas the A13G analog showed similar propensity to helical folding to the unmodified peptide (**Figure 2.6A, 2.6B**). These observations concur with the fact that glycine can act as a «helix breaker» or a «helix inductor», depending on the external environment and the local sequence (Li et Deber, 1992). Monomerized Gly-substituted derivatives were solubilized in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, and incubated at room temperature without agitation at a concentration of 50 μ M. CD spectroscopy revealed that the A13G analog was subjected to a conformational transition within 6 h incubation, which was associated with an increase of ThT and ANS fluorescence (**Figure 2.6**), suggesting that the substitution of Ala13 by a Gly accelerates IAPP amyloid self-assembly. TEM images of A13G confirmed the presence of fibrillar aggregates (**Figure 2.6F**). Substitution of Asn14 by Gly delayed the random coil-to- β -sheet shift and the increase of ThT and ANS fluorescence, in comparison to both the unmodified and N14A IAPP. Moreover, N14G fibrils obtained after 48 h incubation were short, less defined, and twisted (**Figure 2.6F**) compared to the Ala-substituted counterpart. Incorporation of a Gly at positions Phe15 and Leu16 slow down IAPP amyloid formation, as observed by CD spectroscopy, ThT and ANS fluorescence and TEM imaging (**Figure 2.6**). Oligomer-like structures were observed by TEM after 48

h incubation of the L16G derivative, whereas no aggregates could be detected for F15G after 48 h. Nonetheless, amyloid fibrils were observed by TEM after 7 days incubation (**Figure 2.S7**). These observations highlight inequivalence in site-specific Gly substitution, as the Asian mutation S20G is known to enhance amyloid formation (Cao *et al.*, 2012; Sakagashira *et al.*, 2000). Overall, increasing the peptide backbone flexibility within the 13-16 segment promotes self-assembly when Gly is introduced at position Ala13, while it inhibits amyloid formation when Gly is successively incorporated at positions 15 and 16.

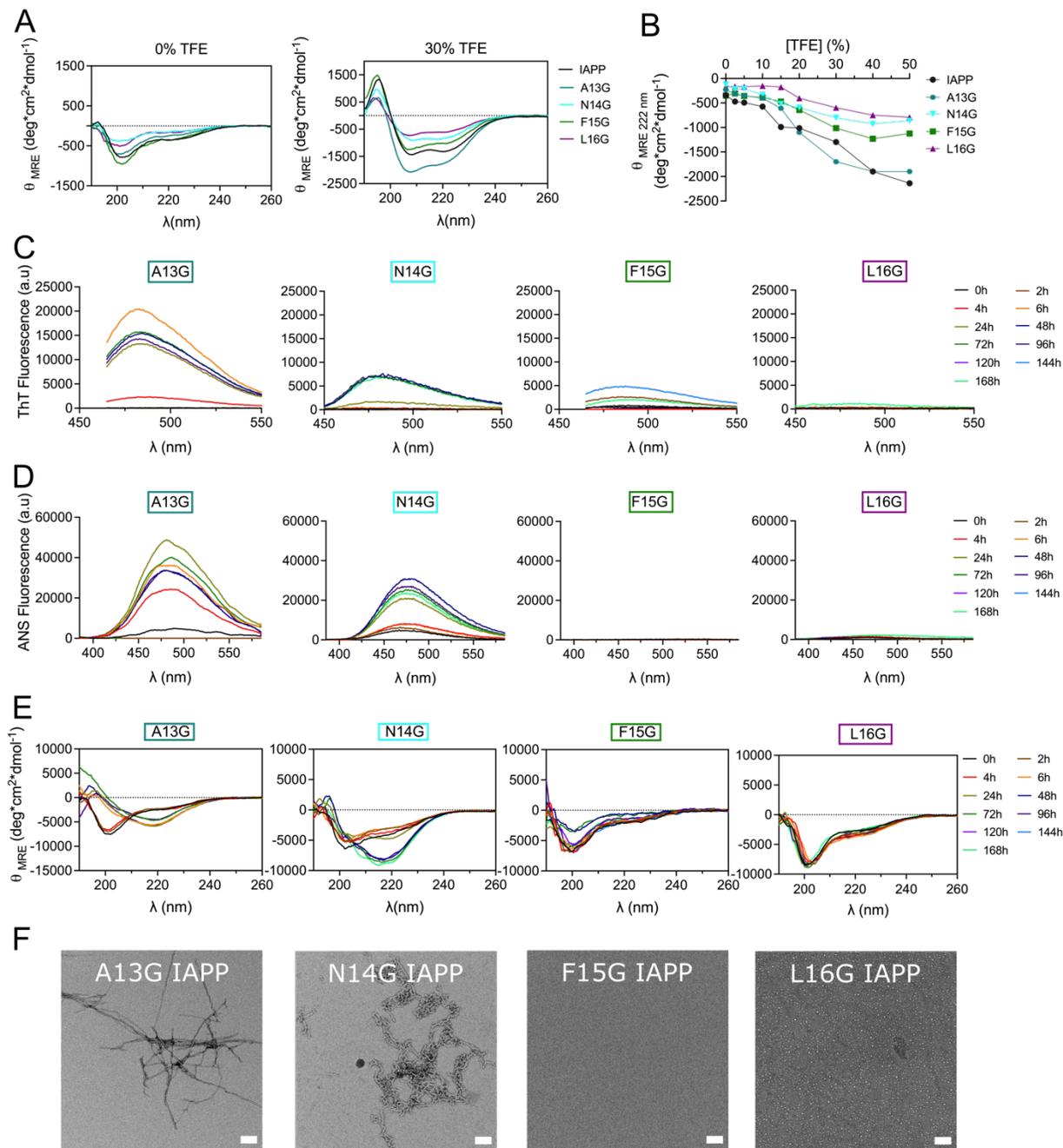


Figure 2.6. Effects of Gly substitution within the 13-16 segment on IAPP amyloid self-assembly. (A) Far-UV CD spectra of IAPP and Gly-substituted analogs in Tris-HCl 20 mM in presence, or absence, of 30% TFE. (B) Effect of TFE on the mean residue ellipticity measured at 222 nm. (C-E) Peptides were incubated under quiescent conditions in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a concentration of 50 μM before (C)

ThT fluorescence, (D) ANS fluorescence and (E) CD analysis. (F) TEM images obtained after for 48 h incubation. Scale bar: 100 nm.

2.5.6 Successive Incorporation of α -Methylalanine at Positions Phe15 and Leu16 Inhibits IAPP Amyloid Formation

The aminoisobutyric acid (Aib), which corresponds to an additional methyl group on the α -carbon of alanine (α -methylalanine) was successively introduced within the 13-16 segment to affect the local secondary conformation. Aib is known to promote helical folding through the Thorpe-Ingold effect (Karle, 2001; Toniolo *et al.*, 2001). However, no clear effect on the secondary structure of IAPP in aqueous buffer could be observed upon Aib substitution (**Figure 2.7A**) and Aib-based analogs displayed similar TFE titration curve (**Figure 2.7B**). Interestingly, α -methylation of Ala13 led to the formation of well-defined ThT-positive fibrils upon 48 h incubation, which were associated with a CD spectrum characterized by a mixture of α -helix and β -sheet (**Figure 2.7**). This CD spectrum evolved into a typical β -sheet-rich CD signal after 7 days (**Figure 2.7E**). In contrast, replacement of Asn14 by an Aib delayed dramatically amyloid formation, with the quasi absence of ThT signal, the appearance of a β -sheet CD signal after 72 h and no visible fibrils observable by TEM. Considering that the N14A analog readily assembled into fibrillar aggregates (**Figure 2.3**), the low amyloidogenicity of the N14Aib derivative is not associated with the removal of the amide side chain, but likely resides in the steric hindrance on the backbone caused by the α -methylation. The F15Aib analog remained in a random coil conformation after 7 days, with low ThT fluorescence, indicative of a complete inhibition of fibrillization, as confirmed by TEM (**Figure 2.7, Figure 2.S8**). Similarly, substitution of Leu16 by an Aib severely delayed the conformational transition, with the presence of a CD signal with two minima at 208 and 222 nm after 7 days incubation. Interestingly, this emergence of a helical CD spectrum correlates with an increase of ThT and ANS fluorescence. Small dot-like nanostructures, closely related to oligomers, were

observed for L16Aib by TEM after 48 h incubation. Considering that the L16A peptide readily forms amyloid fibrils (**Figure 2.3**), these results indicate that the decrease of amyloidogenicity caused by the Leu-to-Aib replacement is not merely associated with the loss of the hydrophobic alkane chain. Overall, backbone α -methylation reveals that position 13 tolerates the imposed steric hindrance, whereas incorporation of Aib at positions 15 and 16 inhibits amyloid formation. This observation suggests that the site-specific incorporation of Aib could be a strategy to inhibit amyloid aggregation of IAPP peptide drugs.

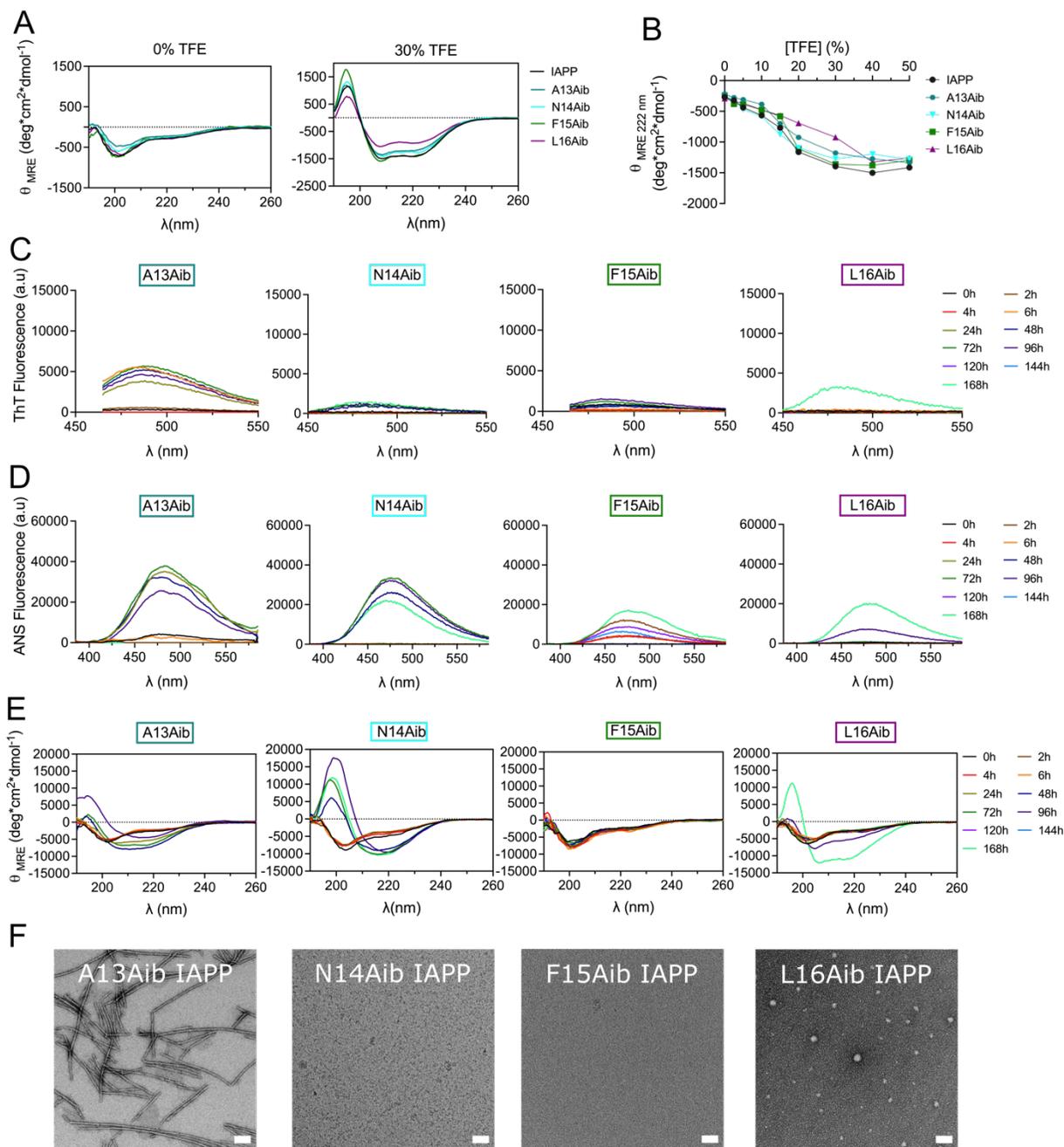


Figure 2.7. Effects of backbone α -methylation within the 13-16 segment on IAPP amyloid self-assembly. (A) Far-UV CD spectra of peptides in Tris-HCl 20 mM in presence, or absence, of 30% TFE. (B) Effect of TFE on the mean residue ellipticity measured at 222 nm. (C-E) Peptides were incubated under quiescent conditions in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a concentration of 50 μ M before being diluted at 25 μ M

for (C) ThT fluorescence, (D) ANS fluorescence and (E) CD analysis. (F) TEM images obtained after for 48 h incubation. Scale bar: 100 nm.

2.5.7. Modulating the Conformation of the Ala13-Leu16 Segment Alters IAPP Cytotoxicity

After observing that residues modulating the local secondary structure and/or the backbone conformational flexibility influence IAPP amyloidogenicity, the impact of these substitutions on cytotoxicity was evaluated. Pancreatic INS-1E cells were treated with freshly solubilized peptides and incubated for 24 h before measurement of metabolic activity by resazurin reduction. Whereas substitution of Ala13 by Pro increased the cytotoxicity of IAPP at 12.5 and 25 μM , the L16P derivative was found to be less cytotoxic than unmodified IAPP, particularly at 25 and 50 μM (**Figure 2.8A**). N14P and F15P showed similar concentration-dependent toxicity to unmodified IAPP. As observed for A13P, A13G showed a higher cytotoxicity compared to unmodified IAPP (**Figure 2.8B**), suggesting that the destabilization of α -helix conformation within this segment promotes the formation of toxic intermediates. Oppositely, consecutive incorporation of a Gly at positions Asn14, Phe15 and Leu16 significantly reduced IAPP cytotoxicity. Particularly, the N14G peptide was poorly toxic for pancreatic cells, even at 50 μM , although this analog was prone to amyloid aggregation (**Figure 2.6**). This observation indicates that not all oligomers are cytotoxic, as shown with rIAPP (Abedini *et al.*, 2016), and that specific quaternary structural motifs modulate toxicity (Godin *et al.*, 2019). Effect of Aib substitution on toxicity was site-specific, with Ala13Aib derivative showing similar toxicity to the unmodified IAPP and analogs N14Aib, F15Aib and L16Aib being poorly cytotoxic (**Figure 2.8C**). Notably, F15Aib and L16Aib analogs, which were incompetent to assemble into amyloid aggregates (**Figure 2.7**), were not toxic at the highest concentration, indicative of some correlation between amyloidogenicity and toxicity. Considering the toxicity of IAPP and Ala-modified analogs (**Figure 2.4**), these results indicate that the cytotoxic effect tolerates alterations of backbone flexibility at position 13, whereas destabilization of local

secondary structure and/or modulation of backbone conformational restriction at position Leu16 impedes the formation of toxic proteospecies.

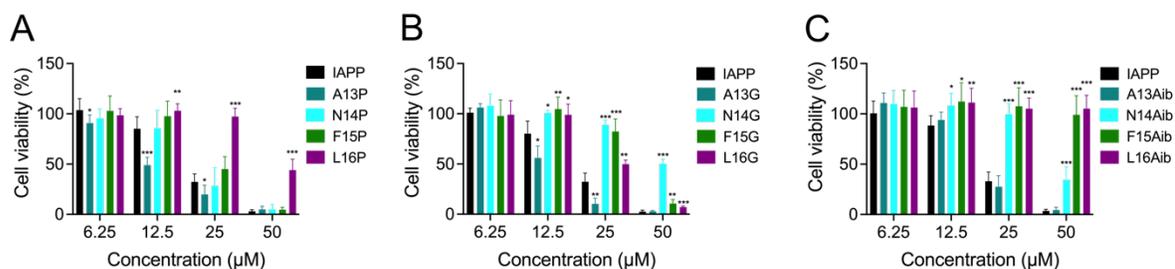


Figure 2.8. Cytotoxicity of Pro, Gly and Aib substituted IAPP. (A,B,C) INS-1E cells were treated with increasing of concentration of freshly dissolved peptides for 24h. Cell viability was measured using the resazurin reduction assay and compared with cells treated with vehicle. Data of at least five assays were averaged and expressed as the mean \pm S.D. Results were analyzed using Student's t test, and statistically significant difference between IAPP and analogs was established at: (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.005$; (***) $p < 0.0005$.

2.6 Conclusions

Overall, the present investigation underlines the importance of IAPP 12-17 central region for amyloid aggregation and associated cell toxicity, a segment which has been historically unrecognized in comparison to the 20-29 domain. Ala scanning revealed that the hydrophobic side chains of Leu12, Phe15 and Val17 are particularly important to drive the self-assembly process. While the amide side chain of Asn14 is not critical for IAPP amyloidogenicity, it is contributing to the cytotoxic potential of the peptide. Interestingly, the destabilization of the α -helix secondary structure by Pro substitution hastened amyloid formation when the pyrrolidine ring was introduced at positions Ala13, Asn14 and Phe15, in comparison to their respective Ala-substituted counterparts, suggesting that the α -helix do not constitute an obligatory *on-pathway* quaternary intermediate. In sharp contrast, modulating the peptide backbone flexibility at position Leu16 inhibited IAPP amyloid formation and reduced its cytotoxicity, while

the Leu16 isobutyl chain is not critical for self-assembly and β -cell toxicity. In fact, incorporation of a methyl group on the α -carbon of Phe15 and Leu16, *i.e.* F15Aib and L16Aib, abrogated IAPP fibrillization and toxicity, suggesting that Aib incorporation constitutes a promising strategy to convert IAPP from highly aggregation prone peptides to a non-amyloidogenic peptide. It will now be interesting to evaluate if the F15Aib and L16Aib derivatives can activate the AMY receptors and to test their ability to inhibit amyloid formation of unmodified IAPP.

2.7 Supporting information

Table 2.S1. Mass spectrometry analysis of peptides

Peptide	Theoretical molecular weight*	Experimental molecular weight
IAPP	3903.28	3904.2
IAPP₁₂₋₁₇	674.83	674.41
L12A	3861.20	3860.82
N14A	3860.26	3859.88
F15A	3827.19	3826.84
L16A	3861.20	3860.82
V17A	3875.23	3875.25
A13P	3929.32	3928.95
N14P	3886.29	3885.88
F15P	3853.22	3852.88
L16P	3887.24	3886.84
A13G	3889.26	3888.85
N14G	3846.23	3845.88
F15G	3813.16	3812.82
L16G	3847.18	3844.79
A13Aib	3917.40	3916.88
N14Aib	3874.28	3873.90
F15Aib	3841.21	3840.85
L16Aib	3875.23	3874.84

**Theoretical molecular weight were obtained with the peptide property calculator (INNOVAGEN, <https://pepcalc.com/>). Peptides are amidated at their C-terminus and cysteines 2 and 7 form a disulfide bond.*

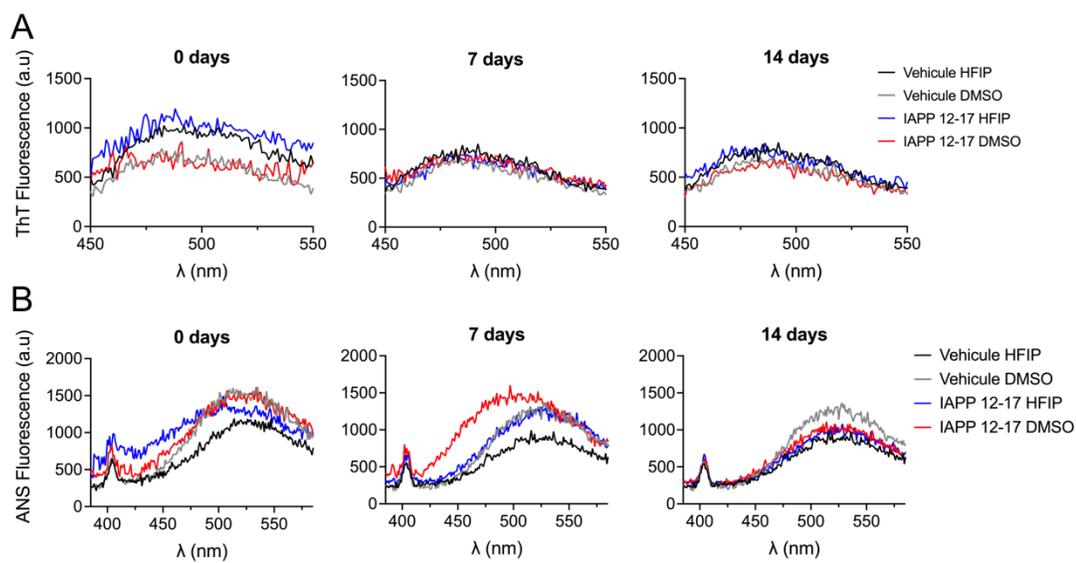


Figure 2.S1. ThT and ANS fluorescence of IAPP₁₂₋₁₇. At the indicating incubation time, IAPP₁₂₋₁₇ was diluted to 25 μ M in presence of 40 μ M ThT, or 25 μ M ANS. (A) ThT emission scan after excitation at 440 nm. (B) ANS emission scan after excitation at 355 nm.

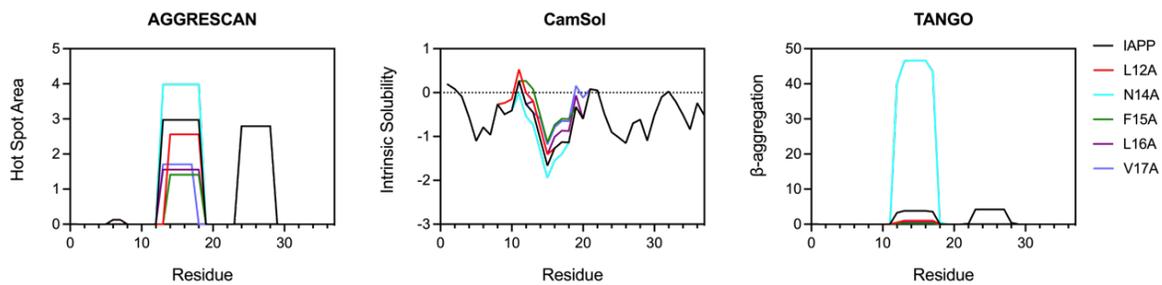


Figure 2.S2. *In silico* analysis of alanine substitution within the 12-17 domain. Analysis was performed with AGGRESCAN, CamSol and TANGO. Predictions were carried out at pH 7.4 and for C-amidated, if possible.

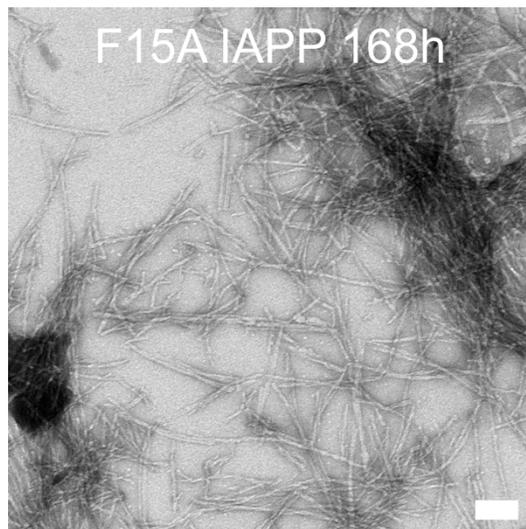


Figure 2.S3. TEM image of F15A IAPP after 168h incubation. Peptide was dissolved at 50 μ M in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 and incubated at room temperature without agitation for 168 h before TEM analysis. Scale bar: 100 nm.

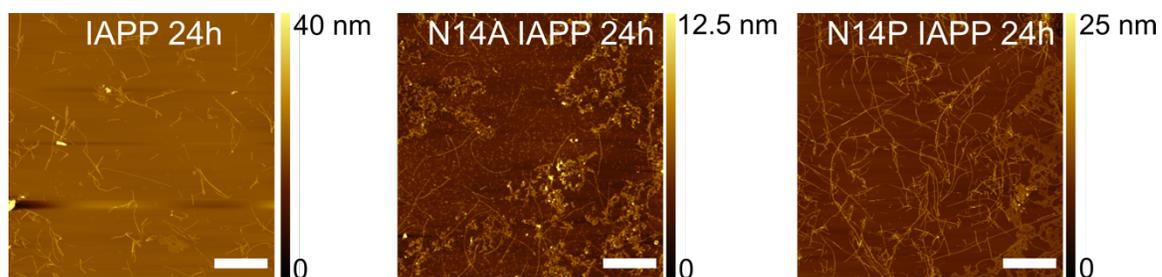


Figure 2.S4. Effect of substitutions at position Asn14 on amyloid formation. Peptides were dissolved at 50 μM in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 and incubated at room temperature without agitation for 24 h. Analogs were diluted in 1% acetic acid before being applied application on freshly cleaved micas. Scale bar: 2 μm .

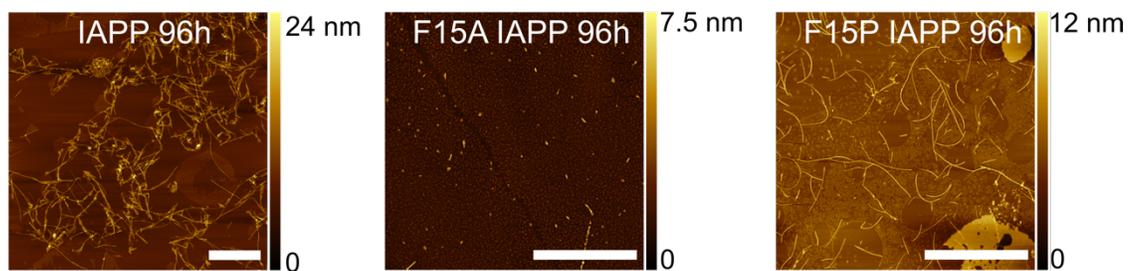


Figure 2.S5. Effect of substitutions at position Phe15 on amyloid formation. Peptides were dissolved at 50 μM in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 and incubated at room temperature without agitation for 96 h. Analogs were diluted in 1% acetic acid before being applied on freshly cleaved micas. Scale bar: 2 μm .

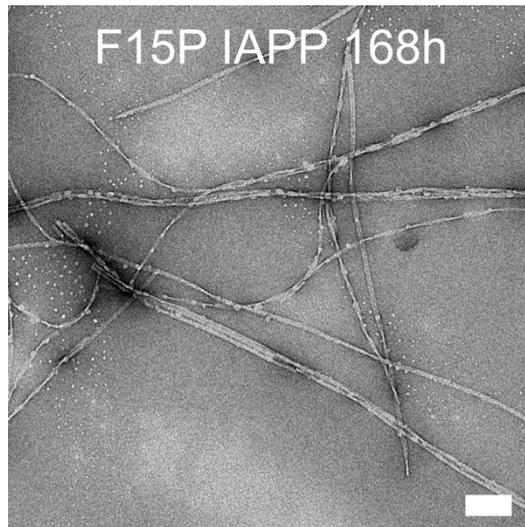


Figure 2.S6. TEM image of F15P IAPP after 168h incubation. Peptide was dissolved at 50 μ M in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 and incubated at room temperature without agitation for 168 h before TEM analysis. Scale bar: 100 nm.

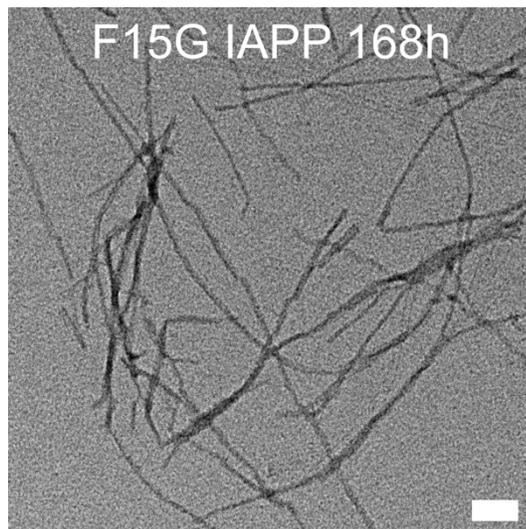


Figure 2.S7. TEM image of F15G IAPP after 168h incubation. Peptide was dissolved at 50 μ M in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 and incubated at room temperature without agitation for 168 h before TEM analysis. Scale bar: 100 nm.

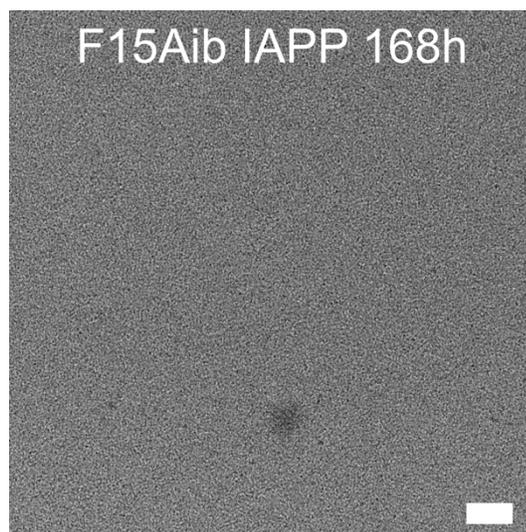


Figure 2.S8. TEM image of F15Aib IAPP after 168h incubation. Peptide was dissolved at 50 μM in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 and incubated at room temperature without agitation for 168 h before TEM analysis. Scale bar: 100 nm.

CHAPITRE III

DISCUSSION

L'IAPP s'auto-assemble en fibres amyloïdes selon un processus de polymérisation nucléée comportant trois phases distinctes: (i) la nucléation, (ii) l'élongation et (iii) la saturation (Abedini *et al.*, 2016). Il s'agit d'un processus complexe faisant intervenir plusieurs domaines et résidus clés, en plus de multiples facteurs extrinsèques. Depuis 1988, de nombreuses études ont été réalisées sur la contribution mécanistique du domaine Ser20-Ser29 pour le processus d'auto-reconnaissance moléculaire (Azriel et Gazit, 2001; Buchanan *et al.*, 2013; Glenner *et al.*, 1988; Goldsbury *et al.*, 2000; Kapurniotu, 2001; Wang *et al.*, 2014; Westermark *et al.*, 1990). Cela dit, il est fort probable que d'autres régions soient impliquées, tels les domaines Ala8-Ser20 (Jaikaran *et al.*, 2001), Leu12-Val17, Asn22-Leu27 et Asn31-Tyr37 (Kajava *et al.*, 2005). La région Leu12-Val17 a été le sujet de très peu d'études (Kajava *et al.*, 2005; Scrocchi *et al.*, 2003). En 2003, l'étude réalisée par Scrocchi et ses collaborateurs a révélé la capacité d'auto-assemblage amyloïde du fragment ¹²LANFLV¹⁷ de l'IAPP. Les auteurs ont aussi observé que ce fragment était en mesure d'agir comme *seeds*, des particules amyloïdes préformées qui peuvent agir comme élément accélérateur de l'amyloïdogénèse du peptide complet (Scrocchi *et al.*, 2003). Néanmoins, il est important de noter que la majorité des études de la contribution mécanistique des différents domaines ont été réalisées à l'aide de fragments de l'IAPP ou encore des dérivés de l'IAPP₈₋₃₇. Ainsi, il importe de réaliser une étude relation structure/auto-assemblage de la contribution du domaine Leu12-Val17 sur l'auto-assemblage amyloïde de l'IAPP afin de mieux définir les éléments dictant les mécanismes d'oligomérisation et de cytotoxicité.

3.1 Capacité du fragment LANFVL à former des fibres amyloïdes

Étant donné l'intérêt envers le domaine Ser20-Ser29 dans les études mécanistiques, la présente étude s'est plutôt penchée sur le domaine Leu12-Val17. La capacité du court peptide LANFVL, ayant une extrémité C-terminale amidée, à s'assembler en fibres amyloïdes a été initialement évaluée. Du fait que le court peptide affiche une très faible solubilité, ce dernier a d'abord été solubilisé dans un solvant organique (HFIP ou DMSO), avant d'être dilué à une concentration finale de solvant de 3% (vol / vol). Via l'analyse spectroscopique en UV-lointain par dichroïsme circulaire (figure 2.1C), il a été possible d'observer l'apparition d'une structure secondaire riche en feuillets- β après 7 jours d'incubation du fragment, suggérant l'assemblage de ce dernier. Les images de microscopie électronique des deux mélanges réactionnels ont confirmé la capacité du peptide LANFLV à former des agrégats fibrillaires (figure 2.1D, E). Toutefois, aucune augmentation de la fluorescence des sondes ThT et ANS n'a été observée (figure 2.S1). Cette incapacité du peptide à engendrer une réponse de la ThT résulte possiblement d'un ou d'une combinaison des éléments suivants :

(i) l'assemblage en fibres du fragment LANFLV ne se compose pas d'un empilage de 5 brins- β consécutif; cet empilage consécutif de 5 brins- β correspond au site minimal de liaison de la thioflavine T (Biancalana et Koide, 2010).

(ii) le peptide LANFLV comporte un seul résidu aromatique. Or, la présence d'une seule phénylalanine n'est peut-être pas suffisante pour générer un empilage π - π ou encore une surface hydrophobe assez grande pour la liaison de la ThT en comparaison avec l'IAPP de pleine longueur (Biancalana et Koide, 2010).

Ces éléments constituent une piste de réflexion, néanmoins d'autres mécanismes inconnus sont possiblement derrière l'inaptitude du court peptide à engendrer une augmentation de la fluorescence de la ThT.

Une comparaison avec la littérature a difficilement pu être réalisée. L'étude de Scrocchi (2003) à propos du fragment LANFLV n'a donné que très peu d'information sur les

conditions expérimentales, rendant sa reproduction quasiment impossible, outre l'utilisation d'un tampon acétate 20 mM pH 6.5. Malgré tout, les fibres LANFLV obtenues dans la présente étude affichent une certaine similarité morphologique à celles de Scrocchi, particulièrement en présence du solvant organique HFIP: un réseau de courts bâtonnets alignés de manière latérale a été obtenu (figure 2.1D) (Scrocchi *et al.*, 2003). En 2020, une autre étude a évalué la capacité d'auto-assemblage d'un fragment parent de l'IAPP: le court peptide ANFLV correspond aux positions 13 à 17. Ce dernier n'a pas été en mesure de former des fibres amyloïdes dans les conditions expérimentales de l'étude (Rozniakowski *et al.*, 2020). De même, cette incapacité d'auto-assemblage de ce fragment souligne l'important rôle du résidu Leu12 à l'obtention d'agrégats fibrillaires. La divergence de capacité de l'auto-assemblage des différents fragments LANFLV et ANFLV des différentes études est certainement associée au fait que l'auto-assemblage amyloïde est très sensible aux conditions expérimentales. En effet, ce processus est sensible aux forces ioniques, à la température, au pH, à la concentration du peptide (Khemtémourian *et al.*, 2011; Marek *et al.*, 2012), et à la présence de solvants organiques tels le DMSO et l'HFIP, reconnus pour promouvoir l'auto-assemblage amyloïde (Nichols *et al.*, 2005; Padrick et Miranker, 2002).

La présente étude comporte aussi certaines limitations. D'une part, les conditions expérimentales sont peu représentatives des conditions physiologiques. L'utilisation de solvant organique, l'agitation constante et la forte concentration de l'essai éloignent toute reproductibilité adéquate *in vivo* chez les organismes. D'autre part, la cytocompatibilité des fibres LANFLV n'a pas été évaluée *in vitro*. Bien que les espèces fibrillaires ne semblent pas être responsables *a priori* d'une perte de la viabilité cellulaire *in vitro*, ce ne sont pas tous les oligomères de l'IAPP qui sont toxiques (Abedini *et al.*, 2016), et le contraire peut être vrai concernant les fibres matures, comme démontré par les analogues N21F et N21Q une fois assemblés (Godin *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2021).

3.2 La substitution successive des résidus du domaine Leu12-Val17 par une alanine révèle le rôle crucial des chaînes latérales hydrophobes au sein du processus d'auto-assemblage de l'IAPP

La substitution successive par une alanine des résidus aux positions Leu12 à Val17, sauf en position Ala13, a été réalisée afin de mesurer la contribution de chaque chaîne latérale sur le processus d'auto-assemblage amyloïde au sein du peptide complet. L'impact de la substitution successive d'une alanine en position Leu12 à Val17 a été évalué par une combinaison d'approches biophysiques. L'ensemble des résultats obtenus révèle que les résidus ayant une hydrophobicité élevée, soit les résidus Leu12, Phe15 et Val17, jouent un rôle critique dans l'auto-assemblage de l'IAPP. Les résultats obtenus à partir des cinétiques en microplaque (figure 2.2) indiquent une contribution cruciale des résidus Leu12, Phe15 et Val17 pour les phases de nucléation et d'élongation; le temps de latence obtenu était particulièrement allongé chez ses analogues. Il importe de noter une réduction significative de l'intensité de la fluorescence de la ThT chez tous ses analogues, et ce peu importe la nature de l'acide aminé substitué (figure 2.2C). Cette diminution de fluorescence de la sonde est possiblement causée par une réduction de l'affinité de la ThT (Biancalana et Koide, 2010) ou encore du nombre de fibres (Xue *et al.*, 2017). Grâce aux essais sous conditions entièrement quiescentes, il a été possible d'approfondir l'importance des résidus hydrophobes Leu12, Phe15 et Val17 au sein de processus. En effet, ces résidus jouent un rôle primordial pour la nucléation primaire; les analogues L12A, F15A et V17A ont affiché une transition conformationnelle de la forme aléatoire vers une structure secondaire en feuillets- β retardée (figure 2.3). Cet essai en « tube » a permis d'enlever les composantes de l'agitation transitoire associée aux essais en microplaque (Sebastiao *et al.*, 2017) reconnus pour induire le transport de masse et la fragmentation, accélérant ainsi l'auto-assemblage en favorisant la nucléation primaire et secondaire (Godin *et al.*, 2019; Grigolato *et al.*, 2017).

À la lumière des analyses biophysiques, les analogues L12A et N14A ressortent tout de même du lot. L'analyse spectroscopique de dichroïsme circulaire en UV lointain révèle que l'analogue L12A emprunte possiblement une voie alternative du processus d'auto-assemblage amyloïde. En outre, L12A IAPP engendre une faible augmentation de l'intensité de la fluorescence des sondes ThT et ANS sur une période de 7 jours (figure 2.3A,B). Le dérivé L12A demeure principalement sous sa conformation native aléatoire (figure 2.3C). Néanmoins, des agrégats fibrillaires prototypiques, quoique plus torsadés que le peptide sauvage, ont été observés en microscopie électronique pour le peptide L12A (figure 2.3D); les fibres L12A résultantes affichent une morphologie différente des fibres amyloïdes classiques de l'IAPP. Somme toute, les résultats obtenus suggèrent collectivement que l'analogue L12A emprunte une voie alternative du processus. Du côté de l'analogue N14A, celui-ci semble passer par un intermédiaire transitoire différent de la voie de l'assemblage amyloïde. En effet, les spectres de dichroïsme circulaire de N14A affichent un signal caractéristique d'une structure hélicoïdale de 4h à 24h d'incubation (figure 2.3C). À 48h d'incubation, un signal caractéristique d'une structure secondaire riche en feuillets- β a été observé. La fluorescence de la ThT demeure assez basse durant toute la durée de l'expérience, alors que celle de l'ANS augmente drastiquement dès 2h d'incubation. Ces résultats suggèrent un faible ralentissement du processus, néanmoins un vaste réseau constitué de fibres minces a été observé en microscopie électronique chez l'analogue N14A. Il est plausible que l'analogue N14A emprunte une voie alternative du processus d'auto-assemblage, sur laquelle l'hélice- α constitue un intermédiaire transitoire, expliquant le faible ralentissement obtenu ainsi que la forte affinité à la sonde ANS. En somme, les chaînes latérales du domaine Leu12-Val17 sont fortement impliquées dans le processus d'auto-assemblage amyloïde de l'IAPP, particulièrement celles affichant une forte hydrophobicité.

3.3 L'incorporation successive de résidus modifiant localement le squelette peptidique aux positions Ala13-Leu16 module l'auto-assemblage de l'IAPP

En raison du manque de caractérisation des espèces transitoires oligomériques associées à la dégénérescence pancréatique, il importe d'approfondir les connaissances sur les intermédiaires transitoires via des études relation/structure pour mieux élucider les mécanismes d'oligomérisation. Plusieurs modèles ont été proposés quant aux intermédiaires transitoires présents lors de la phase de nucléation, tel le modèle des intermédiaires hélicoïdaux. Brièvement, ce modèle stipule que l'association de l'IAPP en dimère est thermodynamiquement dépendante de la formation de l'hélice- α entre les résidus Ala5 et Asn22 (Abedini et Raleigh, 2009a; Hebda et Miranker, 2009), pour pouvoir engendrer ultimement la continuité du processus d'auto-assemblage amyloïde. Les simulations de dynamiques moléculaires réalisées par l'équipe de Laghaei ont d'ailleurs révélé la forte contribution des résidus Leu12 à Val17 à l'obtention de l'hélice- α (Laghaei *et al.*, 2011), faisant de cette région la cible parfaite pour une étude relation structure/auto-assemblage. Une seconde série d'analogues de l'IAPP a donc été préparée via une incorporation de résidus modifiant localement le squelette peptidique aux positions Ala13 à Leu16.

Premièrement, l'incorporation du résidu Pro en position Ala13-Leu16 a été effectuée dans le but de déstabiliser le repliement hélicoïdal de l'IAPP et d'apprécier son implication dans l'auto-assemblage et la cytotoxicité de l'IAPP (Li *et al.*, 1996; Williams et Deber, 1991). Le résidu Pro entraînerait une réduction de la flexibilité du squelette peptidique (Jiang *et al.*, 2009), étant donné sa structure cyclique et sa capacité à former des ponts H au sein de structures non périodiques (Godin *et al.*, 2019; Smith *et al.*, 1980). Successivement incorporé aux positions Ala13-Leu16, le résidu Pro a fortement déstabilisé la capacité de l'IAPP à adopter une conformation en hélice- α , tel que présenté par les courbes de titrations TFE (figure 2.5 A,B). En outre, l'incorporation de Pro vient moduler le repliement hélicoïdal de l'IAPP en présence

d'une surface fortement inductrice d'hélice- α , les LUVs 30% anioniques (DOPC:DOPG; 7:3) (figure 3.1). L'incorporation de Pro aux positions Ala13 et Phe15 déstabilise fortement le peptide, ce dernier se retrouvant sous une structure secondaire de feuillets- β . Il est aussi possible que la présence de la surface membranaire des liposomes 30% anioniques accélère de manière très prononcée l'auto-assemblage des analogues A13P et F15P (Knight et Miranker, 2004; Zhang *et al.*, 2017a). Cette réduction de stabilité hélicoïdale est moins affectée aux positions Asn14 et Leu16, ces analogues demeurant sous la conformation native du peptide. L'impact de l'incorporation de Pro dans la région Ala13-Leu16 sur le processus d'auto-assemblage de l'IAPP est dépendant de la position dans la séquence primaire. En effet, lorsqu'incorporée aux positions Ala13 à Phe15, la Pro accélère l'auto-assemblage amyloïde en comparaison au peptide non modifié, ou aux analogues Ala. Cette accélération s'accompagne notamment d'une transition conformationnelle de la forme aléatoire à une structure secondaire en feuillets- β (figure 2.5E), d'une accélération d'un signal positif à la ThT (figure 2.5D), et de la formation de matériel fibrillaire plus dense (figure 2.5F; figure 2.S4, figure 2.S5). En revanche, lorsqu'introduit en position Leu16, la Pro génère une inhibition complète de la fibrillisation.

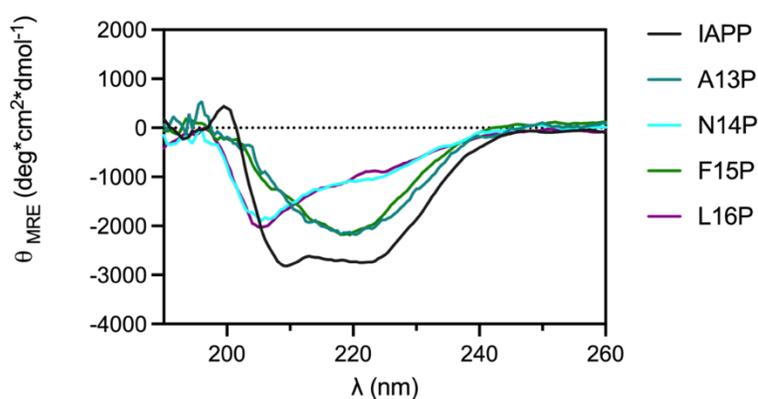


Figure 3.1. Évaluation de la stabilité du repliement hélicoïdal chez les analogues Pro par une surface inductrice. Spectres de dichroïsme circulaire en UV lointains de l'IAPP et des analogues Pro à 25 μ M en présence de 500 μ M des LUVs 30% anioniques (DOPC:DOPG; 7:3).

Deuxièmement, l'introduction d'un résidu Gly a été réalisée afin d'évaluer l'augmentation de la flexibilité du squelette peptidique sur l'agrégation. Cet acide aminé affiche également une forte capacité de déstabilisation du repliement hélicoïdal (Li et Deber, 1992; Nick Pace et Martin Scholtz, 1998). La déstabilisation de la capacité de repliement hélicoïdal chez l'IAPP générée par Gly est beaucoup moins importante que celle obtenue avec Pro, tel que démontré par les courbes de titration TFE (figure 2.6 A,B). D'ailleurs, cette incorporation en position Ala13 cause une déstabilisation partielle. Par exemple, le dérivé A13G, en comparaison avec le peptide sauvage, présente une déstabilisation en présence d'une faible concentration en TFE et une stabilisation de l'hélice à plus de 20% de TFE. En présence d'une surface inductrice du repliement, l'analogue A13G perd partiellement sa capacité à adopter une hélice- α , étant donné qu'il conserve sa forme aléatoire et ne forme pas directement une structure en feuillets- β comme A13P (figure 3.2). Cette distinction d'effets de Gly est dépendante de milieu environnant dans lequel le peptide se retrouve (Li et Deber, 1992; Nick Pace et Martin Scholtz, 1998). À faible concentration de TFE, Gly agit comme un déstabilisateur, étant donné que le retrait de la chaîne latérale réduit la capacité intrinsèque du peptide à former une hélice- α . À forte concentration de TFE ou dans un environnement mimant une membrane plasmique, Gly aide à stabiliser le repliement hélicoïdal (Li et Deber, 1992). Ainsi, en position Ala13, la dualité d'impact semble être beaucoup plus sensible qu'aux positions Asn14 à Leu16, comme le démontre les résultats des titrations TFE et les spectres CD des analogues Gly en présence des LUVs 30% anioniques (figure 3.2). La dualité de l'impact de Gly a aussi été retrouvée au sein du processus d'auto-assemblage. En effet, lorsqu'introduit en position Ala13, Gly induit une accélération du processus d'auto-assemblage, tel qu'observé par l'augmentation considérable de la fluorescence des sondes fluorimétriques et de la transition conformationnelle rapide (figure 2.6 C,D,E). En revanche, l'introduction de Gly aux positions Asn14 à Leu16 induit un ralentissement, voire une inhibition (figure 2.6) lorsque comparée aux analogues Ala respectifs (figure 2.3). Toutefois, il est

important de noter que l'analogue N14G conserve sa capacité de former des fibres amyloïdes. Ces agrégats fibrillaires semblent être plus courts, moins bien définis et plus enroulés que les fibres amyloïdes de N14A (figure 2.3D, 2.6F).

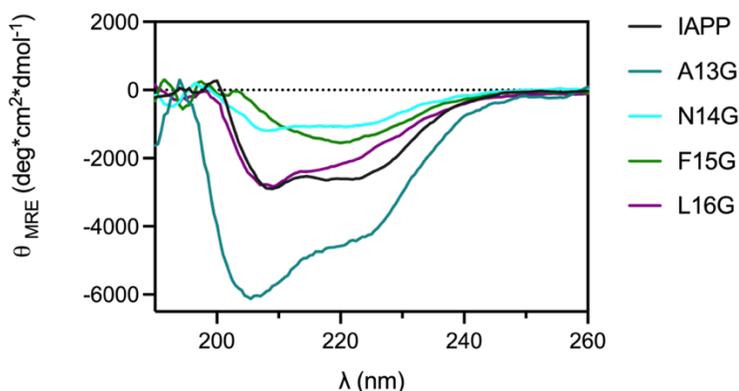


Figure 3.2. Évaluation de la stabilité du repliement hélicoïdal chez les analogues Gly par une surface inductrice. Spectres de dichroïsme circulaire en UV lointains de l'IAPP et des analogues Gly à 25 μM en présence de 500 μM des LUVs 30% anioniques (DOPC:DOPG; 7:3).

Troisièmement, l'acide aminoisobutyrique (Aib) a été inséré successivement aux positions 13 à 16 dans le but de stabiliser la structure secondaire de l'hélice- α . En effet, l'ajout d'un groupement méthyle sur le carbone α de l'alanine vient modifier l'encombrement stérique dans le squelette peptidique via l'effet *Thorpe-Ingold*, ce qui a pour conséquence de stabiliser l'hélice- α (Karle, 2001; Toniolo *et al.*, 2001). Toutefois, les résultats de la titration au TFE révèlent aucune modulation de la capacité de repliement hélicoïdal, et ce peu importe la position de l'incorporation de l'Aib (figure 2.7 A,B). Néanmoins, en présence des LUVs 30% anioniques, la capacité du peptide à adopter l'hélice- α est augmentée lorsque l'Aib est incorporé aux extrémités de la région, soit aux positions Ala13 et Leu16 (figure 3.3). Somme toute, l'évaluation de la stabilité du repliement hélicoïdal par deux méthodes distinctes révèle que l'introduction de l'Aib n'a pas réellement conduit à la stabilisation de l'hélice- α chez l'IAPP, au contraire de notre hypothèse de départ. Nos analyses biophysiques révèlent que l'analogue A13Aib agit de manière similaire lorsque comparé au peptide sauvage

(figure 2.7C,D,E,F). Des fibres amyloïdes typiques ont été obtenues pour l'analogue A13Aib IAPP (figure 2.7F). L'introduction successive de l'Aib aux positions 14 à 16 induit néanmoins un ralentissement considérablement du processus d'auto-assemblage, voir une inhibition complète en position Phe15 (figure 2.S8). Le dérivé N14Aib, lorsque comparé à l'analogue N14A, affichait une transition conformationnelle retardée, 72h d'incubation sont nécessaires pour observer un signal caractéristique des feuillets- β en dichroïsme circulaire (figure 2.7E). L16Aib, l'un des analogues avec une forte capacité d'adopter une hélice en présence de LUVs (figure 3.3.), demeurait principalement sous forme aléatoire, mais affichait un signal caractéristique d'une hélice après 7 jours d'incubation. Il reste difficilement de savoir si l'incorporation de l'Aib en position Leu16 cause réellement une inhibition du processus, étant donné qu'il est possible que le signal observé en dichroïsme circulaire évolue de l'hélice- α en feuillets- β au-delà de 7 jours d'incubation. En résumé, bien que l'Aib n'a pas conduit à une stabilisation de l'hélice- α , son incorporation en position Asn14 à Leu16 a ralenti considérablement le processus d'auto-assemblage.

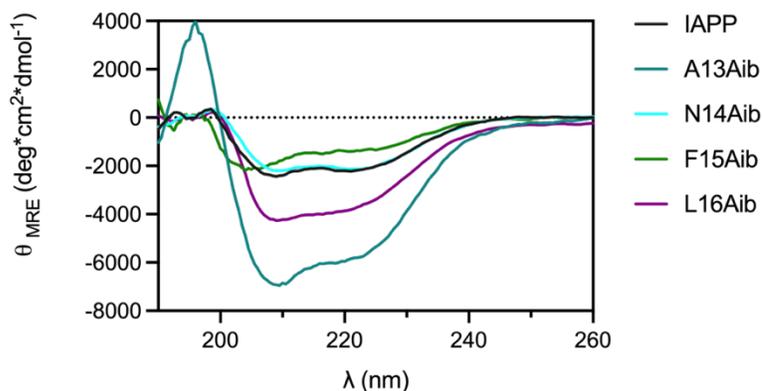


Figure 3.3. Évaluation de la stabilité du repliement hélicoïdal chez les analogues Aib par une surface inductrice. Spectres de dichroïsme circulaire en UV lointain de l'IAPP et des analogues Aib à 25 μM en présence de 500 μM des LUVs 30% anioniques (DOPC:DOPG; 7:3).

En combinant les effets observés expérimentalement par l'incorporation successive des résidus Pro et Aib, il est possible d'émettre l'hypothèse suivante: les intermédiaires

hélicoïdaux ne semblent pas constituer une espèce quaternaire obligatoire de la voie d'auto-assemblage amyloïde de l'IAPP.

3.4 Les chaînes latérales des résidus du domaine Leu12-Val17 jouent un rôle clé dans la cytotoxicité médiée de l'IAPP

Après avoir observé l'implication cruciale des chaînes latérales des résidus du domaine Leu12-Val17 pour l'auto-assemblage amyloïde, il a été question d'évaluer leur impact sur la cytotoxicité médiée de l'IAPP. Les résultats combinés de l'activité métabolique et des essais de viabilité cellulaire révèlent une réduction considérable de la cytotoxicité chez les analogues L12A, N14A, F15A et V17A en comparaison à l'IAPP (figure 2.4C,D). La substitution de la leucine-16 par une alanine, quant à elle, cause une réduction moins importante de la cytotoxicité. Afin d'approfondir un peu plus les mécanismes impliqués dans la cytotoxicité de l'IAPP, la perturbation membranaire de liposomes synthétiques composés de DOPC et DOPG, à un ratio molaire de 9:1, a été évaluée. De manière surprenante, l'incorporation successive d'une alanine aux positions N14, F15 et V17 a augmenté la capacité du peptide à perturber les vésicules synthétiques 10% anioniques en comparaison au peptide natif (figure 2.4A,B). Les analogues L12A et L16A ont démontré une capacité de perturbation de l'intégrité membranaire similaire à celle de l'IAPP sauvage. Ces observations indiquent une absence de corrélation entre la perturbation membranaire et la cytotoxicité.

Bien que la perturbation membranaire soit l'une des principales hypothèses du mécanisme de toxicité de l'IAPP (Bishoyi *et al.*, 2021; Brender *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2015), plusieurs autres mécanismes de cytotoxicité ont été rapportés, dont l'apoptose (Nguyen *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2008), le stress oxydatif (Li *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2015; Westermarck *et al.*, 2011), le dysfonctionnement des mitochondries (Gurlo *et al.*, 2010; Magzoub et Miranker, 2012) et le stress du

réticulum endoplasmique (Abedini et Schmidt, 2013; Cadavez *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2015). Dans ce contexte, il aurait été intéressant de tester l'activation des caspases impliquées dans le phénomène d'apoptose chez les cellules β pancréatiques de rat. La vérification du relargage d'une enzyme cytoplasmique, la lactate déshydrogénase (LDH), aurait aussi été un autre moyen de quantifier la perturbation membranaire dans un environnement membranaire plus complexe que celui des vésicules lipidiques synthétiques. En effet, ce test aurait pu être effectué directement chez les cellules β pancréatiques, et aurait mieux reflété l'environnement membranaire complexe de la cellule. Ce type d'analyse aurait pu conduire à une meilleure corrélation avec les résultats de viabilité cellulaire.

Afin de pouvoir potentiellement dégager une corrélation entre la cytotoxicité et la capacité des dérivés alanines à former une conformation hélicoïdale, la formation d'une hélice- α en présence de deux agents inducteurs a été étudiée au moyen du dichroïsme circulaire (figure 3.4). En outre, l'analogue N14A affiche une plus forte capacité de stabilisation de l'hélice- α à faible concentration de TFE. Il s'agit du seul analogue passant possiblement par un intermédiaire hélicoïdal lors de son auto-assemblage en fibres amyloïdes matures. De plus, l'analogue N14A affiche une faible cytotoxicité à une forte concentration (figure 2.4C). Donc, la stabilisation hélicoïdale pourrait être associée à la réduction de la cytotoxicité observée chez l'analogue N14A IAPP. D'autre part, l'analogue L12A affiche une faible capacité à former une hélice- α . En effet, la titration TFE réalisée chez ce dernier indique une faible capacité à adopter une structure secondaire en hélice- α . Néanmoins, il reste à déterminer à quel point l'incorporation d'une alanine en position Leu12 affecte le processus d'auto-assemblage en déstabilisant la structure secondaire. Dans une future étude, il serait important de réaliser les modifications L12P, L12G et L12Aib, afin de pouvoir dégager une corrélation entre la cytotoxicité et la capacité des analogues à adopter une hélice- α .

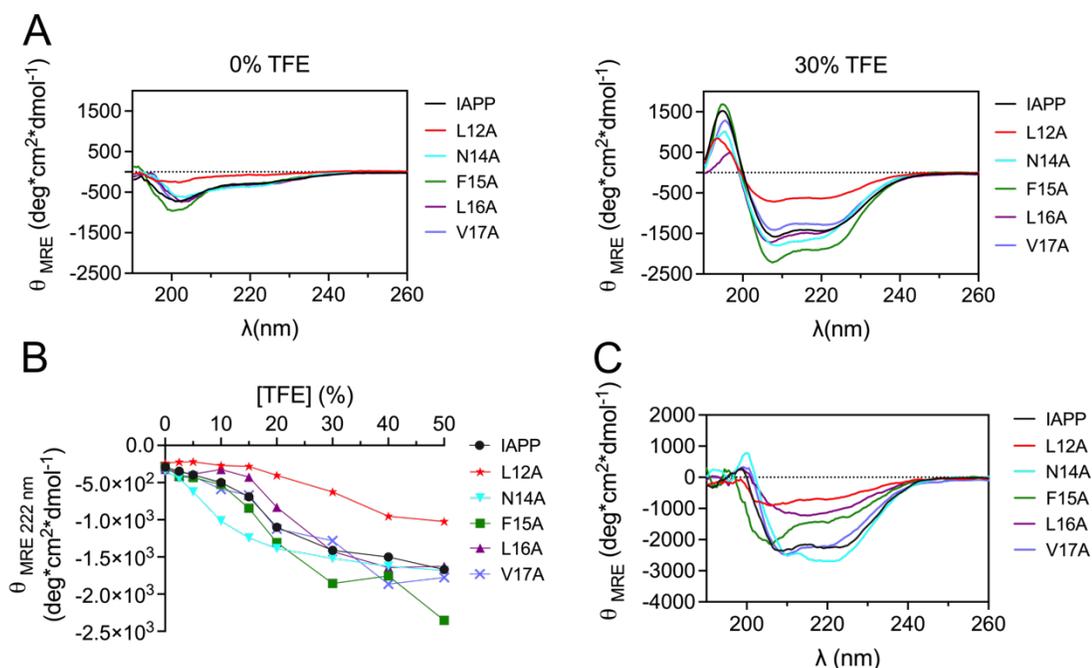


Figure 3.4. Évaluation de la stabilité du repliement hélicoïdal chez les analogues de l'IAPP. A) Spectres de dichroïsme circulaire de l'IAPP et des analogues alanines à 25 μ M en présence de 0 et 30% de TFE dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7.4. B) Titration TFE de l'IAPP et des analogues alanines mesurées par l'ellipticité à 222 nm dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7.4 à une concentration peptidique finale de 25 μ M. C) Spectres de dichroïsme circulaire en UV lointains de l'IAPP et des analogues alanines à 25 μ M en présence de 500 μ M des LUVs 30% anioniques (DOPC:DOPG; 7:3).

3.5 La modification locale du squelette peptidique aux positions Ala13-Leu16 module significativement la cytotoxicité de l'IAPP

Après avoir évalué l'impact de l'incorporation des acides aminés Pro, Gly et Aib en positions Ala13-Leu16 sur le processus d'auto-assemblage amyloïde, il a été question de déterminer celui sur la cytotoxicité médiée par l'IAPP. L'impact de la substitution successive de Pro sur la cytotoxicité a été défini comme étant position dépendante. Par exemple, une Pro incorporée à la position Ala13 augmente la cytotoxicité de l'IAPP, alors qu'en position Leu16, le caractère cytotoxique du peptide s'est retrouvé réduit significativement (figure 2.8). À l'opposé, aucune modulation du caractère cytotoxique

de l'IAPP n'a été observée la suite de l'introduction successive de Pro aux positions Asn14 et Phe15. L'incorporation de Gly a aussi été définie comme étant position dépendante. Lorsqu'incorporé en position Ala13, Gly a accentué la cytotoxicité de l'IAPP. Le résidu Gly, une fois introduit aux positions Asn14 à Leu16, a généré une cytotoxicité moins importante en comparaison au peptide sauvage (figure 2.8). Finalement, bien qu'aucune modulation de la cytotoxicité n'ait été observée à la suite de l'introduction de l'Aib en position Ala13, les substitutions successives des résidus Asn14, Phe15 et Leu16 par l'Aib ont réduit considérablement le caractère cytotoxique de l'IAPP (figure 2.8).

Notre étude expose également que la cytotoxicité d'un peptide amyloïdogénique ne corrèle pas toujours à son potentiel d'auto-assemblage. En outre, les analogues N14Aib et N14G de la présente étude s'agrègent efficacement en fibres amyloïdes, tout en affichant une cytotoxicité considérablement réduite en comparaison au peptide sauvage. Ce phénomène avait également été observé lors d'une étude antérieure menée au sein du laboratoire Bourgault. L'analogue N21G a été en mesure de former des fibres amyloïdes, mais sa cytotoxicité a été considérablement réduite (Godin *et al.*, 2019). Ainsi, ce ne sont pas tous les oligomères et/ou espèces transitoires générées lors des étapes précoces de l'auto-assemblage qui sont cytotoxiques. Plusieurs propriétés physicochimiques et conformationnelles spécifiques peuvent aussi moduler la cytotoxicité de l'IAPP (Abedini *et al.*, 2016; Godin *et al.*, 2019), comme le démontre notamment l'homologue du peptide chez les rongeurs: rIAPP affiche une forte capacité d'oligomérisation sans pour autant être cytotoxique envers les cellules β -pancréatiques (Abedini *et al.*, 2016).

L'incorporation de Pro et de Gly en position Ala13 a généré des intermédiaires plus cytotoxiques en comparaison à l'IAPP sauvage. Il est intéressant de noter que seuls les analogues A13P et A13G voient leur auto-assemblage complété en moins de 24h, soit 4h et 6h respectivement. L'incorporation de Pro et Gly en position Ala13, pouvant

déstabiliser la structure secondaire de l'hélice- α , peuvent possiblement générer des espèces oligomériques transitoires beaucoup plus cytotoxiques dans l'environnement membranaire complexe. Une corrélation entre la déstabilisation de la capacité du repliement hélicoïdal et l'augmentation de la cytotoxicité médiée chez l'IAPP a déjà été rapportée dans la littérature. En effet, l'analogue D-IAPP (F15f-L16l IAPP) a vu sa capacité de formation d'une hélice- α considérablement réduite en comparaison au peptide sauvage. Bien que l'incorporation de 2 acides aminés D en position 15 et 16 n'a pas causé un changement dans les paramètres cinétiques, elle a engendré une augmentation importante de la cytotoxicité (De Carufel *et al.*, 2015). Ce concept de déstabilisation de l'hélice- α augmentant la cytotoxicité reste néanmoins position dépendante. Or, bien que l'analogue L16P ait en partie perdu sa capacité de former des hélices- α , il n'en est pas plus cytotoxique en comparaison aux autres analogues prolines.

À la lumière des résultats obtenus, il est possible d'émettre l'hypothèse suivante: la stabilisation de l'hélice- α constitue une solution prometteuse pour inhiber le caractère cytotoxique de l'IAPP. De surcroît, les résultats prometteurs de la réduction du caractère cytotoxique du peptide font aussi de l'Aib un résidu intéressant pour la conception d'analogues non cytotoxiques. En somme, cette hypothèse de stabilisation du repliement hélicoïdal comme stratégie inhibitrice de l'amyloïdogénèse et de la cytotoxicité de l'IAPP est supportée par la conception récente des foldamères comme inhibiteurs (Kaffy *et al.*, 2020).

CHAPITRE IV

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce projet de maîtrise a permis d'élucider la contribution du domaine Leu12-Val17 ainsi que l'implication des intermédiaires hélicoïdaux dans l'auto-assemblage et la cytotoxicité de l'IAPP.

Plus spécifiquement, nos résultats ont conduit à une meilleure compréhension de l'implication d'un domaine peu étudié chez l'IAPP. De cette étude, les principales observations ont été faites:

- 1) Le domaine Leu12-Val17 joue un rôle essentiel dans le processus d'auto-assemblage de l'IAPP, les résidus hydrophobes Leu12, Phe15 et Val17 sont nécessaires à la nucléation primaire.
- 2) Les chaînes latérales des résidus du domaine Leu12-Val17 modulent le caractère cytotoxique du peptide.
- 3) L'incorporation des acides aminés Pro, Gly et Aib, qui modifient localement le squelette peptidique aux positions Ala13-Leu16, a modulé considérablement l'auto-assemblage amyloïde de l'IAPP.
 - a. Ces effets dépendent de la position dans la séquence.
 - b. Les résultats combinés de l'incorporation de Pro et de l'Aib suggèrent que les intermédiaires hélicoïdaux ne constituent pas une espèce quaternaire obligatoire de la voie d'auto-assemblage amyloïdogène.
- 4) L'incorporation des acides aminés Pro, Gly et Aib modulent aussi la cytotoxicité médiée de l'IAPP.

- a. Les analogues A13P et A13G génèrent possiblement des intermédiaires oligomériques plus cytotoxiques que le peptide sauvage.
- b. L'utilisation de l'Aib aux positions Asn14 à Leu16 réduit considérablement, voire inhibe la cytotoxicité du peptide.

En termes de perspectives, il reste encore à réaliser maintes études relations structure/auto-assemblage pour comprendre les subtilités mécanistiques de ce processus complexe. Cette limitation s'inscrit notamment dans le manque de modèles et hypothèses clairs sur les différents mécanismes moléculaires sous-jacents de l'auto-assemblage amyloïde. Dans une future étude, il serait intéressant d'évaluer la capacité des fibres LANFLV préformées à accélérer l'auto-assemblage de l'IAPP au sein du peptide complet. Aussi, il serait important d'approfondir les mécanismes de cytotoxicité dépendant du domaine Leu12-Val17. Enfin, afin d'établir une corrélation entre la stabilisation de l'hélice- α et la réduction de la cytotoxicité au sein du domaine Leu12-Val17, il faudra incorporer les résidus Pro, Gly et Aib en position Leu12 et évaluer leur impact sur le processus d'auto-assemblage amyloïde, via les analyses biophysiques classiques, mais aussi en faisant appel à d'autres méthodes dont la dynamique moléculaire et la RMN. Somme toute, ce projet de maîtrise s'inscrit dans une démarche plus globale d'identification des espèces responsables de la dégénérescence pancréatique, mais aussi de la conception de puissants inhibiteurs de l'auto-assemblage amyloïde ou encore d'analogues fonctionnels et non-amyloïdogéniques de l'IAPP. D'un point de vue fondamental, ce projet contribue à une meilleure compréhension des intermédiaires transitoires présents lors de la phase de nucléation, ainsi qu'aux différents domaines impliqués dans l'auto-assemblage amyloïde de l'IAPP.

BIBLIOGRAPHIE

- Abedini A, Meng F et Raleigh DP (2007) A Single-Point Mutation Converts the Highly Amyloidogenic Human Islet Amyloid Polypeptide into a Potent Fibrillization Inhibitor. *Journal of the American Chemical Society* 129: 11300-11301.
- Abedini A, Plesner A, Cao P, Ridgway Z, Zhang J, Tu L-H, 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: e12977.
- Abedini A et Raleigh DP (2005) Incorporation of pseudoproline derivatives allows the facile synthesis of human IAPP, a highly amyloidogenic and aggregation-prone polypeptide. *Org Lett* 7: 693-696.
- Abedini A et Raleigh DP (2006) Destabilization of human IAPP amyloid fibrils by proline mutations outside of the putative amyloidogenic domain: is there a critical amyloidogenic domain in human IAPP? *Journal of molecular biology* 355: 274-281.
- Abedini A et Raleigh DP (2009a) A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides. *Protein Eng, Des Sel* 22: 453.
- Abedini A et Raleigh DP (2009b) A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides. *Protein Eng Des Sel* 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.

- Ahrén B, Oosterwijk C, Lips CJ et Höppener JW (1998) Transgenic overexpression of human islet amyloid polypeptide inhibits insulin secretion and glucose elimination after gastric glucose gavage in mice. *Diabetologia* 41: 1374-1380.
- Åkesson B, Panagiotidis G, Westermark P et Lundquist I (2003) Islet amyloid polypeptide inhibits glucagon release and exerts a dual action on insulin release from isolated islets. *Regulatory Peptides* 111: 55-60.
- Akkati S, Sam KG et Tungha G (2011) Emergence of promising therapies in diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol* 51: 796-804.
- Akter R, Bower RL, Abedini A, Schmidt AM, Hay DL et Raleigh DP (2018) Amyloidogenicity, Cytotoxicity, and Receptor Activity of Bovine Amylin: Implications for Xenobiotic Transplantation and the Design of Nontoxic Amylin Variants. *ACS Chem Biol* 13: 2747-2757.
- Akter R, Cao P, Noor H, Ridgway Z, Tu LH, Wang H, Wong AG, Zhang X, Abedini A, Schmidt AM, et al. (2016) Islet Amyloid Polypeptide: Structure, Function, and Pathophysiology. *J Diabetes Res* 2016: 2798269.
- Alexander SP, Christopoulos A, Davenport AP, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, Faccenda E, Harding SD, Pawson AJ, Sharman JL, et al. (2017) THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 174 Suppl 1: S17-s129.
- Allard FD, Wallace AE et Greenbaum CJ (2005) Emerging therapies: going beyond insulin in treating individuals with type 1 diabetes mellitus. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 12: 303-308.
- Anguiano M, Nowak RJ et Lansbury PT, Jr. (2002) Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. *Biochemistry* 41: 11338-11343.
- Armstrong AH, Chen J, McKoy AF et Hecht MH (2011) Mutations That Replace Aromatic Side Chains Promote Aggregation of the Alzheimer's A β Peptide. *Biochemistry* 50: 4058-4067.

- Arnelo U, Permert J, Adrian TE, Larsson J, Westermark P et Reidelberger RD (1996) Chronic infusion of islet amyloid polypeptide causes anorexia in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 271: R1654-R1659.
- Ashrafi G et Schwarz TL (2013) The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death & Differentiation* 20: 31-42.
- 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 et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860: 1765-1782.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS et Michels AW (2014) Type 1 diabetes. *Lancet* 383: 69-82.
- Azriel R et Gazit E (2001) Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation. *J Biol Chem* 276: 34156-34161.
- Babych M, Bertheau-Mailhot G, Zottig X, Dion J, Gauthier L, Archambault D et Bourgault S (2018) Engineering and evaluation of amyloid assemblies as a nanovaccine against the Chikungunya virus. *Nanoscale* 10: 19547-19556.
- Bakou M, Hille K, Kracklauer M, Spanopoulou A, Frost CV, Malideli E, Yan LM, Caporale A, Zacharias M et Kapurniotu A (2017) Key aromatic/hydrophobic amino acids controlling a cross-amyloid peptide interaction versus amyloid self-assembly. *J Biol Chem* 292: 14587-14602.
- Barwell J, Gingell JJ, Watkins HA, Archbold JK, Poyner DR et Hay DL (2012) Calcitonin and calcitonin receptor-like receptors: common themes with family B GPCRs? *British Journal of Pharmacology* 166: 51-65.
- Bell ET (1952) Hyalinization of the islet of Langerhans in diabetes mellitus. *Diabetes* 1: 341-344.

- Bell ET (1959) Hyalinization of the islets of Langerhans in nondiabetic individuals. *Am J Pathol* 35: 801-805.
- Bemporad F et Chiti F (2012) Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationships. *Chem Biol* 19: 315-327.
- Betsholtz C, Christmansson L, Engström U, Rorsman F, Svensson V, Johnson KH et Westermarck P (1989) Sequence divergence in a specific region of islet amyloid polypeptide (IAPP) explains differences in islet amyloid formation between species. *FEBS Lett* 251: 261-264.
- Biancalana M et Koide S (2010) Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta* 1804: 1405-1412.
- Bishop JR, Schuksz M et Esko JD (2007) Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446: 1030-1037.
- Bishoyi AK, Roham PH, Rachineni K, Save S, Hazari MA, Sharma S et Kumar A (2021) Human islet amyloid polypeptide (hIAPP) - a curse in type II diabetes mellitus: insights from structure and toxicity studies. *Biol Chem* 402: 133-153.
- Bourgault S, Solomon JP, Reixach N et Kelly JW (2011) Sulfated glycosaminoglycans accelerate transthyretin amyloidogenesis by quaternary structural conversion. *Biochemistry* 50: 1001-1015.
- Bower RL et Hay DL (2016) Amylin structure-function relationships and receptor pharmacology: implications for amylin mimetic drug development. *Br J Pharmacol* 173: 1883-1898.
- 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. *Acc Chem Res* 45: 454-462.

- Bretherton-Watt D, Gilbey SG, Ghatei MA, Beacham J, Macrae AD et Bloom SR (1992) Very high concentrations of islet amyloid polypeptide are necessary to alter the insulin response to intravenous glucose in man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 74: 1032-1035.
- Broderick CL, Brooke GS, DiMarchi RD et Gold G (1991) Human and rat amylin have no effects on insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 932-938.
- 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* 110: 19285-19290.
- Butler AE, Jang J, Gurlo T, Carty MD, Soeller WC et Butler PC (2004) Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP Rat): a new model for type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 1509-1516.
- Cadavez L, Montane J, Alcarraz-Vizán G, Visa M, Vidal-Fàbrega L, Servitja JM et Novials A (2014) Chaperones ameliorate beta cell dysfunction associated with human islet amyloid polypeptide overexpression. *PLoS One* 9: e101797.
- Calloni G, Lendel C, Campioni S, Giannini S, Gliozzi A, Relini A, Vendruscolo M, Dobson CM, Salvatella X et Chiti F (2008) Structure and Dynamics of a Partially Folded Protein Are Decoupled from Its Mechanism of Aggregation. *Journal of the American Chemical Society* 130: 13040-13050.
- Cao P, Marek P, Noor H, Patsalo V, Tu LH, Wang H, Abedini A et Raleigh DP (2013) Islet amyloid: From fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity. *FEBS Lett* 587: 1106.
- Cao P, Tu L-H, 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 Biology* 421: 282-295.

- Cao Q, Boyer DR, Sawaya MR, Abskharon R, Saelices L, Nguyen BA, Lu J, Murray KA, Kandeel F et Eisenberg DS (2021) Cryo-EM structures of hIAPP fibrils seeded by patient-extracted fibrils reveal new polymorphs and conserved fibril cores. *Nature Structural & Molecular Biology* 28: 724-730.
- Cao Q, Boyer DR, Sawaya MR, Ge P et Eisenberg DS (2020) Cryo-EM structure and inhibitor design of human IAPP (amylin) fibrils. *Nat Struct Mol Biol* 27: 653-659.
- Carles J (1956) [Colorimetric microdetermination of phosphorus]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* 38: 255-257.
- Chiti F et Dobson CM (2017) Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem* 86: 27-68.
- Christopoulos G, Paxinos G, Huang XF, Beaumont K, Toga AW et Sexton PM (1995) Comparative distribution of receptors for amylin and the related peptides calcitonin gene related peptide and calcitonin in rat and monkey brain. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 1037-1041.
- Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, Cooper GJ, Holman RR et Turner RC (1988) Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9: 151-159.
- Conchillo-Solé O, de Groot NS, Avilés FX, Vendrell J, Daura X et Ventura S (2007) AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics* 8: 65.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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* 84: 8628.
- Courtade JA, Wang EY, Yen P, Dai DL, Soukhatcheva G, Orban PC et Verchere CB (2017) Loss of prohormone convertase 2 promotes beta cell dysfunction in a rodent transplant model expressing human pro-islet amyloid polypeptide. *Diabetologia* 60: 453-463.
- Cox DL, Sing RR et Yang S (2006) Prion disease: exponential growth requires membrane binding. *Biophys J* 90: L77-79.
- 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. *Biopolymers* 100: 645.
- 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.
- Dégano P, Silvestre RA, Salas M, Peiró E et Marco J (1993) Amylin inhibits glucose-induced insulin secretion in a dose-dependent manner. Study in the perfused rat pancreas. *Regul Pept* 43: 91-96.
- Dong X, Qiao Q, Qian Z et Wei G (2018) Recent computational studies of membrane interaction and disruption of human islet amyloid polypeptide: Monomers, oligomers and protofibrils. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860: 1826-1839.
- Doran TM, Kamens AJ, Byrnes NK et Nilsson BL (2012) Role of amino acid hydrophobicity, aromaticity, and molecular volume on IAPP(20-29) amyloid self-assembly. *Proteins* 80: 1053-1065.
- Dupuis NF, Wu C, Shea JE et Bowers MT (2011a) The amyloid formation mechanism in human IAPP: dimers have beta-strand monomer-monomer interfaces. *J Am Chem Soc* 133: 7240.

- Dupuis NF, Wu C, Shea JE et Bowers MT (2011b) The amyloid formation mechanism in human IAPP: dimers have beta-strand monomer-monomer interfaces. *J Am Chem Soc* 133: 7240-7243.
- Engel MF, Khemtémourian L, Kleijer CC, Meeldijk HJ, Jacobs J, Verkleij AJ, de Kruijff B, Killian JA et Höppener JW (2008) Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6033-6038.
- Engel MF, Yigittop H, Elgersma RC, Rijkers DT, Liskamp RM, de Kruijff B, Höppener JW et Antoinette Killian J (2006) Islet amyloid polypeptide inserts into phospholipid monolayers as monomer. *J Mol Biol* 356: 783-789.
- Exley C, House E, Patel T, Wu L et Fraser PE (2010) Human pro-islet amyloid polypeptide (ProIAPP(1-48)) forms amyloid fibrils and amyloid spherulites in vitro. *J Inorg Biochem* 104: 1125-1129.
- Fernandez-Escamilla AM, Rousseau F, Schymkowitz J et Serrano L (2004) Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat Biotechnol* 22: 1302-1306.
- Fineman MS, Koda JE, Shen LZ, Strobel SA, Maggs DG, Weyer C et Kolterman OG (2002) The human amylin analog, pramlintide, corrects postprandial hyperglucagonemia in patients with type 1 diabetes. *Metabolism* 51: 636-641.
- Flamment M et Foufelle F (2013) [Endoplasmic reticulum stress: from physiology to pathogenesis of type 2 diabetes]. *Med Sci (Paris)* 29: 756-764.
- Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, Ostolaza H et Martín C (2020) Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* 21:
- Gallardo R, Iadanza MG, Xu Y, Heath GR, Foster R, Radford SE et Ranson NA (2020) Fibril structures of diabetes-related amylin variants reveal a basis for surface-templated assembly. *Nature Structural & Molecular Biology* 27: 1048-1056.
- Gazit E (2002) A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *Faseb j* 16: 77-83.

- German M, Ashcroft S, Docherty K, Edlund H, Edlund T, Goodison S, Imura H, Kennedy G, Madsen O, Melloul D, et al. (1995) The Insulin Gene Promoter: A Simplified Nomenclature. *Diabetes* 44: 1002-1004.
- German MS, Moss LG, Wang J et Rutter WJ (1992) The insulin and islet amyloid polypeptide genes contain similar cell-specific promoter elements that bind identical beta-cell nuclear complexes. *Molecular and Cellular Biology* 12: 1777.
- Glenner GG, Eanes ED et Wiley CA (1988) Amyloid fibrils formed from a segment of the pancreatic islet amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 155: 608-614.
- Godin E, Nguyen PT, Zottig X et Bourgault S (2019) Identification of a hinge residue controlling islet amyloid polypeptide self-assembly and cytotoxicity. *J Biol Chem* 294: 8452-8463.
- Goldsbury C, Goldie K, Pellaud J, Seelig J, Frey P, Müller SA, Kistler J, Cooper GJ et Aebi U (2000) Amyloid fibril formation from full-length and fragments of amylin. *J Struct Biol* 130: 352-362.
- 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.
- Gurlo T, Ryazantsev S, Huang CJ, Yeh MW, Reber HA, Hines OJ, O'Brien TD, Glabe CG et Butler PC (2010) Evidence for proteotoxicity in beta cells in type 2 diabetes: toxic islet amyloid polypeptide oligomers form intracellularly in the secretory pathway. *Am J Pathol* 176: 861-869.
- Halban PA (1991) Structural domains and molecular lifestyles of insulin and its precursors in the pancreatic beta cell. *Diabetologia* 34: 767-778.
- Hay DL, Chen S, Lutz TA, Parkes DG et Roth JD (2015) Amylin: Pharmacology, Physiology, and Clinical Potential. *Pharmacological Reviews* 67: 564-600.

- Hay DL, Garelja ML, Poyner DR et Walker CS (2018) Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25. *Br J Pharmacol* 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 Review of Biophysics* 38: 125-152.
- Huang CJ, Lin CY, Haataja L, Gurlo T, Butler AE, Rizza RA et Butler PC (2007) High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes* 56: 2016-2027.
- Hull RL, Westermark GT, Westermark P et Kahn SE (2004) Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3629-3643.
- 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.
- Hurshman AR, White JT, Powers ET et Kelly JW (2004) Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization. *Biochemistry* 43: 7365-7381.
- Iannuzzi C, Irace G et Sirangelo I (2015) The effect of glycosaminoglycans (GAGs) on amyloid aggregation and toxicity. *Molecules* 20: 2510-2528.
- Jaikaran ET, Higham CE, Serpell LC, Zurdo J, Gross M, Clark A et Fraser PE (2001) Identification of a novel human islet amyloid polypeptide beta-sheet domain and factors influencing fibrillogenesis. *J Mol Biol* 308: 515-525.
- Jha S, Patil SM, Gibson J, Nelson CE, Alder NN et Alexandrescu AT (2011) Mechanism of amylin fibrillization enhancement by heparin. *J Biol Chem* 286: 22894-22904.

- Jha S, Snell JM, Sheftic SR, Patil SM, Daniels SB, Kolling FW et Alexandrescu AT (2014) pH dependence of amylin fibrillization. *Biochemistry* 53: 300-310.
- Jiang P, Xu W et Mu Y (2009) Amyloidogenesis abolished by proline substitutions but enhanced by lipid binding. *PLoS Comput Biol* 5: e1000357.
- Kaffy J, Berardet C, Mathieu L, Legrand B, Taverna M, Halgand F, Van Der Rest G, Maillard LT et Onger S (2020) Helical γ -Peptide Foldamers as Dual Inhibitors of Amyloid- β Peptide and Islet Amyloid Polypeptide Oligomerization and Fibrillization. *Chemistry* 26: 14612-14622.
- Kahn SE (2000) The importance of the beta-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 108 Suppl 6a: 2s-8s.
- Kahn SE, D'Alessio DA, Schwartz MW, Fujimoto WY, Ensink JW, Taborsky GJ, Jr. et Porte D, Jr. (1990) Evidence of cosecretion of islet amyloid polypeptide and insulin by beta-cells. *Diabetes* 39: 634-638.
- Kahn SE, Fujimoto WY, D'Alessio DA, Ensink JW et Porte D, Jr. (1991) Glucose stimulates and potentiates islet amyloid polypeptide secretion by the B-cell. *Horm Metab Res* 23: 577-580.
- Kajava AV, Aebi U et Steven AC (2005) The parallel superpleated beta-structure as a model for amyloid fibrils of human amylin. *J Mol Biol* 348: 247-252.
- Kalofoutis C, Piperi C, Kalofoutis A, Harris F, Phoenix D et Singh J (2007) Type II diabetes mellitus and cardiovascular risk factors: Current therapeutic approaches. *Exp Clin Cardiol* 12: 17-28.
- Kanatsuka A, Makino H, Ohsawa H, Tokuyama Y, Yamaguchi T, Yoshida S et Adachi M (1989) Secretion of islet amyloid polypeptide in response to glucose. *FEBS Letters* 259: 199-201.
- Kapurniotu A (2001) Amyloidogenicity and cytotoxicity of islet amyloid polypeptide. *Peptide Science* 60: 438-459.

- Karle IL (2001) Controls exerted by the Aib residue: Helix formation and helix reversal. *Peptide Science* 60: 351-365.
- Kawahara M, Kuroda Y, Arispe N et Rojas E (2000) Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. *J Biol Chem* 275: 14077-14083.
- 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. *J Biol Chem* 284: 4230-4237.
- 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.
- Khemtemourian L, Guillemain G, Fougelle F et Killian JA (2017) Residue specific effects of human islet polypeptide amyloid on self-assembly and on cell toxicity. *Biochimie* 142: 22-30.
- Khemtémourian L, Killian JA, Höppener JW et Engel MF (2008) Recent insights in islet amyloid polypeptide-induced membrane disruption and its role in beta-cell death in type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res* 2008: 421287.
- Khondker A, Alsop RJ et Rheinstädter MC (2017) Membrane-Accelerated Amyloid- β Aggregation and Formation of Cross- β Sheets. *Membranes (Basel)* 7:
- Knight JD et Miranker AD (2004) Phospholipid catalysis of diabetic amyloid assembly. *J Mol Biol* 341: 1175-1187.
- Knight JD, Williamson JA et Miranker AD (2008) Interaction of membrane-bound islet amyloid polypeptide with soluble and crystalline insulin. *Protein Sci* 17: 1850-1856.

- Kogire M, Ishizuka J, Thompson JC et Greeley GH, Jr. (1991) Inhibitory action of islet amyloid polypeptide and calcitonin gene-related peptide on release of insulin from the isolated perfused rat pancreas. *Pancreas* 6: 459-463.
- Koo BW, Hebda JA et Miranker AD (2008) Amide inequivalence in the fibrillar assembly of islet amyloid polypeptide. *Protein Eng, Des Sel* 21: 147.
- Koo BW et Miranker AD (2005) Contribution of the intrinsic disulfide to the assembly mechanism of islet amyloid. *Protein Sci* 14: 231.
- Kraus A (2016) Proline and lysine residues provide modulatory switches in amyloid formation: Insights from prion protein. *Prion* 10: 57-62.
- 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.
- Laghaei R, Mousseau N et Wei G (2011) Structure and Thermodynamics of Amylin Dimer Studied by Hamiltonian-Temperature Replica Exchange Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* 115: 3146-3154.
- Larson JL et Miranker AD (2004) The mechanism of insulin action on islet amyloid polypeptide fiber formation. *J Mol Biol* 335: 221-231.
- Lashuel HA, Hartley D, Petre BM, Walz T et Lansbury PT, Jr. (2002) Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418: 291.
- Lebovitz HE (2010) Adjunct therapy for type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 6: 326-334.
- Lee J, Culyba EK, Powers ET et Kelly JW (2011) Amyloid- β forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. *Nat Chem Biol* 7: 602-609.
- Li SC et Deber CM (1992) Influence of glycine residues on peptide conformation in membrane environments. *Int J Pept Protein Res* 40: 243-248.

- 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* 93: 6676-6681.
- Li XL, Xu G, Chen T, Wong YS, Zhao HL, Fan RR, Gu XM, Tong PC et Chan JC (2009) Phycocyanin protects INS-1E pancreatic beta cells against human islet amyloid polypeptide-induced apoptosis through attenuating oxidative stress and modulating JNK and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1526-1535.
- 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.
- Louros NN, Tsiolaki PL, Zompra AA, Pappa EV, Magafa V, Pairas G, Cordopatis P, Cheimonidou C, Trougakos IP, Iconomidou VA, et al. (2015) Structural studies and cytotoxicity assays of "aggregation-prone" IAPP(8-16) and its non-amyloidogenic variants suggest its important role in fibrillogenesis and cytotoxicity of human amylin. *Biopolymers* 104: 196-205.
- 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.
- Lukinius A, Wilander E, Westermark GT, Engström U et Westermark P (1989) Co-localization of islet amyloid polypeptide and insulin in the B cell secretory granules of the human pancreatic islets. *Diabetologia* 32: 240-244.
- Lutz TA (2010) The role of amylin in the control of energy homeostasis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 298: R1475-R1484.
- MacArthur MW et Thornton JM (1991) Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol* 218: 397-412.

- Magnani E et Bettini E (2000) Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect. *Brain Res Brain Res Protoc* 5: 266-272.
- Magzoub M et Miranker AD (2012) Concentration-dependent transitions govern the subcellular localization of islet amyloid polypeptide. *Faseb j* 26: 1228-1238.
- Maj M, Lomont JP, Rich KL, Alperstein AM et Zanni MT (2018) Site-specific detection of protein secondary structure using 2D IR dihedral indexing: a proposed assembly mechanism of oligomeric hIAPP. *Chem Sci* 9: 463-474.
- Marek P, Abedini A, Song B, Kanungo M, Johnson ME, Gupta R, Zaman W, Wong SS et Raleigh DP (2007) Aromatic interactions are not required for amyloid fibril formation by islet amyloid polypeptide but do influence the rate of fibril formation and fibril morphology. *Biochemistry* 46: 3255-3261.
- Marek PJ, Patsalo V, Green DF et Raleigh DP (2012) Ionic Strength Effects on Amyloid Formation by Amylin Are a Complicated Interplay among Debye Screening, Ion Selectivity, and Hofmeister Effects. *Biochemistry* 51: 8478-8490.
- Marzban L, Trigo-Gonzalez G et Verchere CB (2005) Processing of Pro-Islet Amyloid Polypeptide in the Constitutive and Regulated Secretory Pathways of β Cells. *Molecular Endocrinology* 19: 2154-2163.
- Marzban L, Trigo-Gonzalez G, Zhu X, Rhodes CJ, Halban PA, Steiner DF et Verchere CB (2004) Role of beta-cell prohormone convertase (PC)1/3 in processing of pro-islet amyloid polypeptide. *Diabetes* 53: 141-148.
- Matveyenko AV et Butler PC (2006) Beta-cell deficit due to increased apoptosis in the human islet amyloid polypeptide transgenic (HIP) rat recapitulates the metabolic defects present in type 2 diabetes. *Diabetes* 55: 2106-2114.
- Meier DT, Morcos M, Samarasekera T, Zraika S, Hull RL et Kahn SE (2014) Islet amyloid formation is an important determinant for inducing islet inflammation in high-fat-fed human IAPP transgenic mice. *Diabetologia* 57: 1884-1888.

- Mirecka EA, Feuerstein S, Gremer L, Schröder GF, Stoldt M, Willbold D et Hoyer W (2016) β -Hairpin of Islet Amyloid Polypeptide Bound to an Aggregation Inhibitor. *Sci Rep* 6: 33474.
- Mirzabekov TA, Lin MC et Kagan BL (1996) Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin. *J Biol Chem* 271: 1988-1992.
- Moore CX et Cooper GJ (1991) Co-secretion of amylin and insulin from cultured islet beta-cells: modulation by nutrient secretagogues, islet hormones and hypoglycemic agents. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 1-9.
- Moriarty DF et Raleigh DP (1999) Effects of sequential proline substitutions on amyloid formation by human amylin₂₀₋₂₉. *Biochemistry* 38: 1811-1818.
- Mosselman S, Höppener JW, Lips CJ et Jansz HS (1989) The complete islet amyloid polypeptide precursor is encoded by two exons. *FEBS Lett* 247: 154-158.
- Motamedi-Shad N, Monsellier E, Torrassa S, Relini A et Chiti F (2009) Kinetic analysis of amyloid formation in the presence of heparan sulfate: faster unfolding and change of pathway. *J Biol Chem* 284: 29921-29934.
- Muff R, Born W et Fischer JA (1995) Receptors for calcitonin, calcitonin gene related peptide, amylin, and adrenomedullin. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 963-967.
- Mulder H, Ahrén B et Sundler F (1996) Islet amyloid polypeptide and insulin gene expression are regulated in parallel by glucose in vivo in rats. *Am J Physiol* 271: E1008-1014.
- Nanga RP, 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. *Biochim Biophys Acta* 1808: 2337-2342.
- Nguyen PT, Andraka N, De Carufel CA et Bourgault S (2015) Mechanistic Contributions of Biological Cofactors in Islet Amyloid Polypeptide Amyloidogenesis. *J Diabetes Res* 2015: 515307.

- Nguyen PT, Zottig X, Sebastiao M, Arnold AA, Marcotte I et Bourgault S (2021) Identification of transmissible proteotoxic oligomer-like fibrils that expand conformational diversity of amyloid assemblies. *Communications Biology* 4: 939.
- Nguyen PT, Zottig X, Sebastiao M et Bourgault S (2017) Role of Site-Specific Asparagine Deamidation in Islet Amyloid Polypeptide Amyloidogenesis: Key Contributions of Residues 14 and 21. *Biochemistry* 56: 3808-3817.
- Nichols MR, Moss MA, Reed DK, Cratic-McDaniel S, Hoh JH et Rosenberry TL (2005) Amyloid-beta protofibrils differ from amyloid-beta aggregates induced in dilute hexafluoroisopropanol in stability and morphology. *J Biol Chem* 280: 2471-2480.
- Nick Pace C et Martin Scholtz J (1998) A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins. *Biophysical Journal* 75: 422-427.
- Nilsson MR (2004) Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 34: 151-160.
- Nilsson MR et Raleigh DP (1999) Analysis of amylin cleavage products provides new insights into the amyloidogenic region of human amylin. *J Mol Biol* 294: 1375-1385.
- Nishi M, Chan SJ, Nagamatsu S, Bell GI et Steiner DF (1989a) Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5738-5742.
- Nishi M, Sanke T, Seino S, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB, Bell GI et Steiner DF (1989b) Human islet amyloid polypeptide gene: complete nucleotide sequence, chromosomal localization, and evolutionary history. *Mol Endocrinol* 3: 1775-1781.

- O'Brien TD, Westermark P et Johnson KH (1991) Islet amyloid polypeptide and insulin secretion from isolated perfused pancreas of fed, fasted, glucose-treated, and dexamethasone-treated rats. *Diabetes* 40: 1701-1706.
- Ohlsson H, Karlsson K et Edlund T (1993) IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo j* 12: 4251-4259.
- Olokoba AB, Obateru OA et Olokoba LB (2012) Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J* 27: 269-273.
- Opie EL (1901) THE RELATION OF DIABETES MELLITUS TO LESIONS OF THE PANCREAS. HYALINE DEGENERATION OF THE ISLANDS OF LANGERHANS. *J Exp Med* 5: 527-540.
- Padrick SB et Miranker AD (2002) Islet amyloid: phase partitioning and secondary nucleation are central to the mechanism of fibrillogenesis. *Biochemistry* 41: 4694-4703.
- Paravastu AK, Leapman RD, Yau WM et Tycko R (2008) Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18349-18354.
- Park YJ, Woo M, Kieffer TJ, Hakem R, Safikhani N, Yang F, Ao Z, Warnock GL et Marzban L (2014) The role of caspase-8 in amyloid-induced beta cell death in human and mouse islets. *Diabetologia* 57: 765-775.
- 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. *J Biol Chem* 284: 11982-11991.
- Pearse AGE, Ewen SWB et Polak JM (1972) The genesis of apudamyloid in endocrine polypeptide tumours: histochemical distinction from immunamyloid. *Virchows Archiv B* 10: 93.

- Porat Y, Kolusheva S, Jelinek R et Gazit E (2003) The human islet amyloid polypeptide forms transient membrane-active prefibrillar assemblies. *Biochemistry* 42: 10971-10977.
- Porat Y, Mazor Y, Efrat S et Gazit E (2004) Inhibition of islet amyloid polypeptide fibril formation: a potential role for heteroaromatic interactions. *Biochemistry* 43: 14454-14462.
- Praillet C, Grimaud J et Lortat-Jacob H (1998) Les protéoglycanes. (I) Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques. *M S-médecine Sciences* 14: 412-420.
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-144.
- 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, Fortier M, Babych M, Nguyen PT, Sebastiao M et Bourgault S (2021) Cell surface glycosaminoglycans exacerbate plasma membrane perturbation induced by the islet amyloid polypeptide. *The FASEB Journal* 35: e21306.
- 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. *Bioconjug Chem* 29: 517-527.
- Quittot N, Sebastiao M et Bourgault S (2017) Modulation of amyloid assembly by glycosaminoglycans: from mechanism to biological significance. *Biochem Cell Biol* 95: 329-337.
- Raleigh D, Zhang X, Hastoy B et Clark A (2017) The β -cell assassin: IAPP cytotoxicity. *J Mol Endocrinol* 59: R121-r140.

- Ratner RE, Dickey R, Fineman M, Maggs DG, Shen L, Strobel SA, Weyer C et Kolterman OG (2004) Amylin replacement with pramlintide as an adjunct to insulin therapy improves long-term glycaemic and weight control in Type 1 diabetes mellitus: a 1-year, randomized controlled trial. *Diabet Med* 21: 1204-1212.
- Reidelberger RD, Arnelo U, Granqvist L et Permert J (2001) Comparative effects of amylin and cholecystokinin on food intake and gastric emptying in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280: R605-R611.
- 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.
- Rivera JF, Costes S, Gurlo T, Glabe CG et Butler PC (2014) Autophagy defends pancreatic β cells from human islet amyloid polypeptide-induced toxicity. *J Clin Invest* 124: 3489-3500.
- 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.
- Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein C et Hsu SY (2004) Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem* 279: 7264-7274.
- Rozniakowski K, Fraczyk A, Galecki K, Wietrzyk J, Filip-Psurska B, Fraczyk J, Kaminski ZJ et Kolesinska B (2020) New Human Islet Amyloid Polypeptide Fragments Susceptible to Aggregation. *Chemistry & Biodiversity* 17: e2000501.
- Sakagashira S, Hiddinga HJ, Tateishi K, Sanke T, Hanabusa T, Nanjo K et Eberhardt NL (2000) S20G mutant amylin exhibits increased in vitro amyloidogenicity

and increased intracellular cytotoxicity compared to wild-type amylin. *Am J Pathol* 157: 2101-2109.

Sasahara K (2018) Membrane-mediated amyloid deposition of human islet amyloid polypeptide. *Biophysical Reviews* 10: 453-462.

Scrocchi LA, Ha K, Chen Y, Wu L, Wang F et Fraser PE (2003) Identification of minimal peptide sequences in the (8-20) domain of human islet amyloid polypeptide involved in fibrillogenesis. *J Struct Biol* 141: 218-227.

Sebastiao M, Quittot N et Bourgault S (2017) Thioflavin T fluorescence to analyse amyloid formation kinetics: Measurement frequency as a factor explaining irreproducibility. *Anal Biochem* 532: 83-86.

Silvestre RA, Rodríguez-Gallardo J, Jodka C, Parkes DG, Pittner RA, Young AA et Marco J (2001) Selective amylin inhibition of the glucagon response to arginine is extrinsic to the pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E443-449.

Singh S, Chiu CC, Reddy AS et de Pablo JJ (2013) α -helix to β -hairpin transition of human amylin monomer. *J Chem Phys* 138: 155101.

Smith CK, Withka JM et Regan L (1994) A thermodynamic scale for the beta-sheet forming tendencies of the amino acids. *Biochemistry* 33: 5510-5517.

Smith JA, Pease LG et Kopple KD (1980) Reverse Turns in Peptides and Protein. *Critical Reviews in Biochemistry* 8: 315-399.

Solomon JP, Bourgault S, Powers ET et Kelly JW (2011) Heparin binds 8 kDa gelsolin cross- β -sheet oligomers and accelerates amyloidogenesis by hastening fibril extension. *Biochemistry* 50: 2486-2498.

Sormanni P, Aprile FA et Vendruscolo M (2015) The CamSol method of rational design of protein mutants with enhanced solubility. *J Mol Biol* 427: 478-490.

- Stridsberg M, Sandler S et Wilander E (1993) Cosecretion of islet amyloid polypeptide (IAPP) and insulin from isolated rat pancreatic islets following stimulation or inhibition of beta-cell function. *Regul Pept* 45: 363-370.
- Sulatskaya AI, Kuznetsova IM et Turoverov KK (2011) Interaction of Thioflavin T with Amyloid Fibrils: Stoichiometry and Affinity of Dye Binding, Absorption Spectra of Bound Dye. *The Journal of Physical Chemistry B* 115: 11519-11524.
- Tenidis K, Waldner M, Bernhagen J, Fischle W, Bergmann M, Weber M, Merkle ML, Voelter W, Brunner H et Kapurniotu A (2000) Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties. *J Mol Biol* 295: 1055-1071.
- Terakawa MS, Lin Y, Kinoshita M, Kanemura S, Itoh D, Sugiki T, Okumura M, Ramamoorthy A et Lee YH (2018) Impact of membrane curvature on amyloid aggregation. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860: 1741-1764.
- Tilakaratne N, Christopoulos G, Zumpfe ET, Foord SM et Sexton PM (2000) Amylin receptor phenotypes derived from human calcitonin receptor/RAMP coexpression exhibit pharmacological differences dependent on receptor isoform and host cell environment. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 61-72.
- Toniolo C, Crisma M, Formaggio F et Peggion C (2001) Control of peptide conformation by the Thorpe-Ingold effect (C alpha-tetrasubstitution). *Biopolymers* 60: 396-419.
- Tracz SM, Abedini A, Driscoll M et Raleigh DP (2004) Role of aromatic interactions in amyloid formation by peptides derived from human Amylin. *Biochemistry* 43: 15901-15908.
- Tu LH et Raleigh DP (2013a) Role of aromatic interactions in amyloid formation by islet amyloid polypeptide. *Biochemistry* 52: 333-342.
- Tu LH et Raleigh DP (2013b) Role of aromatic interactions in amyloid formation by islet amyloid polypeptide. *Biochemistry* 52: 333.

- Wang H, Abedini A, Ruzsicska B et Raleigh DP (2014) Rationally Designed, Nontoxic, Nonamyloidogenic Analogues of Human Islet Amyloid Polypeptide with Improved Solubility. *Biochemistry* 53: 5876-5884.
- Wang J, Xu J, Finnerty J, Furuta M, Steiner DF et Verchere CB (2001) The prohormone convertase enzyme 2 (PC2) is essential for processing pro-islet amyloid polypeptide at the NH₂-terminal cleavage site. *Diabetes* 50: 534-539.
- 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.
- Watada H, Kajimoto Y, Kaneto H, Matsuoka T, Fujitani Y, Miyazaki J et Yamasaki Y (1996) Involvement of the homeodomain-containing transcription factor PDX-1 in islet amyloid polypeptide gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 746-751.
- Westermarck P (1972) Quantitative studies on amyloid in the islets of Langerhans. *Ups J Med Sci* 77: 91-94.
- Westermarck P (1973) Fine structure of islets of Langerhans in insular amyloidosis. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat* 359: 1-18.
- Westermarck P (2011) Amyloid in the islets of Langerhans: thoughts and some historical aspects. *Uppsala J Med Sci* 116: 81.
- 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 et Grimelius L (1973) The pancreatic islet cells in insular amyloidosis in human diabetic and non-diabetic adults. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 81: 291-300.
- Westermarck P et Wilander E (1978) The influence of amyloid deposits on the islet volume in maturity onset diabetes mellitus. *Diabetologia* 15: 417-421.
- Westermarck P et Wilander E (1983) Islet amyloid in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes is related to insulin. *Diabetologia* 24: 342-346.
- Westermarck P, Wilander E, Westermarck GT et Johnson KH (1987) Islet amyloid polypeptide-like immunoreactivity in the islet B cells of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic and non-diabetic individuals. *Diabetologia* 30: 887-892.
- Wickbom J, Herrington MK, Permert J, Jansson A et Arnelo U (2008) Gastric emptying in response to IAPP and CCK in rats with subdiaphragmatic afferent vagotomy. *Regulatory Peptides* 148: 21-25.
- Williams KA et Deber CM (1991) Proline residues in transmembrane helices: structural or dynamic role? *Biochemistry* 30: 8919-8923.
- Williamson JA, Loria JP et Miranker AD (2009) Helix Stabilization Precedes Aqueous and Bilayer-Catalyzed Fiber Formation in Islet Amyloid Polypeptide. *Journal of Molecular Biology* 393: 383-396.
- Wiltzius JJ, Sievers SA, Sawaya MR, Cascio D, Popov D, Riek C et Eisenberg D (2008) Atomic structure of the cross-beta spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein Sci* 17: 1467.
- Wiltzius JJ, Sievers SA, Sawaya MR et Eisenberg D (2009) Atomic structures of IAPP (amylin) fusions suggest a mechanism for fibrillation and the role of insulin in the process. *Protein Sci* 18: 1521.
- Wimalawansa SJ (1997) Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol* 11: 167-239.

- Wineman-Fisher V, Tudorachi L, Nissim E et Miller Y (2016) The removal of disulfide bonds in amylin oligomers leads to the conformational change of the 'native' amylin oligomers. *Physical Chemistry Chemical Physics* 18: 12438-12442.
- Wu C et Shea JE (2013) Structural similarities and differences between amyloidogenic and non-amyloidogenic islet amyloid polypeptide (IAPP) sequences and implications for the dual physiological and pathological activities of these peptides. *PLoS Comput Biol* 9: e1003211.
- Xue C, Lin TY, Chang D et Guo Z (2017) Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R Soc Open Sci* 4: 160696.
- Zaidi M, Datta H, Bevis P, Wimalawansa S et MacIntyre I (1990) Amylin-amide: a new bone-conserving peptide from the pancreas. *Experimental Physiology* 75: 529-536.
- 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 X, St Clair JR, London E et Raleigh DP (2017a) Islet Amyloid Polypeptide Membrane Interactions: Effects of Membrane Composition. *Biochemistry* 56: 376-390.
- Zhang X, St. Clair JR, London E et Raleigh DP (2017b) Islet Amyloid Polypeptide Membrane Interactions: Effects of Membrane Composition. *Biochemistry* 56: 376-390.
- Zhu T, Wang Y, He B, Zang J, He Q et Zhang W (2011) Islet amyloid polypeptide acts on glucose-stimulated beta cells to reduce voltage-gated calcium channel activation, intracellular Ca²⁺ concentration, and insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 27: 28-34.