

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

INVESTIGATION EXPÉRIMENTALE ET COMPUTATIONNELLE DE L'INHIBITION DE L'AGRÉGATION
AMYLOÏDE DE L'*ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE* PAR DES GALLOTANNINS.

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
À LA MAITRISE EN BIOCHIMIE

PAR
JIHANE KHALIFA

MARS 2025

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.12-2023). 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

La soumission de ce mémoire marque la fin de deux années intenses et enrichissantes, qui ont contribué à mon développement tant sur le plan académique que personnel. Je tiens à exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui ont joué un rôle essentiel dans cette aventure mémorable et pleine de découvertes.

Tout d'abord, je remercie chaleureusement mon directeur de recherche, le Pr. Roger Gaudreault, et mon co-directeur de recherche, le Pr. Steve Bourgault, de m'avoir offert cette opportunité unique. Votre soutien constant, vos conseils et votre encadrement rigoureux ont été des piliers indispensables à la réalisation de ce projet. Je tiens également à exprimer ma gratitude à Trang pour son aide précieuse et son accompagnement tout au long du projet.

Un immense merci à toutes mes collègues et tous mes collègues du laboratoire Bourgault pour leur aide, leurs conseils et leur camaraderie, qui ont rendu chaque journée au laboratoire agréable et stimulante. Je tiens à adresser une mention spéciale à Vy, Laetitia, Shabeena et Arunima pour leur soutien moral et leur présence bienveillante, qui ont été une source inestimable de motivation tout au long de ce parcours.

À ma famille, mes plus fervents soutiens, merci du fond du cœur. Votre amour, votre appui quotidien et votre foi en moi m'ont portée jusqu'ici.

Enfin, un énorme merci à mon copain, Maïdenn, pour son soutien moral infaillible. Merci pour ton écoute, ta patience et ta sagesse. Que tu sois loin ou proche, tu as été à mes côtés durant chaque étape de cette aventure et je t'en suis profondément reconnaissante.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	viii
RÉSUMÉ.....	x
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE	2
1.1 Repliement protéique	2
1.1.1 Maladies associées aux dépôts amyloïdes.....	2
1.1.2 Propriétés des fibres amyloïdes.....	4
1.1.3 Mécanisme d'agrégation des fibres amyloïdes	5
1.2 Islet amyloid polypeptide.....	6
1.2.1 Fonctions biologiques	7
1.2.2 Structures.....	8
1.2.3 Agrégation.....	9
1.3 Pathologies associées à l'agrégation amyloïde de l'IAPP.....	11
1.3.1 Le diabète de type 2.....	11
1.3.2 Rôle de l'IAPP dans le diabète de type 2	12
1.3.3 Mécanismes de cytotoxicité	13
1.3.4 Liens avec la maladie d'Alzheimer	18
1.4 Approches thérapeutiques contre l'agrégation amyloïde	18
1.4.1 Stabilisation d'états non-amyloïdogéniques	18
1.4.2 Inhibition de l'élongation des fibres	19
1.4.3 Inhiber les interactions IAPP/cofacteurs	20
1.4.4 Anticorps dirigés contre les protéines amyloïdes.....	21
1.4.5 Pertinence de l'utilisation de molécules naturelles.....	22
1.5 Les polyphénols.....	23
1.5.1 Propriétés.....	23
1.5.2 Les gallotannins.....	24
1.5.3 Utilisation dans l'inhibition de l'agrégation amyloïde	25
1.6 Problématique et objectifs.....	28
1.6.1 Hypothèses	28
1.6.2 Objectifs.....	28

CHAPITRE 2 ARTICLE : Polyphenolic gallotannins 1,3,6-Tri-O-galloyl- β -D-glucose and corilagin attenuate IAPP self-assembly and cytotoxicity by primarily targeting secondary nucleation.....	29
2.1 Résumé.....	31
2.2 Abstract.....	32
Introduction.....	33
2.3 Materials and methods.....	35
2.3.1 Synthesis, purification and monomerization of IAPP.....	35
2.3.2 Preparation of gallotannin solutions.....	36
2.3.3 Kinetics of IAPP aggregation.....	36
2.3.4 Transmission electron microscopy.....	37
2.3.5 Circular dichroism spectroscopy.....	37
2.3.6 Steady-state fluorescence spectroscopy.....	37
2.3.7 Atomic force microscopy.....	37
2.3.8 Resazurin cell viability assay.....	37
2.3.9 Lactate dehydrogenase (LDH) release assay.....	38
2.3.10 Reactive oxygen species release assay.....	38
2.3.11 Annexin V assay.....	38
2.3.12 Live/dead assay.....	39
2.3.13 Molecular dynamics.....	39
2.4 Results.....	40
2.4.1 Gallotannins modulate the kinetics of IAPP amyloid formation.....	40
2.4.2 Gallotannins reshape the morphology of fibrils.....	43
2.4.3 Binding of gallotannins to monomeric IAPP by all-atom MD simulations.....	45
2.4.4 Corilagin inhibits fibril elongation and targets secondary nucleation.....	47
2.4.5 Corilagin protects pancreatic cells against IAPP-induced cytotoxicity.....	50
2.5 Discussion.....	51
2.6 Conclusion.....	56
2.7 Supporting information.....	57
CHAPITRE 3 DISCUSSION.....	62
3.1 L'effet des gallotannins sur la cinétique de l'agrégation de l'IAPP.....	63
3.2 L'effet des gallotannins sur la morphologie des fibres d'IAPP.....	64
3.3 Étude <i>in silico</i> des interactions entre l'IAPP et les gallotannins.....	66
3.3.1 Interactions des gallotannins avec la structure hélicoïdale de l'IAPP.....	66
3.3.2 Interactions des gallotannins avec la structure aléatoire de l'IAPP.....	66
3.4 Mécanisme d'action de la corilagine.....	68
3.5 Effet de la corilagine sur la cytotoxicité induite par l'IAPP.....	69
3.6 Limitations générales de l'étude.....	71
3.7 Impact de l'étude.....	73
CONCLUSION.....	75

RÉFÉRENCES77

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Représentation de l'organisation structurales d'une fibre amyloïde.	4
Figure 1.2 Mécanisme de la formation de fibres amyloïdes représentant les phases de nucléation, d'élongation et de saturation.	5
Figure 1.3 Représentation schématique de la maturation de l'IAPP à partir du proIAPP.	7
Figure 1.4 Fonctions biologiques régulées par l'IAPP.	8
Figure 1.5 Représentation des mécanismes de nucléation primaire et secondaire.	9
Figure 1.6 Les différents mécanismes de perturbation membranaire proposés pour l'IAPP.	15
Figure 1.7 Représentation des mécanismes liant l'agrégation de l'IAPP avec la pathologie du T2DM.	17
Figure 1.8 Principales étapes visées du mécanisme d'agrégation amyloïde par les principaux agents anti-agrégatifs.	22
Figure 1.9 Différentes classes et sous-classes de polyphénols.	24
Figure 2.1 Structures of IAPP and gallotannins.	35
Figure 2.2 β -TGG and corilagin modulate IAPP kinetics of amyloid assembly.	42
Figure 2.3 β -TGG and corilagin modulate the morphology of IAPP amyloid fibrils.	44
Figure 2.4 β -TGG and corilagin interact with IAPP mainly by hydrogen bonds, van der Waals, and π - π stacking.	46
Figure 2.5 Corilagin inhibits secondary nucleation.	49
Figure 2.6 Corilagin shows cytoprotective effects against IAPP cytotoxicity on INS-1E cells	51
Figure 2.7 Suggested mechanism of action of corilagin on IAPP amyloid aggregation.	55
Figure 2.8 Molecular dynamics information of IAPP with β -TGG or corilagin.	57
Figure 2.9 Analysis of β -TGG and corilagin structure in the presence of IAPP.	58
Figure 2.10 Corilagin forms clusters with mature IAPP fibrils without remodeling them.	59
Figure 2.11 IAPP forms larger aggregates in the presence of corilagin over time.	60
Figure 2.12 Corilagin has concentration-dependent cytoprotective effects against IAPP toxicity on CHO-K1 and INS-1E cells.	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Caractéristiques de certaines protéines amyloïdes associées à des pathologies.	3
Tableau 2.1 Hydrogen bonds and other interactions between IAPP and β -TGG or corilagin, including amino acids with hydrophobic side chains (shown in bold).....	47

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AD	Alzheimer's disease
AFM	Microscopie à force atomique
ANS	Acide 8-Anilino-1-naphthalènesulfonique
AP	Area Postrema
Aβ	Amyloïde β
BBB	Barrière hémato-encéphalique
CD	Dichroïsme circulaire
CHO	Cellules d'ovaires d'hamsters chinois
cJUN	Facteur de transcription JUN
CPE	Carboxypeptidase E
CTR	Récepteur de la calcitonine
DHE	Dihydroéthidium
EGCG	Epigallocatechine gallate
GAG	Glycosaminoglycane
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HGT	Gallotannin hydrolysable
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HREX	Échange de répliques Hamiltoniennes
IAPP	Islet amyloid polypeptide
LDH	Lactate déhydrogénase
MD	Dynamique moléculaire
MMPBSA	Molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area
PAM	Peptidylglycine α -amidating monooxygenase
PDB	Protein databank
PGG	Penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose
RAMP	Receptor-activity modifying protein
RE	Réticulum endoplasmique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMSD	Root mean square deviation

RMSF	Root mean square fluctuation
ROS	Reactive oxygen species
SAP	Sérum amyloïde P
SASA	Solvent-accessible surface area
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Tau	Tubulin-associated unit
TEM	Microscopie électronique à transmission
TGG	1,3,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose
ThT	Thioflavine T
TTR	Transthyrétine
T2DM	Diabète de type 2 mellitus
UPR	Unfolded protein response
WAS-406	2-acetamido-1,3,6-tri-O-acetyl-2,4-dideoxy-alpha-D-xylo-hexopyranose

RÉSUMÉ

Les amyloïdoses sont des maladies associées au mauvais repliement des protéines menant à la formation et à la déposition tissulaire d'agrégats protéiques insolubles, caractéristiques de pathologies comme la maladie d'Alzheimer et le diabète de type 2 (T2DM). Dans le T2DM, des dépôts amyloïdes constitués principalement de l'islet amyloid polypeptide (IAPP) s'accumulent dans les îlots de Langerhans, aggravant la progression de la maladie. Nonobstant que l'IAPP soit une hormone peptidique remplissant des fonctions biologiques essentielles, incluant le contrôle glycémique, son agrégation en contexte diabétique engendre une toxicité pancréatique, exacerbant les désordres métaboliques. L'identification de thérapies empêchant cette agrégation toxique est cruciale pour un traitement efficace du T2DM. Parmi les approches prometteuses, les polyphénols se distinguent par leurs propriétés anti-amyloïdes remarquables, entre autres attribuables à leurs groupements phénoliques. Dans cette étude, deux polyphénols, les gallotannins β -TGG et corilagine, ont été évalués pour leur capacité à inhiber l'agrégation et la toxicité de l'IAPP. Les résultats montrent que ces composés inhibent significativement la formation de fibres amyloïdes de l'IAPP et ce, principalement en empêchant l'élongation des filaments. Plus précisément, l'analyse mécanistique révèle que la corilagine agit directement sur la nucléation secondaire, une étape clé dans la formation des fibres amyloïdes matures. Cet effet ciblé réduit également la toxicité de l'IAPP envers les cellules β -pancréatiques INS-1E, établissant un lien direct entre la nucléation secondaire et la cytotoxicité. Ces travaux mettent en lumière le potentiel thérapeutique des gallotannins dans la lutte contre les maladies amyloïdes comme le T2DM. En neutralisant les processus d'agrégation et l'inflammation associée, ces composés pourraient prévenir les dommages aux cellules β et ralentir la progression de la maladie. Ces découvertes ouvrent la voie à de nouvelles recherches visant à optimiser les propriétés pharmacologiques des gallotannins pour explorer leur plein potentiel clinique.

Mots clés : IAPP, diabète de type 2, amyloïdes, polyphénols.

INTRODUCTION

Les polyphénols, une vaste famille de composés naturels, sont reconnus pour leurs nombreuses propriétés biologiques, notamment leurs effets antioxydants, anti-inflammatoires et neuroprotecteurs. Retrouvés chez diverses plantes, ils jouent un rôle clé dans la protection contre le stress oxydatif et l'altération des biomolécules. Leur capacité à interagir avec les protéines a suscité un intérêt particulier en recherche biomédicale, notamment dans le cadre des maladies impliquant un mauvais repliement protéique et leur agrégation tissulaire subséquente.

Parmi ces maladies, le diabète de type 2 (T2DM) est associé à l'agrégation anormale de l'Islet Amyloid Polypeptide (IAPP), une hormone peptidique sécrétée par les cellules- β du pancréas. Cette accumulation d'agrégats amyloïdes contribue à la dysfonction et à la mort des cellules- β , aggravant ainsi la progression de la maladie. Des études récentes suggèrent que certains polyphénols pourraient interférer avec ces processus pathologiques en stabilisant l'IAPP sous des formes non toxiques.

Dans ce contexte, les gallotannins, une sous-catégorie de polyphénols, présentent une piste intéressante en raison de leur capacité à former de multiples interactions non-covalentes avec les protéines. Ce mémoire présente l'effet de deux gallotannins spécifiques, le β -TGG et la corilagine, sur l'agrégation et la cytotoxicité de l'IAPP. À travers des approches expérimentales et computationnelles, ce travail de recherche vise à élucider leurs mécanismes d'action et à évaluer leur potentiel en tant qu'agents thérapeutiques contre le T2DM. Ces recherches pourraient ouvrir de nouvelles perspectives pour le développement de traitements basés sur des composés naturels afin de lutter contre les multiples maladies impliquant des agrégats protéiques pathologiques.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Repliement protéique

Le repliement protéique est un processus fondamental par lequel les protéines adoptent une structure tridimensionnelle fonctionnelle leur permettant d'accomplir leurs fonctions biologiques (Knowles, Vendruscolo *et al.* 2014). Cette structure est habituellement la plus thermodynamiquement stable dans l'environnement où la protéine agit (Knowles, Vendruscolo *et al.* 2014). Ce processus est guidé par des interactions intramoléculaires comme les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques, les forces de dispersion et les interactions avec le solvant (Dobson, Šali *et al.* 1998). La solubilité des protéines est essentielle pour l'homéostasie, car elle permet de les maintenir dans un état fonctionnel et soluble à des concentrations physiologiques (Knowles, Vendruscolo *et al.* 2014). Les chaperonnes moléculaires, des protéines spécialisées, jouent un rôle clé en prévenant l'agrégation précoce et en aidant les protéines à atteindre leur conformation native (Hartl, Bracher *et al.* 2011). Cependant, cet équilibre délicat peut être perturbé par des conditions environnementales stressantes ou encore lors de mutations génétiques, menant à un mauvais repliement protéique (Knowles, Vendruscolo *et al.* 2014). Ces protéines, souvent instables, sont rapidement éliminées par le système ubiquitine-protéasome ou par l'autophagie (Ciechanover and Kwon 2015). Cependant, il peut arriver que des protéines mal repliées échappent aux mécanismes de clairance et s'agrègent, ce qui peut provoquer des dysfonctionnements physiologiques (Knowles, Vendruscolo *et al.* 2014).

1.1.1 Maladies associées aux dépôts amyloïdes

L'accumulation d'agrégats protéiques est un phénomène associé à environ 50 maladies humaines (Chiti and Dobson 2017). Parmi celles-ci, certaines maladies connues sous le nom « amyloïdoses » sont particulièrement inquiétantes. Ces maladies se caractérisent par l'agrégation de protéines solubles en agrégats insolubles, formant des structures filiformes appelées fibres amyloïdes (Rambaran and Serpell 2008). La formation de ces fibres résulte souvent d'un mauvais repliement des protéines, conduisant à des pertes de fonction et à la génération d'intermédiaires toxiques (Obici, Perfetti *et al.* 2005, Giorgetti, Greco *et al.* 2018). Les amyloïdoses peuvent se manifester sous plusieurs formes, affectant divers organes comme le cœur, le pancréas, le cerveau et le foie (Obici, Perfetti *et al.* 2005). Elles peuvent être classées en fonction de leur cause : certaines sont héréditaires, comme l'amyloïdose à la transthyrétine, tandis que

d'autres sont acquises (Obici, Perfetti *et al.* 2005). Par exemple, l'amyloïdose à chaîne légère et l'amyloïdose AA réactive, les formes les plus courantes, sont souvent liées à des conditions médicales préexistantes, notamment l'inflammation chronique (Obici, Perfetti *et al.* 2005). Les symptômes varient en fonction des organes affectés et peuvent inclure fatigue, perte de poids, œdème, et dysfonctionnement des organes touchés (Rambaran and Serpell 2008). À ce jour, il y a 24 protéines amyloïdes associées à des pathologies et identifiées chez l'humain (Obici, Perfetti *et al.* 2005). L'étude de ces structures offre des perspectives fondamentales pour comprendre non seulement les maladies associées, mais aussi la nature évolutive et fonctionnelle des protéines. Le tableau 1.1 identifie quelques amyloïdoses et les protéines qui leurs sont associées.

Tableau 1.1 Caractéristiques de certaines protéines amyloïdes associées à des pathologies.

Maladie	Protéine ou peptide	Principales structures secondaires à l'état natif soluble
Maladie d'Alzheimer	Amyloïde β	Intrinsèquement désordonnée
Maladie de Parkinson	α -synucléine	Intrinsèquement désordonnée – hélice- α
Maladie de Huntington	Huntingtine	Principalement intrinsèquement désordonnée
Sclérose latérale amyotrophique	Superoxyde dismutase 1	Feuillets- β
Amyloïdose à chaîne légère	Chaines légères de l'immunoglobuline	Feuillets- β
Amyloïdose systémique Sénile	Transthyrétine	Feuillets- β
Diabète de type 2	Islet amyloid polypeptide (IAPP)	Intrinsèquement désordonnée

1.1.2 Propriétés des fibres amyloïdes

Malgré leurs structures natives différentes, allant de conformations intrinsèquement désordonnées à des hélices α et feuillets β , la plupart des protéines et peptides amyloïdes ont la capacité de s'auto-assembler en structures fibrillaires partageant des caractéristiques structurales spécifiques (Knowles, Vendruscolo *et al.* 2014) (Figure 1.1). En effet, les fibres amyloïdes ont une structure densément compacte et hautement ordonnée, qui diffère fondamentalement des états natifs par son architecture quaternaires en feuillets- β -croisés (Rambaran and Serpell 2008, Knowles, Vendruscolo *et al.* 2014). Les fibres amyloïdes sont remarquablement similaires à l'échelle nanométrique et se distinguent par la formation d'un noyau fibrillaire dense (Knowles, Vendruscolo *et al.* 2014). Lorsqu'observées en microscopie électronique, les fibres amyloïdes apparaissent comme des structures filamenteuses non ramifiées, de quelques nanomètres de diamètre mais souvent de plusieurs micromètres de longueur (Rambaran and Serpell 2008). Elles sont composées de plusieurs protofilaments qui s'enroulent les uns autour des autres pour former des fibrilles matures (Knowles, Vendruscolo *et al.* 2014). Des études utilisant la cryo-microscopie électronique (cryo-EM) et la RMN à l'état solide confirment la nature générique des structures des différentes fibrilles, attribuée aux propriétés communes de l'épine dorsale polypeptidique qui soutient le motif de liaison hydrogène dans le cœur de la fibrille, et aux variations résultant de l'incorporation de différentes chaînes latérales dans l'architecture fibrillaire (Rambaran and Serpell 2008). Cette architecture leur confère une stabilité remarquable face aux agents chimiques et physiques (Meersman and Dobson 2006). Ces propriétés partagées permettent d'établir des parallèles entre différentes amyloïdoses et facilitent l'étude des mécanismes pathologiques communs.

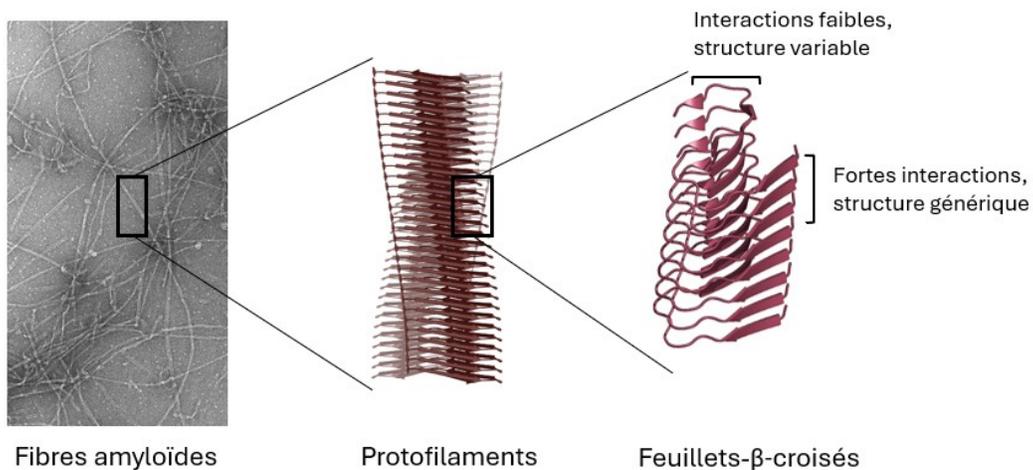


Figure 1.1 Représentation de l'organisation structurales d'une fibre amyloïde.

1.1.3 Mécanisme d'agrégation des fibres amyloïdes

L'agrégation des fibres amyloïdes suit un mécanisme complexe en plusieurs étapes (Figure 1.2). La phase initiale, la nucléation, est caractérisée par la formation d'oligomères transitoires instables (Almeida and Brito 2020). Cette étape est thermodynamiquement défavorable et donc cinétiquement lente (Knowles, Vendruscolo *et al.* 2014). Une fois qu'un noyau stable est formé, la phase d'élongation s'ensuit, durant laquelle les monomères se polymérisent rapidement pour former des fibres amyloïdes allongées (Almeida and Brito 2020). Des processus secondaires, tels que la fragmentation et la nucléation secondaire, jouent un rôle essentiel en accélérant la cinétique globale de l'agrégation (Törnquist, Michaels *et al.* 2018). Ces événements permettent la génération de nouveaux noyaux à partir de fragments de fibrilles, facilitant la propagation dans les tissus affectés. L'identification de ces étapes clés a permis de développer des stratégies thérapeutiques prometteuses visant à stabiliser les monomères ou à déstabiliser les intermédiaires toxiques, offrant un espoir pour ralentir ou même prévenir la progression des amyloïdoses.

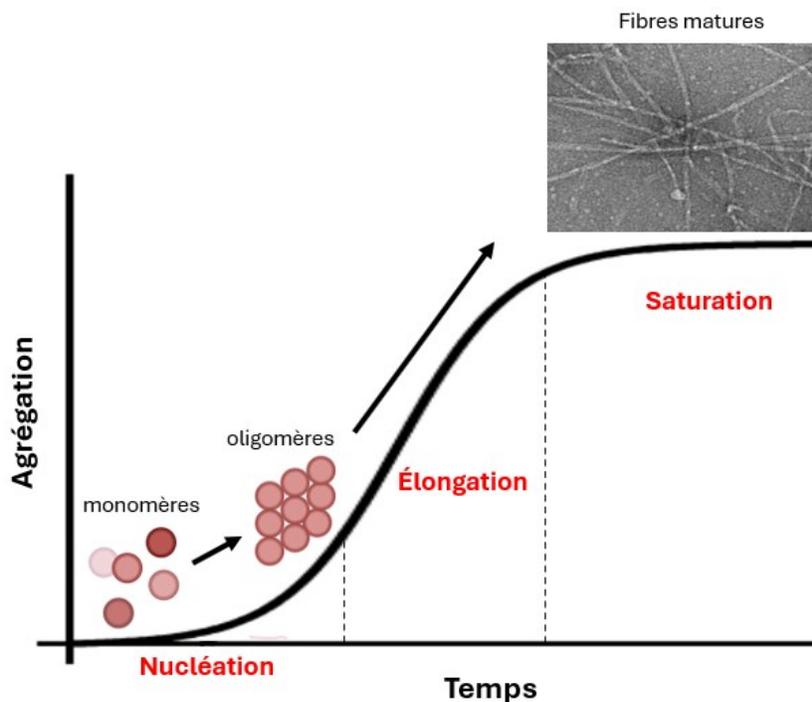


Figure 1.2 Mécanisme de la formation de fibres amyloïdes représentant les phases de nucléation, d'élongation et de saturation.

1.2 Islet amyloid polypeptide

Le « Islet Amyloid Polypeptide » (IAPP), aussi connu sous le nom d'amyline, est une hormone peptidique de 37 résidus coexprimée et co-sécrétée avec l'insuline par les cellules β -pancréatiques (Lutz 2022). Ce peptide a été isolé pour la première fois à partir d'extraits amyloïdes obtenus de pancréas de patients diabétiques de type 2 (Montane, Klimek - Abercrombie *et al.* 2012). Le polypeptide est chargé positivement au pH physiologique, avec une charge nette variant de 2 à 4, en fonction des pKa de l'extrémité N-terminale et de His-18 (Akter, Cao *et al.* 2016). L'IAPP joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme énergétique, et les concentrations plasmatiques sont proportionnelles à la masse adipeuse (Montane, Klimek - Abercrombie *et al.* 2012). L'IAPP agit en coordination avec l'insuline à un ratio molaire insuline:IAPP compris entre 0.5 et 5% dans les cellules β (Montane, Klimek - Abercrombie *et al.* 2012). Le ratio est légèrement plus élevé en circulation, puisque l'IAPP est éliminée plus lentement que l'insuline (Kahn, Verchere *et al.* 1998). La relation étroite entre les deux hormones s'explique par la présence d'éléments promoteurs similaires dans les gènes de l'IAPP et de l'insuline, impliquant une régulation conjointe par le facteur de transcription PDX1 en réponse à des stimuli glycémiques (Macfarlane, Campbell *et al.* 2000). IAPP est exprimée au niveau des cellules β -pancréatiques (Kanatsuka, Makino *et al.* 1989). Synthétisée initialement sous forme du précurseur pro-IAPP de 67 résidus, l'IAPP mature est générée après plusieurs modifications post-traductionnelles critiques (Akter, Cao *et al.* 2016, Kiriyaama and Nochi 2018) (Figure 1.3). Ce processus inclut le clivage du pro-IAPP par les pro-hormone convertases PC1/3 et PC2, suivi par une amidation C-terminale réalisée par la carboxypeptidase E (CPE) et la peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (PAM) (Montane, Klimek - Abercrombie *et al.* 2012, Akter, Cao *et al.* 2016). Une fois ces étapes complétées, un pont disulfure se forme entre les résidus Cys2 et Cys7, stabilisant la structure finale du peptide. Ces modifications permettent à l'IAPP d'adopter une conformation fonctionnelle (Kiriyaama and Nochi 2018). L'IAPP mature est ensuite entreposé conjointement avec l'insuline dans la région halo des granules de sécrétion, avec l'insuline et le zinc dans la région centrale des granules de sécrétion (Westermarck, Li *et al.* 1996). L'IAPP est ensuite libérée de manière synchronisée avec l'insuline en réponse aux stimuli glycémiques par les cellules β pancréatiques (Kiriyaama and Nochi 2018, Lutz 2022). Ainsi, l'IAPP contribue à plusieurs rôles physiologiques importants.

ProIAPP

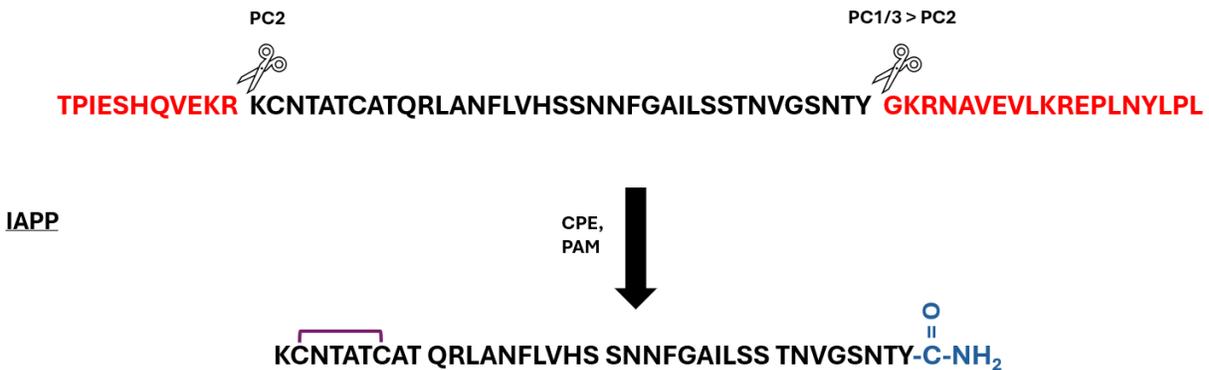


Figure 1.3 Représentation schématique de la maturation de l'IAPP à partir du proIAPP. Le processus implique le clivage du ProIAPP par les pro-hormone convertases PC1/3 et PC2, puis l'ajout du pont disulfure et l'amidation N-terminale par la carboxypeptidase E (CPE) et la peptidylglycine alpha-amidating monooxygénase (PAM).

1.2.1 Fonctions biologiques

L'IAPP est une hormone multifonctionnelle qui joue un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie glucidique et dans la signalisation métabolique à plusieurs niveaux (Figure 1.4). Elle agit comme un régulateur de divers processus physiologiques, tels que la vidange gastrique, l'inhibition de la sécrétion de glucagon, et la stimulation de la satiété (Montane, Klimek - Abercrombie *et al.* 2012). Ces actions permettent de moduler la réponse post-repas et d'empêcher des pics glycémiques excessifs. L'IAPP fait partie de la famille des calcitonines et est donc reconnue par les récepteurs de la calcitonine (CTR) (Akter, Cao *et al.* 2016, Lutz 2022). Les CTR sont typiquement complexés en hétérodimères avec des protéines « receptor activity modifying » (RAMP) (Akter, Cao *et al.* 2016). La combinaison de CTR et de différents RAMPs détermine la spécificité pour les différentes protéines de la famille des calcitonines (Bower and Hay 2016). Ainsi, trois récepteurs de l'IAPP ont été identifiés : AMY₁, hétérodimère de CTR et RAMP1; AMY₂, hétérodimère de CTR et RAMP2 et AMY₃, hétérodimère de CTR et RAMP3 (Bailey, Walker *et al.* 2012, Akter, Cao *et al.* 2016). L'IAPP se lie aux récepteurs AMY1 et AMY3 avec une forte affinité, et à AMY2 avec une affinité variable (Bower and Hay 2016). Ces récepteurs sont présents dans des zones clés du système nerveux central, comme l'*area postrema* (AP) (Akter, Cao *et al.* 2016). Cette structure du tronc cérébral est perméable à l'IAPP et permet au peptide de déclencher une cascade de signalisation intracellulaire, impliquant la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPC) et la libération de noradrénaline par les neurones de l'AP (Kiriya and Nochi 2018). Ces interactions conduisent à une réduction de la

vidange gastrique et à une régulation fine de la satiété, participant ainsi à une gestion optimale du métabolisme énergétique (Edwards, Gedulin *et al.* 1998). Ces propriétés sont corroborées par une augmentation des niveaux plasmatiques d'IAPP après les repas et leur diminution en état de jeûne, ainsi que par un gain de poids important chez les souris n'exprimant pas d'IAPP (Akter, Cao *et al.* 2016, Lutz 2022).

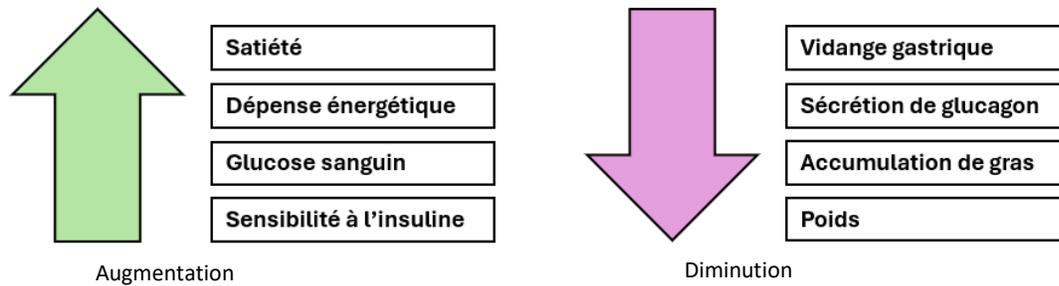


Figure 1.4 Fonctions biologiques régulées par l'IAPP.

1.2.2 Structures

En milieu aqueux, l'IAPP monomérique présente une structure native intrinsèquement désordonnée avec une conformation hélicoïdale transitoire dans le segment 5-20 (Kumar, Brown *et al.* 2014). Dans un environnement mimant la membrane cellulaire lipophile, comme en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS), l'IAPP peut adopter une structure en hélice α stabilisée entre les résidus 7-17 et 21-28, avec un coude formant un angle d'environ 30° au niveau des résidus 18-20, entre les deux hélices (Nanga, Brender *et al.* 2009). La conformation hélicoïdale est reconnue comme la structure bioactive du peptide (Bower and Hay 2016). En effet, la région 1-19 a été démontrée comme importante dans la liaison de l'IAPP à la membrane plasmique et aux récepteurs membranaires, principalement les récepteurs AMY_1 et AMY_3 (Bower and Hay 2016). Les domaines N- et C-terminaux de l'IAPP montrent une forte conservation entre les espèces, ce qui suggère leur importance fonctionnelle (Nishi, Chan *et al.* 1989), tandis que la région centrale de l'IAPP est moins bien conservée. En plus de ses structures monomériques désordonnée et hélicoïdale, il a été observé que l'IAPP peut s'agréger pour former des dépôts amyloïdes dans les îlots de Langerhans (Apostolidou, Jayasinghe *et al.* 2008).

1.2.3 Agrégation

1.2.3.1 Mécanisme d'agrégation

L'IAPP peut s'auto-assembler en fibres amyloïdes via un mécanisme de nucléation à deux étapes : une nucléation primaire suivie d'une nucléation secondaire (Almeida and Brito 2020, Axell, Hu *et al.* 2024) (Figure 1.5). La première phase correspond à l'initiation de l'assemblage des monomères en oligomères transitoires. Cette étape est lente et constitue la phase de latence de la courbe cinétique (Törnquist, Michaels *et al.* 2018, Axell, Hu *et al.* 2024). La nucléation secondaire, plus rapide, a lieu lorsque les protofibrilles ou fibrilles existantes catalysent la formation de nouveaux noyaux, augmentant drastiquement le taux d'agrégation (Törnquist, Michaels *et al.* 2018, Axell, Hu *et al.* 2024). Cette étape est cruciale pour la propagation des fibres amyloïdes (Törnquist, Michaels *et al.* 2018).

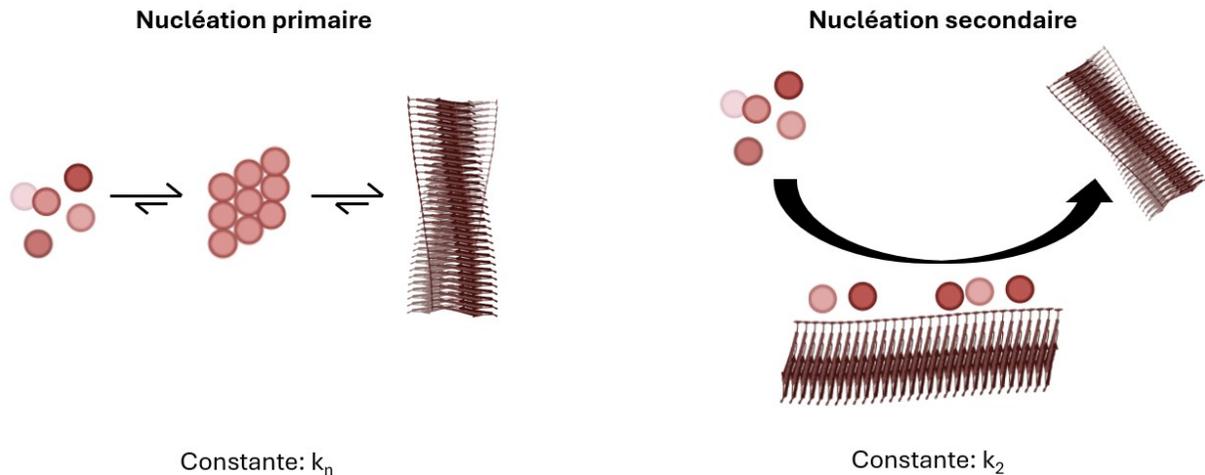


Figure 1.5 Représentation des mécanismes de nucléation primaire et secondaire.

1.2.3.2 Influence des facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent influencer l'autoassemblage de l'IAPP, autant *in vivo* qu'*in vitro*. En effet, certaines études suggèrent que l'agrégation commence avant la maturation de l'IAPP, avec la formation de fibres chez le précurseur pro-IAPP (Raimundo, Ferreira *et al.* 2020). Ces fibres peuvent ensuite être intégrées dans les fibres intracellulaires d'IAPP. Un défaut de traitement du pro-IAPP humain est donc lié à la formation d'amyloïdes et à la mort des cellules β . En effet, la présence d'hyperglycémie prolongée comme dans le cas du T2DM, pourrait mener à une surproduction de pro-IAPP, ce qui pourrait

déclencher l'agrégation de l'IAPP. Ce phénomène a été observé *in vitro*, où des cellules pancréatiques exprimant de grandes quantités de pro-IAPP sur quelques générations ont montré une augmentation importante du taux de mort cellulaire (Knight, Williamson *et al.* 2008).

Le pH est également un facteur qui joue un rôle crucial dans la stabilisation des agrégats des protéines. La cinétique de l'agrégation de l'IAPP dépend fortement du pH et est probablement influencée par l'état de protonation de l'imidazole du résidu His18 et du groupement amine de l'extrémité N-terminale (Abedini and Raleigh 2005). D'ailleurs, il a été observé qu'à un pH acide, le temps nécessaire à la formation de fibres amyloïdes est bien plus long qu'à un pH neutre (Jha 2009). Également, la température est un facteur de stress important qui module l'agrégation amyloïde. Celle-ci influence la stabilité conformationnelle et la solubilité en modifiant les interactions entre protéines. Une température plus élevée augmente le taux de diffusion des protéines, accélérant ainsi l'agrégation (Kayed, Bernhagen *et al.* 1999). La conformation des protéines au niveau des structures secondaires, tertiaires et quaternaires est modifiée lorsque la température augmente (Sabaté, Gallardo *et al.* 2005). D'ailleurs, il a été démontré qu'une température plus élevée augmente le taux de nucléation de l'IAPP, accélérant l'agrégation du peptide (Kayed, Bernhagen *et al.* 1999). Les forces de cisaillement, qui agissent dans des environnements physiologiques comme le flux sanguin ou lors des contraintes mécaniques dans les organes, favorisent également la fragmentation des fibres, renforçant leur dissémination (Törnquist, Michaels *et al.* 2018, Axell, Hu *et al.* 2024). Finalement, les forces ioniques ou les ions spécifiques peuvent aussi fortement influencer l'agrégation amyloïde (Ziaunys, Sakalauskas *et al.* 2021). Tous ces facteurs peuvent également favoriser le repliement de l'IAPP en feuillets- β , exposant des régions hydrophobes habituellement inaccessibles dans la conformation native du peptide (Kayed, Bernhagen *et al.* 1999).

1.2.3.3 Rôle des régions hydrophobes

Comme il a été vu précédemment, la région 20-29 est la moins conservée entre les différentes espèces. Parmi les 6 résidus substitués entre les séquences de l'IAPP humain et l'IAPP de rat, 5 se retrouvent dans la région 20-29 (Cao, Marek *et al.* 2013). L'IAPP de rats contient trois prolines dans cette région, qui sont énergétiquement défavorables dans la formation de feuillets- β (Cao, Marek *et al.* 2013). Ainsi, puisque l'IAPP de rats ne forme pas d'agrégats, de nombreuses études ont été menées sur les contributions du noyau amyloïdogénique 20-29 dans l'autoassemblage. En effet, Des études ont démontré que ce segment joue un rôle clé dans la stabilisation des fibrilles amyloïdes (Westermarck, Engström *et al.* 1989) et peut former des fibres même en absence des autres domaines d'IAPP (Doran, Kamens *et al.* 2012). Par ailleurs,

des outils informatiques et des simulations en dynamique moléculaire ont également montré que le segment hydrophobe 12-17 favorise l'auto-reconnaissance de l'IAPP, son agrégation et sa cytotoxicité (Fortier, Côté-Cyr *et al.* 2022). Ces segments hydrophobes interviennent dans la formation d'oligomères cytotoxiques et favorisent l'assemblage pathologique de l'IAPP (Doran, Kamens *et al.* 2012). De plus, la formation de fibres d'IAPP est favorisée par les bicouches lipidiques chargées négativement (Nanga, Brender *et al.* 2011, Zhang, St. Clair *et al.* 2017). L'extrémité N-terminale de l'IAPP s'insère dans la membrane, essentiellement guidée par des interactions électrostatiques (Lopes, Meister *et al.* 2007). Un processus en deux étapes est observé lors de la liaison du peptide, impliquant une transition conformationnelle d'une conformation principalement en hélice α à une conformation en feuillet β , formant finalement des structures fibrillaires ordonnées (Lopes, Meister *et al.* 2007). En effet, l'IAPP liée à la membrane induit la nucléation sur la surface membranaire, résultant en la formation d'oligomères et de fibres amyloïdes (Apostolidou, Jayasinghe *et al.* 2008, Zhang, St. Clair *et al.* 2017).

1.3 Pathologies associées à l'agrégation amyloïde de l'IAPP

1.3.1 Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 est la forme la plus courante de diabète, représentant plus de 90 % des cas et entraînant une augmentation significative du risque de mortalité chez les patients (Chatterjee, Khunti *et al.* 2017). Selon la Fédération Internationale du Diabète, 700 millions de personnes âgées de 20 à 79 ans pourraient vivre avec le T2DM d'ici 2045, un chiffre alarmant qui reflète un besoin urgent d'action (Association 2021). Le T2DM est une maladie hétérogène pouvant être déclenchée par des facteurs génétiques et environnementaux, notamment l'obésité, le tabagisme et l'inactivité physique (Chatterjee, Khunti *et al.* 2017, Ahmad, Lim *et al.* 2022). Les patients atteints de T2DM sont exposés à un risque accru de complications telles que les maladies cardiovasculaires, les rétinopathies, les neuropathies et les maladies rénales chroniques, qui peuvent réduire considérablement leur qualité de vie (Group 1998, Duckworth, Abraira *et al.* 2009). Par ailleurs, les coûts économiques liés à la gestion de ces complications constituent une charge colossale pour les systèmes de santé dans le monde entier (Association 2021). Le T2DM est un trouble métabolique caractérisé par une résistance à l'insuline et une sécrétion d'insuline altérée par les cellules β pancréatiques (Ahmad, Lim *et al.* 2022). Ces dérèglements métaboliques entraînent un déséquilibre glycémique chronique, qui peut progresser vers des états pathologiques avancés si la maladie n'est pas gérée efficacement (Ahmad, Lim *et al.* 2022). Une meilleure compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents est donc essentielle pour développer des thérapies ciblées.

1.3.2 Rôle de l'IAPP dans le diabète de type 2

L'un des signes distinctifs du T2DM est la présence de dépôts d'IAPP dans les cellules β -pancréatiques, observée chez plus de 90 % des patients (Apostolidou, Jayasinghe *et al.* 2008). Ces dépôts participent dans l'insuffisance des cellules β , exacerbant ainsi la dysrégulation métabolique et renforçant la progression de la pathologie du T2DM (Kanatsuka, Kou *et al.* 2018). La gravité de la maladie semble également corrélée avec le degré d'amyloïdose. En effet, la mutation S20G de l'IAPP favorise la formation de dépôts amyloïdes en plus grande quantité et à un rythme plus rapide *in vitro* que le peptide de type sauvage (Xu, Jiang *et al.* 2009). Cette mutation, observée chez environ 4% des patients diabétiques, est associée à une apparition précoce du diabète de type 2 (Xu, Jiang *et al.* 2009). Ceci pourrait être dû au fait que les conditions hyperglycémiques associées au T2DM entraînent des mécanismes de signalisation cellulaires déséquilibrés, augmentant la concentration locale d'IAPP (Montane, Klimek - Abercrombie *et al.* 2012). Physiologiquement, le pH des granules de sécrétion est d'environ 5.5, ce qui pourrait empêcher l'agrégation de l'IAPP (Akter, Cao *et al.* 2016). La présence de zinc au niveau des granules d'entreposage des cellules β pancréatiques a été démontrée comme étant un facteur inhibiteur de l'autoassemblage de l'IAPP (Nedumpully-Govindan and Ding 2015, Akter, Cao *et al.* 2016). Une fois dans le milieu extracellulaire, il est soupçonné que la présence d'insuline pourrait stabiliser l'IAPP en limitant son oligomérisation (Westermarck, Li *et al.* 1996, Akter, Cao *et al.* 2016). Dans un contexte diabétique, il a été démontré que le taux de zinc diminue de moitié et l'insuline est également en baisse, ce qui pourrait favoriser l'agrégation de l'IAPP (Guillausseau, Meas *et al.* 2008). En outre, le ratio d'IAPP par rapport à l'insuline augmente significativement dans les conditions de diabète, renforçant l'hypothèse d'un lien entre le développement de la maladie et l'agrégation pathologique de l'IAPP (Akter, Cao *et al.* 2016). Similairement, une autre hypothèse propose que des mécanismes de clairance défectueux dans un contexte diabétique pourraient empêcher l'élimination du peptide mal replié, ce qui permettrait son agrégation (Rivera, Gurlo *et al.* 2011, Cao, Marek *et al.* 2013). Certaines recherches montrent effectivement que la formation d'autophagosomes peut être diminuée dans un contexte de T2DM, ce qui favorise l'accumulation des agrégats dans les vacuoles autophagiques et déclenche une série d'effets cytotoxiques (Rivera, Gurlo *et al.* 2011).

1.3.3 Mécanismes de cytotoxicité

1.3.3.1 Toxicité des différentes conformations quaternaires de l'IAPP

Tel que le démontrent les corrélations entre les dépôts amyloïdes d'IAPP dans le pancréas et le T2DM, l'agrégation de l'IAPP constitue un processus nuisible pour les cellules β des îlots pancréatiques (Akter, Cao *et al.* 2016). L'observation de dépôts fibrillaires pancréatiques avait laissé initialement croire que les fibres matures d'IAPP représentent la forme toxique du peptide (Lorenzo, Razzaboni *et al.* 1994). Cependant, des études plus récentes ont démontré que les oligomères sont les principales espèces toxiques, responsables de divers dommages cellulaires (Bram, Frydman-Marom *et al.* 2014). En effet, lorsque des cellules β -pancréatiques en culture étaient en présence d'assemblages d'IAPP prélevés durant la phase de latence, les cellules affichaient plus de mort cellulaire que lorsqu'elles étaient exposées à des assemblages prélevés plus tard, lorsque des fibres matures ont été formées (Abedini, Plesner *et al.* 2016). Des études ont également révélé que la substitution de certains résidus critiques d'IAPP pouvait moduler sa capacité à induire l'apoptose, soulignant l'importance des interactions structurales spécifiques des oligomères dans la médiation de leur toxicité (Raleigh, Zhang *et al.* 2017). D'ailleurs, bien que les fibres matures soient moins cytotoxiques que les oligomères, elles ne sont pas entièrement inoffensives (Kakinen, Sun *et al.* 2019). Certaines fibres sont capables de relâcher des oligomères solubles dans l'environnement cellulaire, un processus qui peut réactiver leur potentiel toxique (Verma, Vats *et al.* 2015). De plus, la rigidité des dépôts amyloïdes matures peut perturber la structure tissulaire et altérer la communication intercellulaire dans les îlots de Langerhans (Raleigh, Zhang *et al.* 2017).

1.3.3.2 Perturbation membranaire

Plusieurs études indiquent que la cytotoxicité associée à l'IAPP est souvent initiée par une perturbation de la membrane plasmique (Zhang, St. Clair *et al.* 2017). Expérimentalement, l'étude des effets de l'IAPP sur la membrane cellulaire est souvent effectuée sur des cellules pancréatiques en culture. Alternativement, il est aussi possible d'utiliser des modèles membranaires tel que des liposomes afin d'investiguer les interactions du peptide avec la bicouche lipidique. Puisque la capacité de l'IAPP à perturber les membranes dépend de la composition de celles-ci, le choix de modèle membranaire est important (Raleigh, Zhang *et al.* 2017).

Au contact avec les membranes synthétiques, il y a une augmentation dans la formation de fibres, ce qui peut être associé avec une perméabilité membranaire accrue (Knight, Williamson *et al.* 2008). Cette

catalyse est importante plus la membrane est chargée négativement, confirmant l'affinité de l'IAPP avec les membranes anioniques (Zhang, St. Clair *et al.* 2017). L'interaction de l'IAPP avec les membranes synthétiques montre également un changement conformationnel vers une structure hélicoïdale, avec l'hélice située parallèlement à la surface de la membrane (Apostolidou, Jayasinghe *et al.* 2008). Selon certaines recherches, l'IAPP humain interagirait initialement avec les membranes via sa région N-terminale (Knight, Williamson *et al.* 2008). Le résidu His18 jouerait un rôle important dans l'orientation de l'IAPP sur la membrane (Alghrably, Czaban *et al.* 2019). Les oligomères d'IAPP interagiraient ainsi directement avec la membrane plasmique, provoquant une perméabilisation non spécifique par des perturbations structurales (Cao, Marek *et al.* 2013). Il y a quelques modèles qui ont été établis afin d'illustrer les mécanismes potentiels de perturbation membranaire par l'IAPP. Il a d'abord été proposé que l'IAPP provoque la formation de pores dans les membranes (Figure 1.6. a). En effet, une augmentation de la conductivité des membranes a été observée, perturbant l'homéostasie ionique intracellulaire (Kayed, Sokolov *et al.* 2004). Cependant, il n'est pas clair si ces pores sont persistants ou transitoires (Raleigh, Zhang *et al.* 2017). D'autres études ont soutenu un mécanisme de type « carpeting », similaire à l'effet de détergents (Figure 1.6. b). Ce mécanisme suggère une liaison de l'IAPP à la membrane, suivie d'un détachement qui éliminerait des parties de la surface membranaire, conduisant à sa perméabilisation (Lee, Sun *et al.* 2012). Il existe également des preuves associant les dommages membranaires à la croissance des fibrilles amyloïdes à la surface de la membrane (Engel 2009) (Figure 1.6. c).

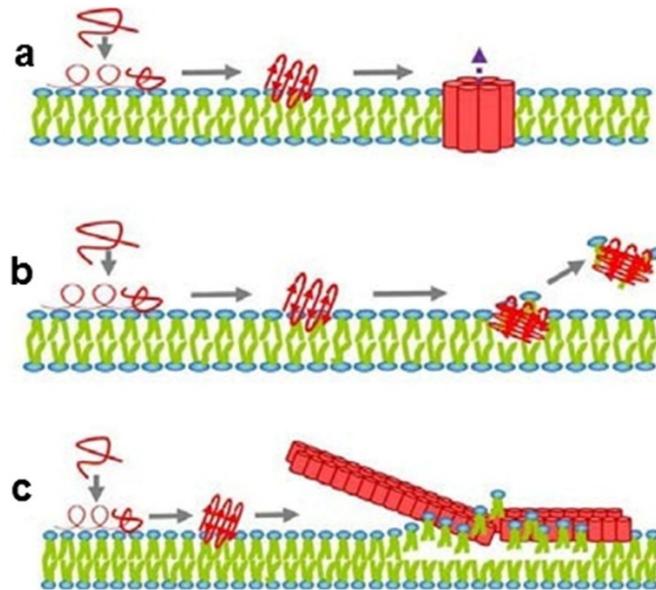


Figure 1.6 Les différents mécanismes de perturbation membranaire proposés pour l'IAPP. a) formation de pores au niveau de la membrane. b) « carpeting », impliquant un attachement à la membrane puis un détachement avec la perte de composantes de la membrane et c) croissance de fibres directement à la surface membranaire. Extrait de (Raleigh, Zhang *et al.* 2017).

1.3.3.3 Production d'espèces réactives de l'oxygène

Les autres mécanismes proposés de toxicité de l'IAPP incluent l'activation de récepteurs liés au stress oxydatif. En effet, des études ont montré le potentiel des oligomères d'IAPP à augmenter la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et à interrompre la fonction mitochondriale, induisant un stress oxydatif intracellulaire (Lutz 2022).

La génération de ROS lors du stress oxydatif a été fortement liée à une expression défectueuse du gène de l'insuline, à une réduction du contenu en insuline et à une sécrétion d'insuline altérée (Robertson and Harmon 2006). De plus, dans des tissus des îlots pancréatiques de sujets atteints de T2DM, les tissus contenant des dépôts amyloïdes ont également montré un marquage positif pour le stress oxydatif, confirmant encore une fois le lien étroit entre les dépôts d'IAPP et le T2DM (Sakuraba, Mizukami *et al.* 2002, Zraika, Hull *et al.* 2009). Plusieurs études ont corrélé la génération de ROS avec des mécanismes de cytotoxicité, incluant une peroxydation lipidique, ainsi qu'une altération des protéines membranaires et des structures intracellulaires, exacerbant ainsi les dysfonctionnements métaboliques des cellules β (Janciauskiene and Ahren 2000, Zraika, Hull *et al.* 2009). Le stress oxydatif peut également compromettre le fonctionnement mitochondrial, réduisant leur efficacité énergétique et amplifiant les dommages

apoptotiques (Zraika, Hull *et al.* 2009). Des traitements antioxydants ont également inhibé l'apoptose induite par l'IAPP (Konarkowska, Aitken *et al.* 2005).

1.3.3.4 Stress du réticulum endoplasmique

La forte demande en IAPP causée par la résistance à l'insuline mène à une production amplifiée de pro-IAPP, ce qui cause un stress au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Eizirik, Cardozo *et al.* 2008). Physiologiquement, le pro-IAPP est synthétisé dans l'appareil de Golgi, pour enfin se trouver dans les granules de sécrétion (Akter, Cao *et al.* 2016). Cependant, les peptides mal repliés sont visés par le système ubiquitine pour se faire dégrader via le protéasome (Raleigh, Zhang *et al.* 2017). Comme mentionné précédemment, les agrégats amyloïdes peuvent être résistants à ce système de clairance (Cao, Marek *et al.* 2013), particulièrement dans un contexte diabétique (Lutz 2022). Ce déséquilibre entre la demande de protéines correctement repliées et l'incapacité du RE à les produire active une réponse de stress au niveau du RE (Gross and Katz 2017). Cette réponse mène à une augmentation de l'expression de la protéine chaperone « binding immunoglobulin protein » (BiP), qui active des voies de signalisation comme la voie « unfolded protein response » (UPR) (Raleigh, Zhang *et al.* 2017). D'ailleurs, l'exposition prolongée des cellules β pancréatiques au stress du RE induit une réponse inflammatoire médiée par les cytokines pro-inflammatoires interleukine1- α et interleukine1- β (Masters, Dunne *et al.* 2010, Westwell-Roper, Dai *et al.* 2011). De plus, l'exposition aux oligomères d'IAPP active plusieurs voies apoptotiques (Raleigh, Zhang *et al.* 2017).

1.3.3.5 Apoptose

Tous ces événements mènent à la mort cellulaire programmée, activant plusieurs voies apoptotiques. Ces processus cellulaires peuvent être déclenchés par des agrégats intracellulaires ou extracellulaires (Westwell-Roper, Dai *et al.* 2011, Park, Warnock *et al.* 2017). Les voies qui régulent l'apoptose des cellules β en réponse à la formation d'agrégats d'IAPP ne sont pas complètement caractérisées, mais des travaux récents ont indiqué que la voie des cJUN kinases N-terminales (JNK) joue un rôle critique dans la réponse à l'IAPP chez les cellules β (Zhang, Liu *et al.* 2003, Subramanian, Hull *et al.* 2012). Cette voie est activée par une gamme de stimuli de stress, incluant le stress du RE, le stress oxydatif, l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires et à un taux élevé de glucose (Subramanian, Hull *et al.* 2012). La voie JNK régule l'apoptose des cellules β dans les cultures cellulaires et dans les îlots exposés à de fortes concentrations d'IAPP, ainsi qu'en réponse aux agrégats générés par l'IAPP endogène (Zhang, Liu *et al.* 2003).

Un autre mécanisme proposé est l'induction de la voie apoptotique extrinsèque à travers l'activation du récepteur membranaire FAS (Park, Woo *et al.* 2014), principalement par les cytokines inflammatoires (Park, Warnock *et al.* 2017). En effet, il a été démontré que l'interleukine1- β relâchée par les cellules pancréatiques pouvait activer le récepteur FAS (Park, Woo *et al.* 2014). L'activation de celui-ci mène ensuite à l'activation de la caspase 8, suivie par le clivage de la caspase 3 (Law, Lu *et al.* 2010). De plus, la suppression du récepteur FAS ou l'inhibition de la caspase 3 ont mené à une réduction de la réponse cytotoxique de l'IAPP, confirmant le lien avec cette voie apoptotique extrinsèque (Zhang, Liu *et al.* 2003, Law, Lu *et al.* 2010). Des études ont indiqué que le traitement exogène avec l'IAPP peut activer cette voie métabolique, suggérant un effet extracellulaire (Westwell-Roper, Dai *et al.* 2011). Dans l'ensemble, plusieurs réponses anormales suivent le dépôt de l'IAPP dans les cellules pancréatiques, soulignant sa contribution pathologique dans le diabète de type 2 (Figure 1.7).

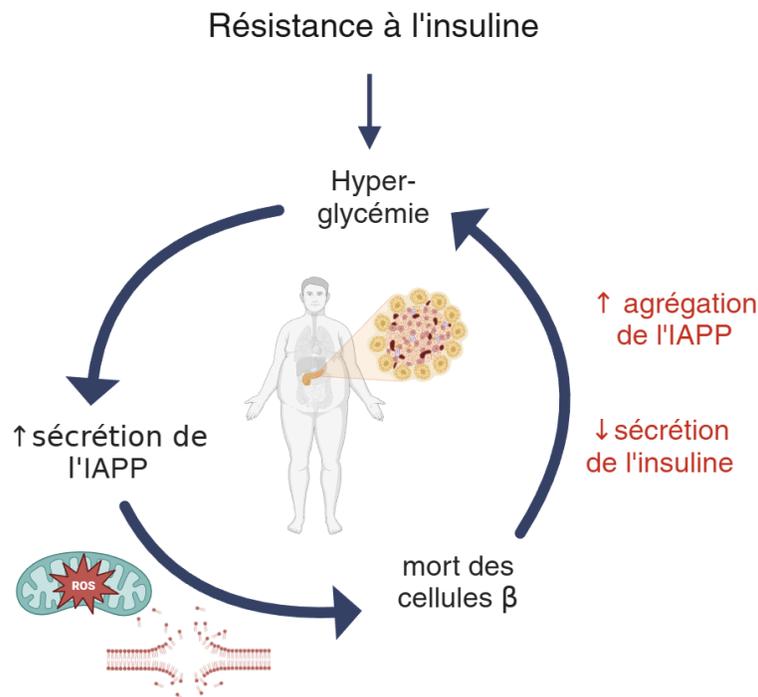


Figure 1.7 Représentation des mécanismes liant l'agrégation de l'IAPP avec la pathologie du T2DM.

1.3.4 Liens avec la maladie d'Alzheimer

En plus d'être impliqué dans le T2DM, il est intéressant de noter que de plus en plus d'évidences supportent l'hypothèse que l'IAPP pourrait également participer au développement de la maladie d'Alzheimer (AD). En effet, l'IAPP peut traverser la barrière hémato-encéphalique (BBB) afin d'accomplir ses fonctions physiologiques (Alrouji, Al-Kuraishy *et al.* 2023). Or, cela lui permet également de co-agréger avec le peptide amyloïde- β (A β), la principale protéine amyloïde impliquée dans l'AD (Götz, Lim *et al.* 2013). Ce phénomène accentue la pathologie de l'AD en accélérant potentiellement l'agrégation de l'A β et la formation de plaques, tel que le confirment les expériences de co-agrégation. En effet, la présence des deux amyloïdes accélère significativement leur taux d'agrégation et mène à la formation de fibres hybrides (Hu, Zhang *et al.* 2015). L'augmentation de la concentration pancréatique et cérébrale en IAPP favorise le mauvais repliement de l'A β (Fawver, Ghiwot *et al.* 2014, Zhang and Song 2017). Ainsi, l'interaction entre IAPP et A β mène à des dommages neuronaux (Ma, Yang *et al.* 2020). D'ailleurs, les patients diabétiques présentent un risque significativement plus élevé de développer l'AD (Biessels, Staekenborg *et al.* 2006) et l'hyperglycémie a été liée à la neurodégénérescence et à la démence (Karvani, Simos *et al.* 2019), démontrant davantage le lien étroit entre ces deux conditions. Des coupes histologiques de patients atteints d'AD ont révélé la présence de co-agrégats avec l'A β dans les plaques amyloïdes extraneuronales (De Felice, Gonçalves *et al.* 2022). D'ailleurs, il a été démontré que les mêmes segments importants pour l'auto-reconnaissance de l'IAPP, en plus du segment 20-29, interagissent avec A β et participent à la progression de l'AD (Andretto, Yan *et al.* 2010). Ces interactions inter-amyloïdes sont des cibles d'intérêt pour le développement d'interventions thérapeutiques et pour la conception d'inhibiteurs spécifiques.

1.4 Approches thérapeutiques contre l'agrégation amyloïde

Plusieurs stratégies sont étudiées pour inhiber l'agrégation de l'IAPP. Puisque les amyloïdes s'assemblent selon un processus à plusieurs étapes, différentes étapes du mécanisme d'agrégation sont visées afin d'identifier une approche optimale.

1.4.1 Stabilisation d'états non-amyloïdogéniques

La première stratégie consiste à stabiliser des formes correctement repliées du peptide. Par exemple, il est possible de stabiliser la forme monomérique native d'une protéine amyloïde, empêchant ainsi son mauvais repliement et son autoassemblage. En effet, un léger déplacement dans l'équilibre conformationnel entre les protéines correctement repliées et mal repliées peut avoir un impact significatif

sur la cinétique finale de la réaction (Asthana, Mallick *et al.* 2018). C'est d'ailleurs l'approche qui est utilisée par les stabilisateurs de transthyréline (TTR), la protéine responsable du développement d'une amyloïdose rare (Brailovsky, Rajapreyar *et al.* 2023). L'amyloïdogénèse de la TTR peut être inhibée par des composés qui se lient à la forme native de la protéine, diminuant ainsi la concentration de protéines potentiellement amyloïdogéniques (Klabunde, Petrassi *et al.* 2000). Plusieurs stabilisateurs de la forme monomérique de la TTR ont été identifiés, incluant le Tafamidis qui est approuvé pour le traitement de l'amyloïdose TTR (Maurer, Schwartz *et al.* 2018). En revanche, dû à la nature intrinsèquement désordonnée de l'IAPP, donc sans structure tertiaire stable, cette approche s'avère difficilement applicable (Asthana, Mallick *et al.* 2018). Cependant, il est possible de stabiliser d'autres conformations non-toxiques, comme les structures en hélice α (Asthana, Mallick *et al.* 2018). En effet, même s'il y a certaines évidences indiquant que les structures hélicoïdales peuvent constituer des intermédiaires dans le processus d'agrégation amyloïde (Hassanpour, De Carufel *et al.* 2014), cette conformation ralentit tout de même significativement la formation de feuillets β croisés. Par exemple, l'utilisation de polymères mimant les hélices α , ou encore de foldamères, se sont révélés efficaces pour inhiber la formation d'agrégats d'IAPP (Hassanpour, De Carufel *et al.* 2014).

Une autre stratégie intéressante serait de mimer le milieu physiologique des granules de sécrétion qui empêchent initialement l'autoassemblage de l'IAPP. Comme il a été mentionné précédemment, la présence d'ions de zinc dans les granules de sécrétion semble avoir des effets anti-agrégatifs sur l'IAPP (Brender, Hartman *et al.* 2010). L'ajout de zinc divalent près du résidu His-18 semble favoriser des espèces non-agrégatives (Nedumpully-Govindan, Yang *et al.* 2015).

1.4.2 Inhibition de l'élongation des fibres

Une autre approche étudiée pour l'inhibition de l'agrégation amyloïde est de viser les oligomères et les protofibrilles. Tel que mentionné précédemment, ces espèces sont reconnues comme étant les plus cytotoxiques, donc leur inhibition constitue une cible thérapeutique intéressante (Meisl, Kirkegaard *et al.* 2016). Il y a plusieurs petites molécules ayant démontré une inhibition importante de la formation d'agrégats d'IAPP. Notamment, des molécules naturelles extraites de fruits et de plantes, comme les polyphénols, ont des effets anti-agrégatifs intéressants. Par exemple, l'épigallocatechine gallate (EGCG), une molécule retrouvée notamment dans le thé vert, a démontré une inhibition de la nucléation de l'IAPP, ainsi qu'une protection contre les effets cytotoxiques du peptide chez des cellules β -pancréatiques INS-1E (Meng, Abedini *et al.* 2010). L'EGCG cible particulièrement l'élongation des espèces pré-fibrillaires en

interagissant avec les sites hydrophobes des oligomères d'IAPP (Palhano, Lee *et al.* 2013). Le polyphénol vise potentiellement l'étape d'élongation, particulièrement la nucléation secondaire (Palhano, Lee *et al.* 2013). Des expériences de dynamique moléculaire (MD) ont démontré que d'autres polyphénols, comme la curcumine et le resvératrol, stabilisent des intermédiaires non-toxiques à travers des ponts hydrogène, des interactions π - π et des effets hydrophobes (Nedumpully-Govindan, Kallinen *et al.* 2016). D'ailleurs, il a été proposé que la curcumine déstabilise les espèces α -hélicoïdales pré-fibrillaires (Sparks, Liu *et al.* 2012). Cependant, il semble que la curcumine ne soit efficace contre l'agrégation de l'IAPP qu'à des doses élevées, engendrant ainsi une certaine cytotoxicité par elle-même (Daval, Bedrood *et al.* 2010). Le resvératrol, retrouvé dans le vin rouge, semble empêcher l'empilement des cycles aromatiques dans les fibres, empêchant ainsi leur élongation (Jiang, Li *et al.* 2011).

En plus des polyphénols, plusieurs analogues peptidiques ont été conçus afin d'inhiber la formation de fibres amyloïdes. Typiquement, ces peptides contiennent la séquence d'auto-reconnaissance de l'IAPP en plus de motifs spécifiques permettant de bloquer l'élongation des fibres et la formation de feuillet β (Asthana, Mallick *et al.* 2018). Ainsi, une stratégie couramment utilisée est l'utilisation de prolines, permettant de perturber la formation de feuillet β (Soto, Kindy *et al.* 1996). C'est la stratégie utilisée pour le développement de la pramlintide, un analogue de l'IAPP utilisé pour le traitement du T2DM (Wang, Ridgway *et al.* 2015). Il est également possible d'utiliser les forces de répulsions électrostatiques pour inhiber la croissance des fibres d'IAPP en substituant certains résidus par des résidus chargés, augmentant ainsi leur solubilité et diminuant leur capacité à s'auto-assembler (Patil and Alexandrescu 2015).

1.4.3 Inhiber les interactions IAPP/cofacteurs

Lors de la formation d'agrégats amyloïdes, il y a plusieurs éléments facilitant l'assemblage des oligomères et stabilisant les fibres matures (Asthana, Mallick *et al.* 2018). Par exemple, la protéine sérum amyloïde P (SAP) est connue pour stabiliser plusieurs amyloïdes, dont l'A β (Pepys, Herbert *et al.* 2002). Un compétiteur du SAP, tel que l'acide R-1-[6-[R-2-carboxy-pyrrolidin-1-yl]-6-oxo-hexanoyl]pyrrolidine-2-carboxylique, peut être utilisé afin d'empêcher la stabilisation des fibres amyloïdes (Pepys, Herbert *et al.* 2002). Ceci résulte en l'élimination de certains agrégats (Richards, Cookson *et al.* 2015).

Il est également possible de cibler les interactions ayant lieu entre les amyloïdes et les glycosaminoglycanes (GAGs). En effet, on retrouve souvent les GAGs, des oligosaccharides négativement chargés, associés aux amyloïdes dans les agrégats fibrillaires (Iannuzzi, Irace *et al.* 2015). Certaines

données expérimentales indiquent que les GAGs pourraient favoriser la stabilité fibrillaire en interagissant de façon électrostatique avec les résidus chargés positivement (Iannuzzi, Irace *et al.* 2015). En mimant la liaison GAG-IAPP avec des fragments d'héparine contenant des monomères de deux ou huit saccharides, il a été possible de significativement diminuer la cytotoxicité de l'IAPP (Jha, Patil *et al.* 2011). De plus, l'inhibition de la synthèse des GAG en utilisant l'inhibiteur de synthèse WAS-406 a diminué la formation d'agrégats d'IAPP (Hull, Zraika *et al.* 2007).

Tel que décrit précédemment, l'interaction entre l'IAPP et la membrane cellulaire semble également jouer un rôle important dans la catalyse de l'autoassemblage de l'IAPP, ce qui fait de l'interaction peptide-membrane une cible potentielle des traitements anti-agrégatifs (Asthana, Mallick *et al.* 2018). Patil *et al.* ont exploré cette interaction en synthétisant une variante de l'IAPP ayant cinq résidus chargés négativement par des résidus hydrophobes afin d'empêcher sa liaison avec la membrane. Cependant, les expériences n'ont pas donné les résultats attendus. Le peptide n'a pas démontré d'effets contre la cytotoxicité de l'IAPP et a même contribué à nucléer l'agrégation amyloïde (Patil and Alexandrescu 2015). Néanmoins, le développement de ces approches constitue une stratégie thérapeutique prometteuse.

1.4.4 Anticorps dirigés contre les protéines amyloïdes

Il y a aussi la possibilité d'utiliser des anticorps monoclonaux spécifiques contre différentes espèces amyloïdes afin de mener à leur élimination par le système immunitaire. C'est d'ailleurs la stratégie utilisée par Aducanumab et Lecanemab, deux anticorps monoclonaux dirigés contre les espèces oligomériques et fibrillaires de l'A β dans la maladie d'Alzheimer (Shi, Chu *et al.* 2022). Aducanumab vise principalement les plaques de fibres amyloïdes matures, mais peut également se lier aux oligomères solubles (Wu, Ji *et al.* 2023). Lecanemab est plus spécifique aux protofibrilles solubles, l'espèce la plus neurotoxique de l'A β (Logovinsky, Satlin *et al.* 2016). Cependant, ceux-ci ne sont pas un remède, mais ils ralentissent la progression de la pathologie. Récemment, Donanemab, un troisième anticorps monoclonal visant spécifiquement les plaques amyloïdes a été présenté, avec une performance clinique prometteuse (Alawode, Heslegrave *et al.* 2021). Cependant, les anticorps monoclonaux contre l'A β peuvent avoir des effets secondaires graves chez les patients, allant de maux de tête à l'hémorragie cérébrale (Withington and Turner 2022).

Les anticorps monoclonaux représentent tout de même une stratégie intéressante pour lutter contre les dépôts d'IAPP. Certains sont même en cours d'essai et montrent des résultats prometteurs chez des modèles murins diabétiques (Phelps, Blase *et al.* 1996, Vogt, Roesti *et al.* 2021).

1.4.5 Pertinence de l'utilisation de molécules naturelles

En plus d'inhiber spécifiquement l'élongation des fibres d'IAPP, l'EGCG a démontré sa capacité à remodeler les fibres amyloïdes matures (Cao and Raleigh 2012). En plus des polyphénols mentionnés précédemment, une multitude ont démontré des propriétés anti-agrégatives contre l'agrégation amyloïde, visant différentes étapes du mécanisme d'agrégation (Korshavn, Jang *et al.* 2015) (Figure 1.8). D'ailleurs, l'utilisation de molécules naturelles en recherche pharmacologique dans le contexte des amyloïdes est une stratégie prometteuse pour le développement et la découverte de nouvelles thérapies (Velander, Wu *et al.* 2017). En effet, ces molécules ont souvent des structures pouvant inspirer le développement de nouveaux composés en plus de leurs propriétés bénéfiques pour la santé (Velander, Wu *et al.* 2017). Ainsi, l'étude des molécules naturelles, notamment les polyphénols, constitue une piste importante pour avancer la découverte de traitements anti-agrégatifs.

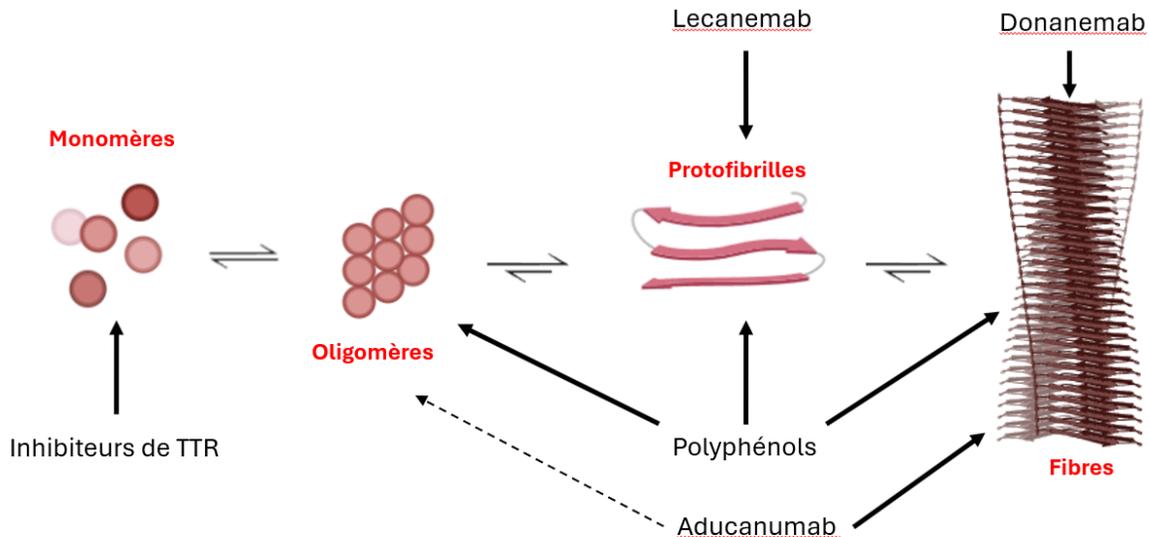


Figure 1.8 Principales étapes visées du mécanisme d'agrégation amyloïde par les principaux agents anti-agrégatifs.

1.5 Les polyphénols

1.5.1 Propriétés

Les polyphénols sont des composés naturels abondants dans les plantes (Abbas, Saeed *et al.* 2017). Ces molécules se caractérisent par une structure riche en cycles phénoliques (Rasouli, Farzaei *et al.* 2017) permettant de protéger les plantes contre les dommages causés par les radiations ultraviolettes du soleil ainsi que contre les agents pathogènes comme les virus, les bactéries et les champignons (Harborne and Williams 2000, Bertelli, Biagi *et al.* 2021). Les polyphénols sont aussi une partie intégrale de la diète des humains puisqu'ils se retrouvent communément dans les fruits, les légumes et les noix, ainsi que dans des breuvages comme le café, le vin et le thé vert (Bertelli, Biagi *et al.* 2021). Ainsi, la composition en polyphénols peut influencer la couleur et le goût des aliments (Pandey and Rizvi 2009)

Les polyphénols sont utilisés comme remèdes depuis des siècles, notamment dans la médecine traditionnelle chinoise (MTC), en raison de leurs importantes propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, en plus de leur profil sécuritaire (Rasouli, Farzaei *et al.* 2017). En effet, une augmentation de la consommation de polyphénols a été corrélée avec la diminution de plusieurs pathologies, dont plusieurs cancers, des infections virales et des maladies cardiovasculaires (Abbas, Saeed *et al.* 2017). D'ailleurs, les polyphénols suscitent un intérêt croissant dans la recherche pharmacologique pour leurs propriétés thérapeutiques. Certains polyphénols comme la quercétine et la curcumine ont démontré d'importants effets protecteurs contre plusieurs cancers dont le cancer du sein (Mohankumar, Sridharan *et al.* 2015, Tabrez, Jabir *et al.* 2020) et le cancer du côlon (Kee, Han *et al.* 2016, Reyes-Farias and Carrasco-Pozo 2019). Les polyphénols sont aussi connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires (Hussain, Tan *et al.* 2016) et antioxydantes (Rudrapal, Khairnar *et al.* 2022).

Les polyphénols sont divisés en plusieurs sous-classes, chacune avec des caractéristiques structurales et des propriétés physicochimiques et biologiques différentes (Figure 1.9).

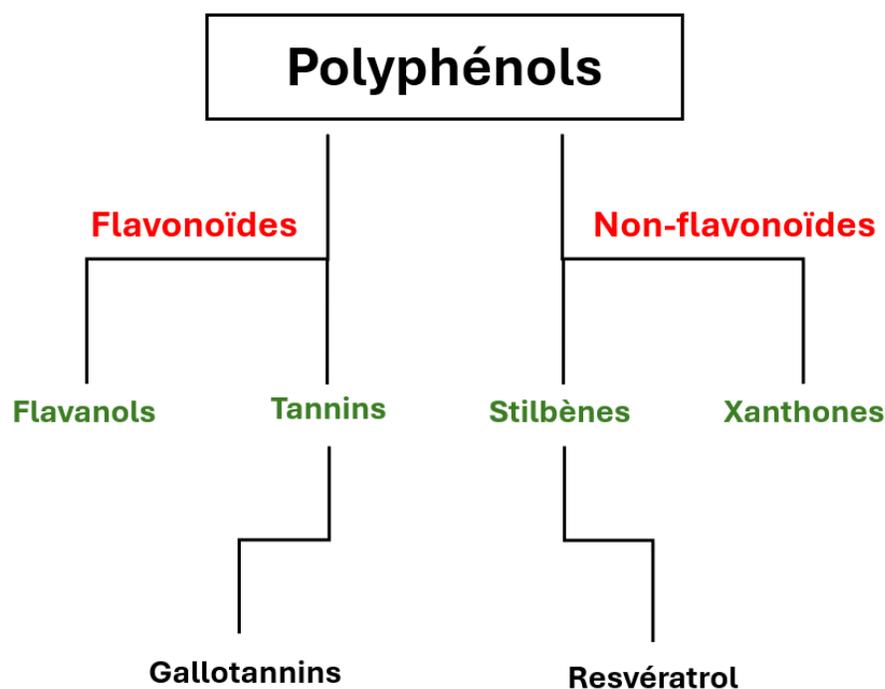


Figure 1.9 Différentes classes et sous-classes de polyphénols. Adapté de (Tain and Hsu 2022).

1.5.2 Les gallotannins

Les gallotannins hydrolysables (HGT) sont une classe de polyphénols de la famille des tannins qui se caractérisent par la présence d'un noyau central de glucose ramifié avec des estérifications (Khalifa, Bourgault *et al.* 2023). Ces composés se distinguent notamment par leur flexibilité conformationnelle et leur capacité à interagir avec une variété de cibles biologiques. Les HGTs, tels que l'acide tannique, le 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG), le 1,3,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose (TGG) et la corilagine, affichent des propriétés bioactives remarquables, notamment des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et neuroprotectrices (He 2022). Leur structure riche en groupes phénoliques leur permet de former des liaisons hydrogène et des interactions π - π avec des protéines, ce qui les rend particulièrement efficaces pour inhiber l'agrégation des peptides amyloïdes (He 2022). De plus, ces composés présentent une faible toxicité et leurs métabolites sont possiblement capables de traverser la barrière hémato-encéphalique, renforçant leur potentiel en tant que candidats thérapeutiques (Johnson, Kirk *et al.* 2019). En raison de leur efficacité à interagir avec plusieurs cibles ainsi que leur origine naturelle,

les HGTs suscitent un intérêt croissant pour le développement de stratégies dans le traitement des maladies associées au mauvais repliement des protéines.

1.5.3 Utilisation dans l'inhibition de l'agrégation amyloïde

Les HGTs ont démontré à plusieurs reprises leurs capacités anti-agrégatives et cytoprotectrices contre divers peptides amyloïdes (He 2022). En effet, leur structure riche en groupes phénoliques et leur flexibilité conformationnelle dynamique leur permettent d'interagir efficacement avec des protéines amyloïdogéniques à différentes étapes du mécanisme d'agrégation (Khalifa, Bourgault *et al.* 2023). Les HGTs se révèlent efficaces contre divers peptides amyloïdogéniques comme A β , la « tubulin-associated unit » (tau) et IAPP.

1.5.3.1 Acide tannique

La structure de l'acide tannique (TA) consiste en un anneau central de glucose avec 10 groupements galloyl contenant 25 OH phénoliques (Khalifa, Bourgault *et al.* 2023). Le TA a démontré des capacités thérapeutiques prometteuses dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. En effet, il a été montré que le TA réduit les agrégats d'A β à la fois *in vitro* et *in vivo* (Mori, Rezai-Zadeh *et al.* 2012). Cet effet est associé à l'inhibition de l'expression de BACE1 et de l'activité de la β -sécrétase, favorisant ainsi la voie non amyloïdogène. Le TA agit donc de manière post-translationnelle, mais réduit également directement l'activité enzymatique, même à faibles doses. De plus, le TA réduit la neuro-inflammation associée aux plaques A β et diminue les troubles cognitifs similaires à ceux de l'AD chez les souris (Mori, Rezai-Zadeh *et al.* 2012). Le TA désagrège également les fibres d'A β préformées, probablement en se liant aux extrémités des feuillettes β -croisés, déstabilisant ainsi leurs conformations. Le TA a également considérablement ralenti l'agrégation précoce du fragment R3 de la protéine tau, suggérant une inhibition de la phase de nucléation suivant une interaction avec les oligomères (Hu, Yang *et al.* 2021). Les calculs d'amarrage moléculaire ont suggéré que le TA se lie à la poche hydrophobe de R3 et induit une conformation en épingle-à-cheveux (hairpin) du peptide, stabilisant R3 dans une structure aléatoire et stoppant la formation des fibres (Yao, Gao *et al.* 2013, Hu, Hu *et al.* 2020). Cette liaison empêche également la région PHF6 d'interagir avec le centre hydrophobe de la chaîne peptidique, ce qui rend l'autoassemblage de tau difficile (Yao, Gao *et al.* 2013).

1.5.3.2 PGG

Le PGG est un HGT portant un anneau central de glucose avec cinq groupements galloyl contenant 15 groupements OH phénoliques (Wen, Dechsupa *et al.* 2023). Il peut être extrait de nombreuses plantes réparties dans le monde entier, notamment des plantes de *Rhus chinensis Mill*, des graines de *Bouea macrophylla* et des noyaux de *Mangifera indica* (Torres-León, Ventura-Sobrevilla *et al.* 2017).

Les données expérimentales ont montré des propriétés anti-agrégatives du PGG contre les peptides amyloïdes. En effet, le PGG a démontré une forte inhibition de la formation des fibres d'A β ainsi que la désagrégation des fibrilles préformées, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Fujiwara, Tabuchi *et al.* 2009). De manière intéressante, le PGG peut interférer avec l'oligomérisation précoce en s'assemblant de manière compétitive avec A β , induisant ainsi préférentiellement une hétéro-oligomérisation PGG-A β (Fujiwara, Tabuchi *et al.* 2009). De plus, l'ajout de PGG à des fibres d'A β préformées a montré une réduction significative des espèces oligomériques d'A β , telles que les dodécamères et les hexamères, ainsi qu'une importante diminution de la densité des fibres matures (de Almeida, Do *et al.* 2017). Le PGG a également montré des propriétés neuroprotectrices contre la toxicité induite par A β dans les cellules SK-N-SH (Fujiwara, Tabuchi *et al.* 2009). De plus, le PGG agirait en se liant à la région de liaison aux métaux située à l'extrémité N-terminale de l'A β , ainsi qu'à la première région centrale hydrophobe, ce qui rend plus difficile l'auto-agrégation de A β (de Almeida, Do *et al.* 2017). Puisque le PGG a un effet similaire sur l'amyloïdogénèse de A β 40 et A β 42, sa liaison à la région C-terminale de A β ne dépend probablement pas d'une séquence d'acides aminés spécifique (Fujiwara, Tabuchi *et al.* 2009). Le PGG a également démontré des effets inhibiteurs sur l'agrégation du peptide tau R3, bien qu'il ait démontré une certaine cytotoxicité dans les cellules SK-N-SH infectées par R3 (Hu, Yang *et al.* 2021). En outre, le PGG agit de manière concentration-dépendante pour inhiber la formation de fibres d'IAPP. Le PGG a également réduit de manière significative la cytotoxicité de l'IAPP dans des cellules en culture (Bruno, Pereira *et al.* 2013). De plus, le PGG a grandement réduit le déclin cognitif et la détérioration de la mémoire chez des souris Tg2576 (Fujiwara, Tabuchi *et al.* 2009), faisant de ce gallotannin un candidat prometteur pour le développement de médicaments ciblant les amyloïdes.

1.5.3.3 Corilagine

La structure de la corilagine se compose d'un anneau central de glucose avec trois groupements galloyl et neuf OH phénoliques. Identifiée dans environ 53 plantes à travers le monde, la corilagine présente une très faible toxicité, même à des doses élevées (Gaudreault, Hervé *et al.* 2021). Elle a également été utilisée

comme cofacteur pour stabiliser et/ou déstabiliser des systèmes colloïdaux, nécessitant des concentrations une à deux ordres de grandeur inférieures à celles de l'acide tannique (TA) pour atteindre le taux maximal de déstabilisation (Gaudreault, Hervé *et al.* 2021). D'ailleurs, la corilagine a démontré une forte inhibition de l'enzyme prolyl endopeptidase (PEP), qui pourrait jouer un rôle dans l'amyloïdogénèse cérébrale (Cunningham and O'Connor 1997). Elle a également montré une activité similaire à celle du TA en ce qui concerne la modulation de l'agrégation d'A β , en inhibant la β -sécrétase sans exercer d'inhibition significative sur l' α -sécrétase (Youn and Jun 2013). La corilagine a également permis d'améliorer les capacités cognitives de souris exprimant un phénotype d'Alzheimer (Chen, Zhuang *et al.* 2024). Malgré ces résultats intéressants, l'effet de la corilagine sur l'agrégation de l'IAPP reste très peu étudié.

1.5.3.4 TGG

Le TGG comporte un anneau central de glucose avec trois groupements galloyles et neuf OH phénoliques. Il peut être extrait de *Terminalia chebula* et de *Paeonia lactiflora*.

L'effet du TGG sur l'autoassemblage des amyloïdes est moins bien documenté que celui des HGT mentionnés précédemment (Khalifa, Bourgault *et al.* 2023). Néanmoins, il a été démontré que le TGG est efficace pour réduire l'autoassemblage et la formation de fibrilles du peptide tau R3 (Hu, Zhang *et al.* 2015). Deux anneaux phénoliques du TGG interagiraient simultanément avec les résidus Lys321 et Gly326 du peptide tau R3 (Hu, Yang *et al.* 2021). De plus, les données expérimentales ont montré que le TGG n'avait presque aucun impact sur la prolifération des cellules SK-N-SH, indiquant une absence de cytotoxicité. Empiriquement, la cytotoxicité des gallates de glucose augmente avec le nombre de branches autour du noyau de glucose, ce qui pourrait expliquer les variations entre les différents HGT (Hu, Yang *et al.* 2021). Similairement à la corilagine, le β -TGG a montré une forte inhibition de l'enzyme prolyl endopeptidase (PEP) (Lee, Jun *et al.* 2007). Ces caractéristiques et propriétés physiologiques suggèrent que le TGG mérite d'être étudié plus en profondeur dans le contexte de l'agrégation amyloïde.

Ainsi, les HGT sont des candidats prometteurs pour développer des traitements visant à atténuer les maladies associées aux protéines amyloïdes. Leur faible toxicité et leur biocompatibilité renforcent leur potentiel thérapeutique. Il serait d'autant plus pertinent d'approfondir les connaissances sur les plus petits HGTs, tels que la corilagine et le TGG, compte tenu de leur faible toxicité et de leur flexibilité conformationnelle par rapport aux autres HGT, ainsi que de leur potentiel à inhiber l'agrégation des polypeptides.

1.6 Problématique et objectifs

La double nature de l'IAPP, un peptide à la fois essentiel mais également pathogène par son caractère amyloïdogène, en fait un sujet de recherche majeur dans la compréhension des mécanismes à l'origine des maladies métaboliques. Le peptide joue des rôles physiologiques essentiels au maintien de l'homéostasie glycémique. Cependant, sa tendance à former des dépôts amyloïdes au niveau des cellules pancréatiques représente une problématique majeure. En effet, la prévalence des dépôts d'IAPP dans le T2DM et les preuves croissantes de son implication dans la maladie d'Alzheimer, renforcent l'importance d'étudier des composés pour l'inhibition de l'agrégation amyloïde afin de découvrir de nouveaux mécanismes d'action et de s'en inspirer pour développer des composés thérapeutiques contre les amyloïdoses.

1.6.1 Hypothèses

Les gallotannins seraient de bonnes molécules pour inhiber l'agrégation d'IAPP, potentiellement grâce à leur noyau de glucose, lequel pourrait accentuer leurs propriétés anti-agrégatives. Ainsi, l'hypothèse de ce projet stipule que les deux gallotannins, β -TGG et corilagine, pourraient cibler différentes étapes du processus d'agrégation amyloïde de l'IAPP, notamment la nucléation primaire, la nucléation secondaire et/ou l'élongation, et ainsi moduler l'agrégation et la cytotoxicité associée du peptide.

1.6.2 Objectifs

L'objectif global de ce projet de maîtrise est de déterminer l'effet de deux gallotannins, β -TGG et corilagine, sur l'agrégation amyloïde de l'IAPP. Pour ce faire, le projet a trois objectifs spécifiques :

- 1) Caractériser l'aspect biophysique de l'interaction entre l'IAPP et les gallotannins.
- 2) Explorer l'effet des gallotannins sur la cytotoxicité de cellules β pancréatiques.
- 3) Comprendre le mécanisme d'action des gallotannins contre l'agrégation de l'IAPP.

CHAPITRE 2

ARTICLE : Polyphenolic gallotannins 1,3,6-Tri-O-galloyl- β -D-glucose and corilagin attenuate IAPP self-assembly and cytotoxicity by primarily targeting secondary nucleation

Jihane Khalifa^{1,2,3}, Ridwan Sulaimon⁴, Mélanie Côté-Cyr^{1,3}, Phuong Trang Nguyen^{1,3}, Gilles Peslherbe⁴, Steve Bourgault^{1,3*}, and Roger Gaudreault^{1,2*}.

¹ Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, 2101 Rue Jeanne-Mance, Montréal, QC H2X 2J6, Canada; ² Quebec Centre for Advanced Materials, QCAM, Canada; ³ Quebec Network for Research on Protein Function, Engineering and Applications, PROTEO, Canada; ⁴ Department of Chemistry, Concordia University, Canada

Manuscrit en préparation pour soumission au journal *ACS Biochemistry*

Contribution des auteurs :

Jihane Khalifa : Conception des expériences, expérimentation (figures 1 à 7), recherche bibliographique, analyse des résultats, conception des figures et rédaction.

Ridwan Sulaimon : Expérimentation *in silico* (figure 4), rédaction (section 2.4.13).

Mélanie Côté-Cyr : Expérimentation au TEM (figures 2H et 3D).

Phuong Trang Nguyen : Réalisation des expériences, synthèse peptidique, supervision.

Gilles Peslherbe : Supervision, discussion des méthodes et résultats.

Steve Bourgault : Supervision, conception des expériences, analyse des résultats.

Roger Gaudreault : Supervision, conception des expériences, analyse des résultats.

2.1 Résumé

Le mauvais repliement des protéines et leur agrégation subséquente en dépôts amyloïdes insolubles sont associés à diverses maladies, notamment la maladie d'Alzheimer, les amyloïdoses systémiques et le diabète de type 2 (T2DM). Le T2DM se caractérise par le dépôt pancréatique de l'IAPP, une hormone peptidique jouant un rôle crucial dans la régulation du glucose. Cependant, l'IAPP peut mal se replier, formant des agrégats cytotoxiques et des fibres amyloïdes dans les îlots pancréatiques, ce qui induit une dysfonction et une mort des cellules β . Par conséquent, inhiber l'agrégation de l'IAPP représente une stratégie prometteuse pour traiter le T2DM. Les gallotannins naturels sont des modulateurs potentiels des amyloïdes, bien que leurs effets sur l'autoassemblage de l'IAPP soient peu étudiés. Cette étude examine les effets inhibiteurs sur l'agrégation de l'IAPP de deux gallotannins, le 1,3,6-tri-O-Galloyl- β -D-glucose (β -TGG) et la corilagine. À l'aide de la fluorescence à la thioflavine T, de la microscopie à force atomique et du dichroïsme circulaire, il a été observé que les gallotannins retardent l'autoassemblage de l'IAPP et réduisent la longueur et la quantité de fibres amyloïdes. Malgré leur similarité structurelle, la corilagine a montré une activité anti-agrégative nettement supérieure à des concentrations plus faibles par rapport au β -TGG. Les interactions monomère-gallotannin et fibrille-gallotannin ont été étudiées par des simulations en dynamique moléculaire, révélant des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes et un empilement π - π . En outre, la corilagine a démontré des effets cytoprotecteurs significatifs contre la toxicité et les dommages membranaires induits par l'IAPP sur les cellules INS-1E. L'analyse mécanistique a révélé que la corilagine agit principalement en inhibant la nucléation secondaire et en favorisant une agrégation alternative. Ensemble, ces résultats mettent en évidence le potentiel des deux gallotannins pour inhiber l'autoassemblage amyloïde, supportant le développement de nouveaux agents anti-agrégatifs.

Mots clés : IAPP, agrégation amyloïde, diabète de type 2, polyphénols, 1,3,6-tri-O-Galloyl- β -D-glucose, corilagine.

2.2 Abstract

Protein misfolding and subsequent aggregation into insoluble amyloid deposits, are associated with various diseases, including Alzheimer's disease, systemic amyloidosis, and type 2 diabetes mellitus (T2DM). T2DM is characterized by the pancreatic deposition of the islet amyloid polypeptide (IAPP), a peptide hormone that plays crucial in glucose regulation. However, IAPP can misfold, forming soluble cytotoxic aggregates and amyloid fibrils in the pancreatic islets, inducing β -cell dysfunction and death. Thus, inhibiting IAPP aggregation consists of a promising strategy for treating T2DM. Natural gallotannins are potential amyloid modulators, though their effects on amyloid self-assembly are not fully understood. This study examines two gallotannins, 1,3,6-tri-O-Galloyl- β -D-glucose (β -TGG) and corilagin, and their inhibitory effects on IAPP aggregation. Using thioflavin T fluorescence, atomic force microscopy, and circular dichroism, it was found that the gallotannins delay IAPP self-assembly and reduce the length and quantity of amyloid fibrils. Despite their structural similarity, corilagin exhibited markedly higher anti-aggregative activity at lower concentrations compared to β -TGG. Peptide monomer-gallotannin and fibril-gallotannin interactions were further investigated using all-atom molecular dynamics simulations, revealing hydrogen bonds, hydrophobic interactions and π - π stacking. Furthermore, corilagin provided significant cytoprotective effects against IAPP-induced cytotoxicity and membrane damage in INS-1E cells. Mechanistic analysis revealed that corilagin exerts its effects primarily by inhibiting secondary nucleation and facilitating off-pathway aggregation into cytocompatible species. Together, these findings highlight the potential of both gallotannins in inhibiting amyloid self-assembly and inspiring the development of anti-aggregative agents.

Keywords: IAPP, amyloid aggregation, type 2 diabetes, polyphenols, 1,3,6-tri-O-Galloyl- β -D-glucose, corilagin.

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) constitutes the most prevalent form of diabetes, representing over 90% of total cases (Zheng, Ley *et al.* 2018, Association 2021). T2DM is a metabolic disorder characterized by a decreased sensitivity to insulin and an impaired insulin secretion by pancreatic β -cells, leading to a glycemic imbalance (Roden and Shulman 2019, Association 2021). One of the main histologically observed hallmarks in most patients afflicted with T2DM is the presence of amyloid deposits in pancreatic islets, which exacerbates β -cell stress and degeneration (Kahn, Andrikopoulos *et al.* 1999). The main component of these amyloid deposits is the islet amyloid polypeptide (IAPP), a peptide hormone co-expressed, co-stored and co-secreted with insulin by pancreatic β -cells (Raleigh, Zhang *et al.* 2017). IAPP (Figure 2.1A, B), also referred to as amylin, mediates key physiological functions including regulation of satiety, glucose homeostasis, and inhibition of glucagon secretion (Akter, Cao *et al.* 2016, El Saghir, Farrugia *et al.* 2021). The imbalanced signaling mechanisms linked to the hyperglycemic conditions in T2DM lead to an increase in IAPP secretion, likely promoting its local aggregation in the extracellular space. This causes β -cell failure, causing further metabolic dysregulation and reinforcing T2DM pathology (Raleigh, Zhang *et al.* 2017). It was demonstrated that the severity of the disease correlates closely with the extent of pancreatic amyloidosis (Westermarck 1994, Zhang, Liu *et al.* 2014). IAPP amyloid formation follows a secondary nucleation-dominated aggregation, meaning that preformed fibrils catalyze the self-assembly process by acting as nucleation sites (Rodriguez Camargo, Chia *et al.* 2021). This process promotes and accelerates amyloid fibril formation and tissue accumulation in the form of cross β -sheets (Raleigh, Zhang *et al.* 2017) (Figure 2.1C). Furthermore, IAPP oligomers and pre-fibrillar aggregates have been identified as the main cytotoxic species, mediating membrane damage through pore formation, membrane destabilization, and/or lipid extraction (Lee, Sun *et al.* 2012, Sciacca, La Rosa *et al.* 2021). These soluble proteospecies also induce oxidative stress, inflammation, and apoptosis of β -cells (Raleigh, Zhang *et al.* 2017, Dubey, Patil *et al.* 2019). Thus, not only it is important to identify therapeutics that prevent pancreatic amyloid deposition to decrease β -cell degeneration, but it is also critical that such approaches do not lead to the accumulation of soluble pre-fibrillar proteotoxic species. However, the complexity of the aggregation process implicating a large ensemble of secondary and quaternary species makes it particularly challenging to identify multi-target components that can arrest, or modulate, amyloid formation at different stages, *i.e.* from the formation of transient oligomers to fibril elongation and subsequent accumulation.

Over the last decades, different strategies have been evaluated to prevent IAPP amyloid formation and associated cytotoxicity, including the clearance of pathogenic aggregates by monoclonal antibodies (Vogt,

Roesti *et al.* 2021), or the inhibition of fibril elongation by small molecules blocking secondary nucleation (Pithadia, Brender *et al.* 2016). Despite these efforts, there are currently no clinically approved drugs that specifically target IAPP aggregation, hence reinforcing the necessity to investigate new anti-aggregative agents. Interestingly, several natural polyphenols extracted from plants have shown capacity to mitigate amyloid aggregation and toxicity (Lakey-Beitia, Berrocal *et al.* 2015). Numerous molecules succeeded at preventing (Mishra, Bulic *et al.* 2008), limiting (Phan, Samarath *et al.* 2019), and/or reverting (Bieschke, Russ *et al.* 2010) amyloid fibril formation by targeting different mechanisms. Notably, it was revealed that epigallocatechin gallate (EGCG) prevents IAPP cytotoxicity by stabilizing non-toxic oligomers (Franko, Rodriguez Camargo *et al.* 2018). Besides, resveratrol, found in red grapes and other berries, was found to inhibit IAPP membrane binding, leading to a decrease of IAPP-induced cell death (Pithadia, Brender *et al.* 2016). These studies highlight that polyphenols could inhibit amyloid formation through diverse mechanisms by interacting with different proteospecies of the amyloid cascade, while usually being fully biocompatible. Among polyphenols, gallotannins are particularly interesting owing to their low molecular weight and their unique structures, characterized by a glucose core esterified with galloyl moieties. Notably, the presence of multiple phenolic rings is known to promote multiple interactions, including hydrogen bonds, hydrophobic interactions, and π - π stacking, which in turn can inhibit protein aggregation and amyloid fibril formation (Han, Yin *et al.* 2023). The glucose core could also potentially enhance fibril inhibition properties of gallotannins, as polyols demonstrated important anti-aggregative properties (Ahmad and Mishra 2022). Gallotannins like tannic acid and 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose (PGG) have shown anti-aggregative properties on amyloid- β (A β) and IAPP aggregation (Ono, Hasegawa *et al.* 2004, de Almeida, Do *et al.* 2017, Khalifa, Bourgault *et al.* 2023). More recently, corilagin showed interesting results *in vivo* against A β aggregate formation, highlighting a potential therapeutic role in the context of Alzheimer's disease (Chen, Zhuang *et al.* 2024), whose pathogenesis could also be linked to T2DM and IAPP aggregation (Li and Hölscher 2007, Ferreira, Raimundo *et al.* 2021). Recognizing the promising potential of gallotannins in mediating amyloid aggregation, it remains essential to investigate their capacity to inhibit IAPP aggregation and the associated molecular mechanisms.

Herein, we evaluated the effects of 1,3,6-tri-O-Galloyl- β -D-glucose (β -TGG) and corilagin (Figure 2.1D) on IAPP aggregation and cytotoxicity. Although β -TGG and corilagin share a similar structure, with a central glucose esterified with three galloyl moieties, corilagin showed a significantly higher anti-aggregative effect at lower concentrations. Corilagin demonstrated important cytoprotective effects against IAPP-

induced pancreatic cell death. Mechanistic studies suggested that corilagin mediates its effects mainly by inhibiting secondary nucleation and promoting off-pathway aggregation into cytocompatible aggregates.

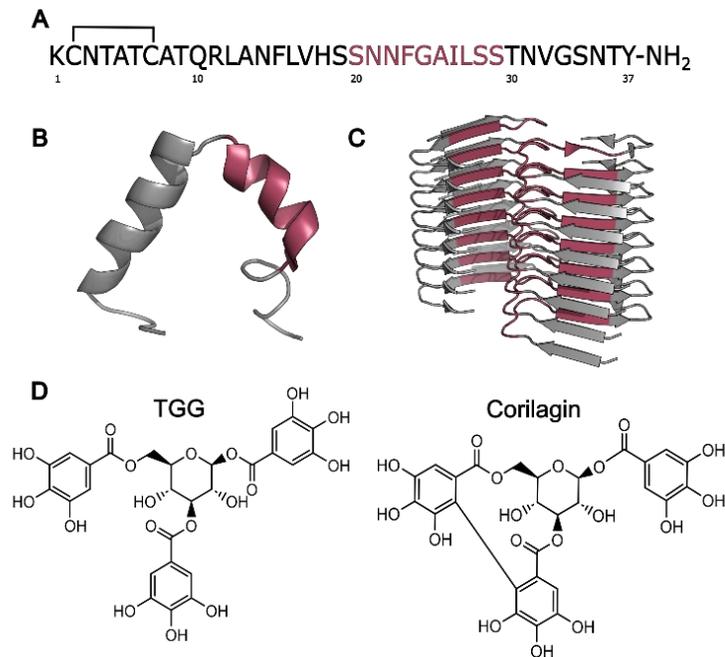


Figure 2.1 Structures of IAPP and gallotannins. A) Primary sequence of IAPP, with the 20-29 amyloidogenic sequence represented in pink. B) Structure of IAPP monomer obtained by nuclear magnetic resonance in presence of sodium dodecyl sulfate micelles at pH 7.3 (2L86.pdb) (Nanga, Brender *et al.* 2011). C) Structure of IAPP fibril observed by electron microscopy (6Y1A.pdb) (Röder, Kupreichyk *et al.* 2020). D) Chemical structure of 1,3,6-tri-O-Galloyl- β -D-Glucose (β -TGG) and corilagin.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Synthesis, purification and monomerization of IAPP

IAPP was synthesized on a solid support using Fmoc-based chemistry, with 2-(6-chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylamminium hexafluorophosphate (HCTU) employed as the coupling reagent, as previously described (Godin, Nguyen *et al.* 2019). Following cleavage from the resin, crude peptides were purified using reverse-phase HPLC, and the collected fractions were analyzed by Electrospray ionization Time-of-Flight (ESI-TOF) mass spectrometry. Disulfide bonds between Cys-2 and Cys-7 were formed through oxidation in dimethyl sulfoxide under gentle agitation. The resulting cyclized peptides were further purified by RP-HPLC, and fractions with a purity exceeding 95% were combined and lyophilized.

IAPP aliquots were then monomerized by adding 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (HFIP) at a concentration of 1 mg/mL and sonicating for 30 min. Samples were stored at -80°C until used. HFIP was evaporated with nitrogen right before use and IAPP was dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4 to the desired concentration.

2.3.2 Preparation of gallotannin solutions

1,3,6-Tri-O-Galloyl- β -D-Glucose was synthesized and provided by Pauvert *et al.* (Pauvert, Gaudreault *et al.* 2023). Corilagin was purchased from Cayman Chemicals. Gallotannins were solubilized in filtered milli-Q water to a stock concentration of 1 mM and were sonicated at room temperature (RT) for one hour. Samples were stored at 4 °C protected from light for a maximum duration of 1 month.

2.3.3 Kinetics of IAPP aggregation

Monomerized IAPP at 50 μ M in 20 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4 was added in the presence and absence of gallotannins to obtain 1:0, 1:1 and 1:4 IAPP:gallotannin molar ratios at a final concentration of 25 μ M. Thioflavin T (ThT) was added at a final concentration of 40 μ M. Samples were loaded in triplicates in a black-wall, clear-bottom non-binding surface 96-well plates. ThT fluorescence was monitored at 25 °C at 10-minute intervals over 15 hours at 440 nm excitation and 485 nm emission. The plate was shaken for 10 seconds before the first reading and followed by 5 seconds of shaking before each reading. For each experiment, the data collected from the triplicate wells were averaged, and the blank values were subtracted from the results of each sample. Each curve represents the average of at least four independent experiments (n=4). The kinetic curves were fitted on the AmyloFit website (https://amylofit.com/amylofitmain/projects_page/). $K+kn$ and $k+k_2$ values were determined using the secondary nucleation dominated, unseeded model (Meisl, Kirkegaard *et al.* 2016). For seeded kinetics, fibrillar seeds were prepared by assembling IAPP in Tris-HCl buffer pH 7.4 at 50 μ M for 72 hours. Circular dichroism (CD) spectroscopy and atomic force AFM imaging were performed to confirm β -sheet formation. IAPP seeds were then added at a final seed concentration of 5% in molar equivalents to monomeric IAPP. The solutions were loaded in triplicates in a 96-well plate and the aggregation kinetics were followed by monitoring the ThT fluorescence as described above.

2.3.4 Transmission electron microscopy

Samples were collected at the end of the kinetics assay and were loaded on glow-discharged carbon grids. Samples were negatively stained with 1.5% uranyl formate and were imaged using a FEI Tecnai G2 Spirit Twin microscope operating at 120 kV and equipped with an AMT NanoSprint15 MK2 CMOS Camera.

2.3.5 Circular dichroism spectroscopy

IAPP aliquots were dissolved to a final concentration of 50 μM in Tris-HCl buffer at a pH of 7.4. IAPP secondary structure was monitored in the presence, or in absence, of 1:1 IAPP:gallotannin molar ratios over 72 h. Samples were loaded into a 2 mm path length quartz cell and far-UV CD spectra were recorded from 189 nm to 260 nm at 25 °C with a J-815 CD spectropolarimeter (Jasco). Each spectrum represents the average of at least three independent experiments ($n=3$).

2.3.6 Steady-state fluorescence spectroscopy

Cross- β -sheet formation was monitored using endpoint ThT and ANS fluorescence. ThT was added to a final concentration of 100 μM and ANS was added to a final concentration of 40 μM . Fluorescence was monitored using a steady state spectrophotometer from Photon Technology International.

2.3.7 Atomic force microscopy

IAPP samples were assembled at 50 μM over 72 h in microtubes at 25 °C under quiescent conditions in presence or absence of polyphenols. Diluted samples in 5% v/v acetic acid were loaded on freshly cleaved mica and the excess liquid was absorbed with blotting paper. The mica was rinsed twice with filtered milli-Q H₂O. Samples were then imaged by AFM microscopy using a Bruker Multimode 8 AFM in ScanAsyst with a silicon tip (2–12 nm tip radius, 0.4 N/m force constant) on a nitride lever. The length and height of at least 100 fibrils were measured manually using Gwyddion software.

2.3.8 Resazurin cell viability assay

INS-1E rat β -pancreatic cells were cultured in RPMI-1640 media supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 10 mM HEPES, 2mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 50 μM β -mercaptoethanol. The cell cultures were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. INS-1E cells were plated into a black wall clear bottom tissue culture treated 96-well plate at a density of 20,000 cells per well. After a 48-hour incubation at 37 °C with 5% CO₂, cells were treated with IAPP at different

IAPP:corilagin ratios. Monomerized IAPP was solubilized in Tris-HCl at a final concentration of 75 μ M and was pre-incubated in absence, or in presence of 1 to 4 molar equivalents of corilagin to assess the cytotoxicity of the pre-fibrillar species formed in the presence of corilagin. Peptide: polyphenol solutions were applied to the cells to obtain a final IAPP concentration of 25 μ M. Treated cells were incubated for 24 hours, and cell viability was measured using the resazurin reduction assay. After a 3-hour incubation, fluorescence was measured at 440 nm excitation and 485 nm emission. Results were normalized according to the control wells. Data were expressed as average percentage of at least 3 independent experiments.

2.3.9 Lactate dehydrogenase (LDH) release assay

Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) were plated into a TC-treated black wall clear bottom 96-well plate at a density of 10,000 cells per well. After a 48-hour incubation at 37°C with 5% CO₂, cells were treated with IAPP alone or with corilagin at molar ratios of 1 to 4. Treated cells were incubated for 24 hours, and 50 μ L of the media was transferred to a clear 96-well plate. LDH release was monitored using the CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Kit (Invitrogen) and by reading the absorbance of each well at 490 nm using the SpectraMax i3 plate reader (Molecular Devices). The absorbance at 680 nm was also measured and was subtracted from all the results to remove the background noise. The percentage of LDH release was calculated relatively to the positive control.

2.3.10 Reactive oxygen species release assay

INS-1E cells were plated into a black wall clear bottom 96-well plate at a density of 20,000 cells per well and were incubated for 48 hours at 37 °C with 5% CO₂. Cells were treated with IAPP alone or with corilagin at molar ratios of 1 to 4. Treated cells were incubated for 24 hours, and 68 μ M dihydroethidium (DHE) was added to the cells. ROS release was measured by fluorescence readings at 518 nm excitation and 605 nm emission on a SpectraMax i3 plate reader (Molecular Devices). 400 μ M H₂O₂ was used for control conditions.

2.3.11 Annexin V assay

INS-1E cells were plated into a clear 6-well plate (Sarstedt) at a density of 150,000 cells per well and were incubated for 48 hours at 37 °C with 5% CO₂. Cells were then treated with IAPP at the IAPP:corilagin ratios described above and were incubated for 6 hours. Apoptosis was monitored using the eBioscience Annexin V Apoptosis Detection Kits kit by Invitrogen. Cells were washed with 1X Annexin-binding buffer and were

tagged with 15 μM of FITC-Annexin V and 1 μM of Propidium Iodide. After a 15-minute incubation period, the fluorophores were washed with 1X annexin-binding buffer. Cells were imaged by confocal microscopy using an inverted microscope with a Nikon A1R confocal using a 40X lens. Images were then analyzed and quantified using Fiji ImageJ.

2.3.12 Live/dead assay

INS-1E cells were plated into a clear 6-well plate (Sarstedt) at a density of 150,000 cells per well and were incubated for 48 hours at 37 °C with 5% CO₂. Cells were then treated with IAPP at the IAPP:corilagin ratios described above and were incubated for 24 hours. Ethidium bromide homodimer and calcein-AM were added to cells and incubated for 30 minutes. Cells were imaged with confocal microscopy using an inverted microscope with a Nikon A1R confocal using a 40X lens. Calcein-AM and ethidium bromide fluorescence were measured at 494 nm and 535 nm excitation and 518 nm and 617 nm emission, respectively. The images were processed with Fiji ImageJ.

2.3.13 Molecular dynamics

The solution structure of monomeric IAPP determined by NMR in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles (PDB ID: 2L86) (Nanga, Brender *et al.* 2011) was retrieved from the Protein Data Bank.

The IAPP monomer–ligand complex was prepared through the following protocol: (i) Ligand (TGG and Corilagin) .xyz structures (Gaudreault, van de Ven *et al.* 2002) were converted into GROMACS-compatible formats using ACPYPE (Sousa da Silva and Vranken 2012). The complex was embedded in a periodic dodecahedral simulation box, maintaining a 1-nm distance from the box walls. The starting configuration was established with IAPP and ligand separated by a distance equivalent to the size (3nm) of the monomer or fibril; (ii) the energy minimization was performed in a vacuum using steepest descent (SD) algorithms (EminVac); (iii) the system is solvated with TIP3P water molecules, then three chloride ions (Cl⁻) were added to ensure the neutrality of the system, followed by another round of energy minimization in solution using steepest descent (SD) algorithm. Harmonic restraints on selected bonds and water intramolecular bonds are applied using the LINCS and SETTLE algorithms, respectively ; (iv) the system was equilibrated under constant number of particles, volume and temperature conditions (NVT) at 300 K for 10 ns while retaining harmonic restraints; (v) the system was subsequently equilibrated under constant number of particles, pressure and temperature conditions at 1 bar for 10 ns; and (vi) a 2000-ns trajectory was then generated under unrestrained conditions. Simulations were conducted using GROMACS v2023.3 with the

AMBER99sb*-ILDNP force field (Aliev, Kulke *et al.* 2014). Temperature control at 300 K was maintained using the Nosé–Hoover thermostat with a coupling constant of 0.1 ps (Hoover 1985), while pressure was controlled at 0.987 atm using the Parrinello–Rahman barostat with a coupling constant of 2.0 ps. Nonbonded interactions were evaluated with a 1-nm cutoff for van der Waals and electrostatic interactions. Long-range electrostatic interactions were computed using the Particle Mesh Ewald method. All root-mean-square deviation (RMSD), root-mean-square fluctuation (RMSF), solvent accessible surface area (SASA), and hydrogen bonds analyses were conducted using GROMACS built-in tools and custom scripts. PyMOL molecular graphics system v. 3.1.3 was used for the visualization of molecules and structural transitions within the IAPP monomer-ligand or fibril-ligand complexes over the course of the simulation. Two-dimensional interaction maps were generated using BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2024 by Dassault Systems. Finally, overall planarity of β -TGG and corilagin was evaluated using UCSF Chimera 1.18 (Pettersen, Goddard *et al.* 2004).

2.4 Results

2.4.1 Gallotannins modulate the kinetics of IAPP amyloid formation

IAPP forms aggregates through a two-step nucleation mechanism, where monomers initially self-assemble during primary nucleation, followed by secondary nucleation, where the aggregation process is catalyzed as new monomers bind to pre-formed fibrils (Padrick and Miranker 2002). This process can be easily monitored by tracking ThT fluorescence, which increases upon binding of the dye to the cross- β -sheet quaternary structure of amyloid fibrils (Sebastiao, Quittot *et al.* 2017). This typically exhibits a sigmoidal kinetic profile with well-discernable lag, elongation, and saturation phases (Padrick and Miranker 2002). To evaluate the effects of gallotannins on IAPP kinetics of aggregation, β -TGG and corilagin were added at different molar ratios to the peptide solutions. These gallotannins were added to pre-monomerized IAPP, and ThT fluorescence was monitored every 10 min for 15 h to observe changes in the self-assembly process. The addition of β -TGG showed significant concentration-dependent decrease in total ThT fluorescence intensity (Figure 2.2A, C) and an increase in the lag time and half-time to reach the fluorescence plateau (Figure 2.2D, E). Addition of corilagin has a more pronounced effect on the endpoint ThT fluorescence, showing a significant decrease, even at the lowest ratio (1:0.4) (Figure 2.2B, C). At the highest molar ratio (1:4), ThT shows a complete inhibition of cross- β -sheet formation. Furthermore, the presence of corilagin decreased the lag and half times of IAPP aggregation (Figure 2.2D, E). To better understand the effects of the gallotannins on the kinetics of IAPP assembly, the elongation rate constant, k_+ , the primary nucleation rate constant k_n , and the secondary nucleation rate constant k_2 were inferred using the secondary

nucleations dominated fitting model (Meisl, Kirkegaard *et al.* 2016). Mathematical analysis following a secondary nucleation dominated fitting indicates that k_2 is higher than k_n , confirming that IAPP follows a secondary nucleation dominated aggregation (Figure 2.2F, G). At 1:1 molar ratio, β -TGG showed decreased primary and secondary nucleation rate constants, while corilagin significantly increased primary nucleation and decreased secondary nucleation rate constants. These results support the observed decrease of lag time and half-time observed with corilagin. Finally, samples collected at the end of the kinetic assays performed in 96-well microplates were visualized by TEM imaging. Supramolecular structures assembled in the presence of gallotannins were shorter and less defined compared to the IAPP fibrils obtained in the absence of polyphenols (Figure 2.2H). Furthermore, it was difficult to find fibrils in gallotannin-treated samples compared to IAPP alone. These observations suggest that β -TGG and corilagin decrease the formation of well-defined fibril formation by promoting the formation of less-defined nanostructures.

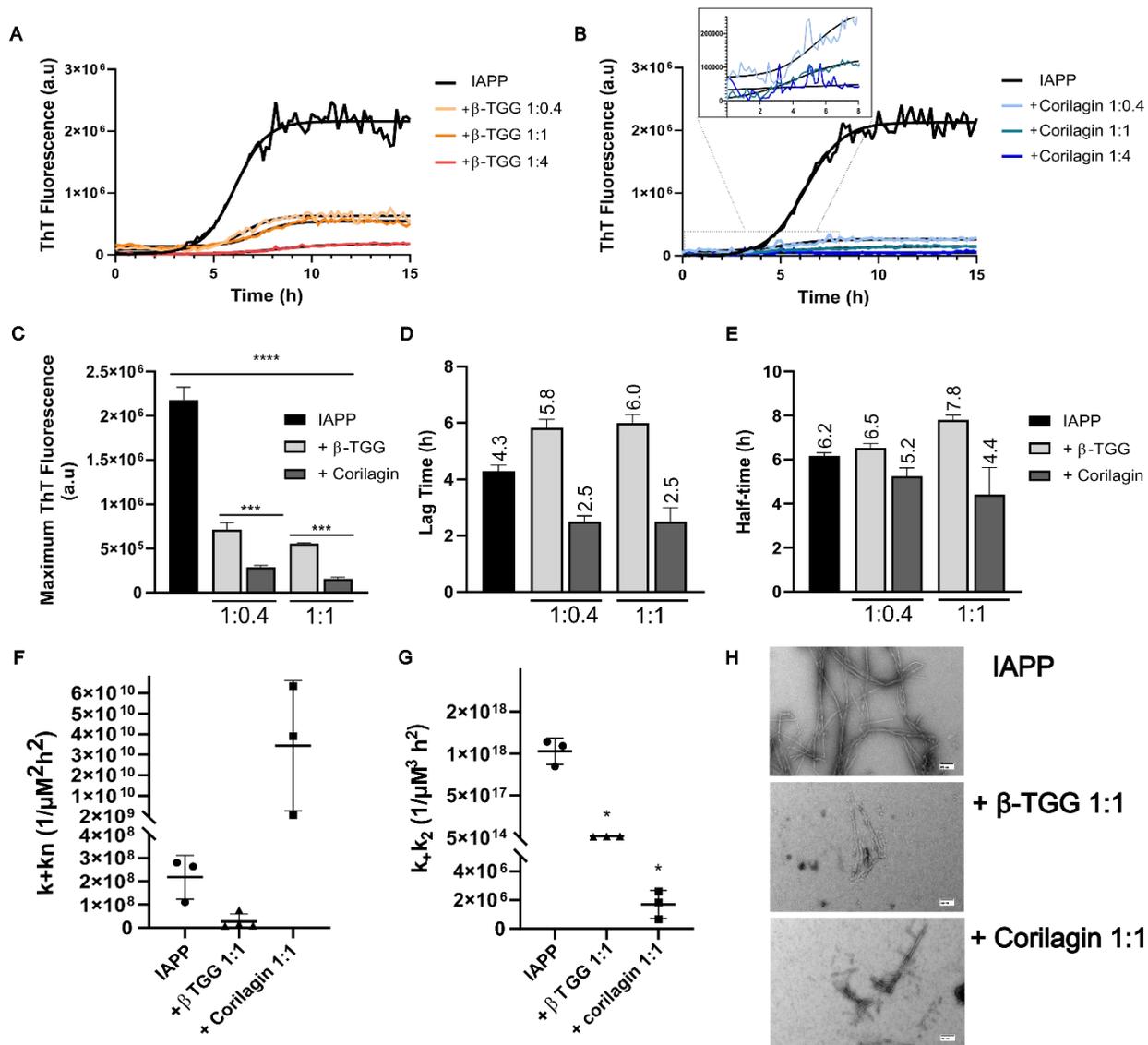


Figure 2.2 β -TGG and corilagin modulate IAPP kinetics of amyloid assembly. **(A, B)** Representative curves of IAPP aggregation kinetics in the presence of **A)** β -TGG and **B)** corilagin. IAPP was incubated at 25 μ M alone or in presence of gallotannins at IAPP:gallotannin at molar ratios of 1:0.4, 1:1 and 1:4. Curves were obtained by monitoring ThT fluorescence every 10 min for 15 h. Values represent fluorescence intensity averaged from three triplicate wells and corrected by subtracting the control condition. **(C)** Maximum ThT fluorescence, **(D)** Lag time and **(E)** Half-time values were derived from the kinetic experiments in (A) and (B) and analyzed using the Boltzmann sigmoidal fitting in Prism 8.4.3. Kinetic curves were fitted using Amylofit and the **(F)** k_+k_n (elongation) and **(G)** k_+k_2 (nucleation) rate constants were calculated using a secondary nucleation dominated, unseeded fitting model. The 1:4 ratios were omitted from the analysis due to the absence of a sigmoidal profile. **(H)** Representative TEM images of samples collected at the end of the kinetic experiments in (A) and (B). Images were taken at 30 000x magnification. The scale bar represents 200 nm. Maximum fluorescence results of gallotannin-treated IAPP were compared to untreated IAPP using one-way ANOVA in Prism 8.4.3. Statistically significant differences (between IAPP alone and gallotannin-treated) were established at $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.0005$ (***); $p < 0.0001$ (****).

2.4.2 Gallotannins reshape the morphology of fibrils

Following the observations that gallotannins inhibit IAPP amyloid formation, we further examined their effect on fibril architecture to obtain preliminary indications of their mechanisms of action. For this purpose, monomeric IAPP was incubated for 72 h either alone, or in the presence of β -TGG or corilagin at a 1:1 molar ratio. CD spectroscopy was used to assess the influence of gallotannins on the secondary structure of IAPP. Immediately after resuspension, all conditions showed spectra characterized with a single minimum at around 203 nm, indicating the presence of random coil structures (Figure 2.3A, left). After 24 hours incubation under fully quiescent conditions, IAPP alone showed two minima at 203 and at 220 nm, indicative of a conformational transition into a β -sheet-rich structure. This change was also observed in presence of corilagin, but not in the presence of β -TGG, where a spectrum characteristic of a random coil structure was present. However, after 72 h, all three conditions showed mainly β -sheet structures with a single minimum at around 218 nm (Figure 2.3A, right). To further investigate the mesoscopic organization of IAPP fibrils assembled in presence of gallotannins, the accessibility to hydrophobic patches was evaluated by monitoring ANS fluorescence. ANS binds to solvent-exposed hydrophobic clusters, which increases fluorescence quantum yield (Gasymov and Glasgow 2007). Results showed that ANS fluorescence significantly decreases in the presence of the gallotannins at a 1:1 ratio (Figure 2.3B), with corilagin decreasing final fluorescence by more than sixfold. This indicates significant alterations in the hydrophobic environment, or its accessibility, of the IAPP aggregates formed in presence of polyphenols. TEM and AFM imaging of the fibrils after 72 hours showed that the addition of gallotannins decreases the total formed fibrils and modifies fibril morphology (Figure 2.3D). When IAPP was incubated alone, the obtained fibrils are high in density and range from 0.6 to 3 μ m in length and 4 to 18 nm in height (Figure 2.3E, F). On the other hand, IAPP fibrils formed in presence of β -TGG are much smaller, with an average of 150 nm in length and 8.9 nm in height (Figure 2.3E, F). Similarly, in the presence of corilagin, IAPP fibrils are shorter than their IAPP-alone counterpart, with an average length of 220 nm and an average height of 5 nm. TEM images also showed the presence of small and non-fibrillar IAPP aggregates, formed in the presence of corilagin. Together, these results indicate that β -TGG and corilagin reduce the formation of IAPP fibrils and promote the formation of shorter filaments. This could involve an inhibition of fibril elongation by binding of the polyphenols to growing ends of the cross- β filaments.

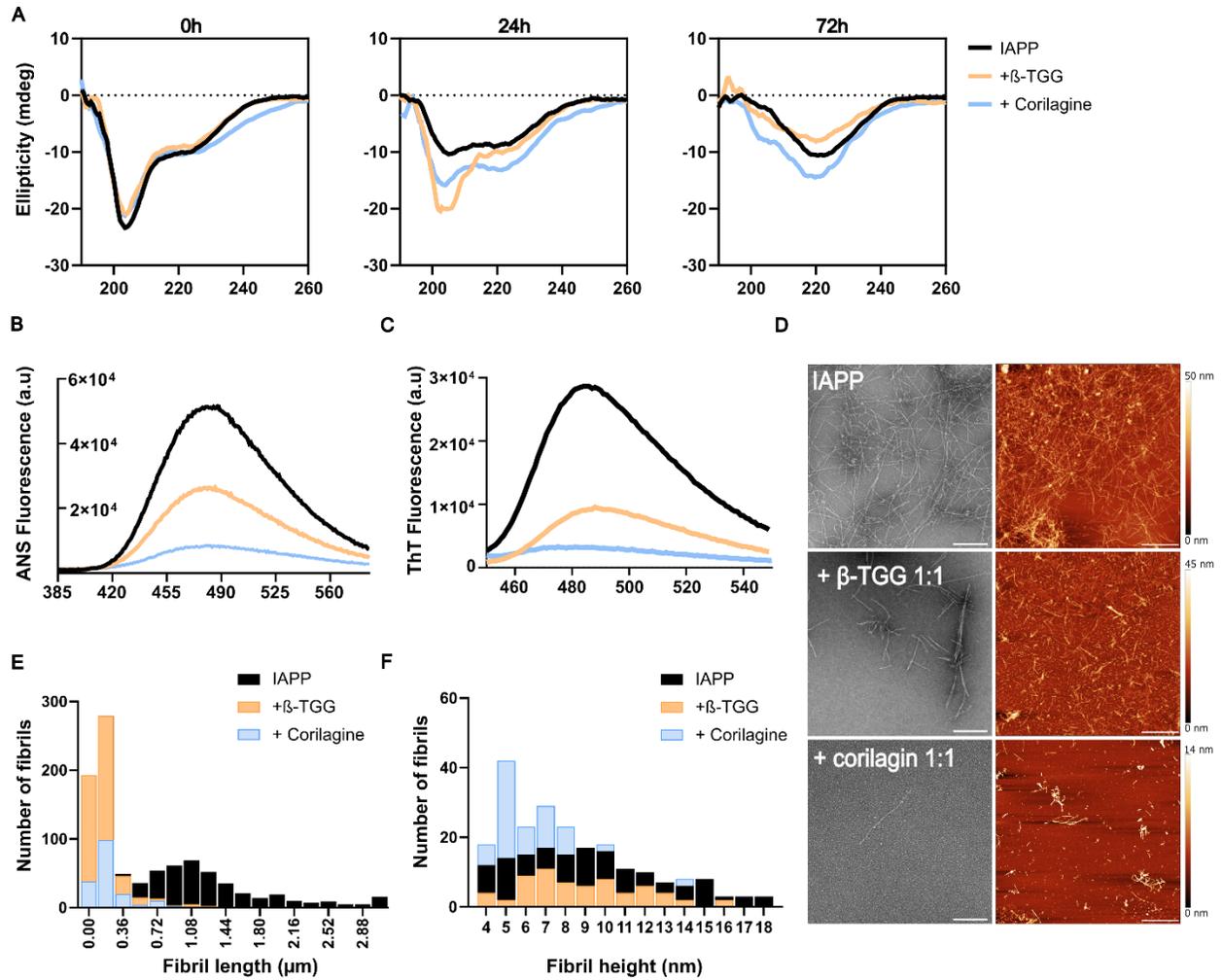


Figure 2.3 β -TGG and corilagin modulate the morphology of IAPP amyloid fibrils. IAPP was assembled at $50 \mu\text{M}$ in absence, or in presence of $50 \mu\text{M}$ β -TGG or corilagin and incubated for 72 h. A) Representative CD spectra of IAPP were measured after 0, 24 and 72 h of incubation B) ANS fluorescence of IAPP after 72 hours of incubation. C) Quantification of the maximum ANS fluorescence values from (B). Values represent the mean fluorescence intensity, averaged from three independent experiments. D) Representative TEM (left) and AFM (right) images after the 72-hour time point in (A). AFM images were manually analyzed, and fibrils were distributed according to their E) length and F) height. Scale bars represent 200 nm for TEM and $1 \mu\text{m}$ for AFM.

2.4.3 Binding of gallotannins to monomeric IAPP by all-atom MD simulations

To gain a better understanding of the interactions between IAPP and gallotannins, we conducted all-atom explicit solvent molecular dynamics simulations using GROMACS v2023.3. Starting with the monomeric IAPP structure from 2L86.pdb, we simulated it alone for 100 ns to achieve a random coil structure, representative of the IAPP structure in aqueous solution, as for our experimental conditions (Figure 2.8 A). Then, β -TGG or corilagin were added at a 3 nm distance from the monomer, and the simulations were run for 2000 ns at 300 K using the AMBER99sb*-ILDNP force field. The root mean square deviation stabilized after 500 ns until the end of the simulation (Figure 2.8 B). Subsequent analyses of root-mean-square fluctuation and solvent accessible surface area were performed over the interval of 1250 – 2000 ns (Figure 2.8 C, D) and the number of hydrogen bonds were calculated between 1000 and 2000 ns (Figure 2.8 E). The results indicated minimal fluctuation, suggesting that the formed complexes were stable. Both β -TGG and corilagin exhibited similar RMSF and hydrogen bond patterns towards the end of the simulation (Figure 2.8 C, E). However, the SASA by residues varied between both gallotannins, indicating different interaction sites (Figure 2.8 D). Two-dimensional interaction maps were generated using Discovery Studio 2024, and the final complexes were visualized using PyMOL (Figure 2.4A, B). The resulting interactions are detailed in Table 1. In the presence of randomly coiled IAPP, more hydrogen bond interactions were observed in the presence of β -TGG (Figure 2.4A) than in the presence of corilagin (Figure 2.4B). To evaluate the binding free energy (apparent ΔG) of the formed complexes, we used the Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann surface area (MMPBSA) method 39 with configurational averaging over the interval 1750 – 2000 ns. The results indicated that β -TGG and corilagin bind to IAPP with binding free energies of -23 and -18 kcal/mol, respectively (Tableau 2.1). Additionally, corilagin seems to interact with IAPP in a more planar fashion compared to β -TGG (Figure 2.9). These molecular dynamics simulations provided valuable insights into the binding of both gallotannins to random coil IAPP, enhancing the understanding of the underlying mechanism by which β -TGG and corilagin can modulate amyloid aggregation.

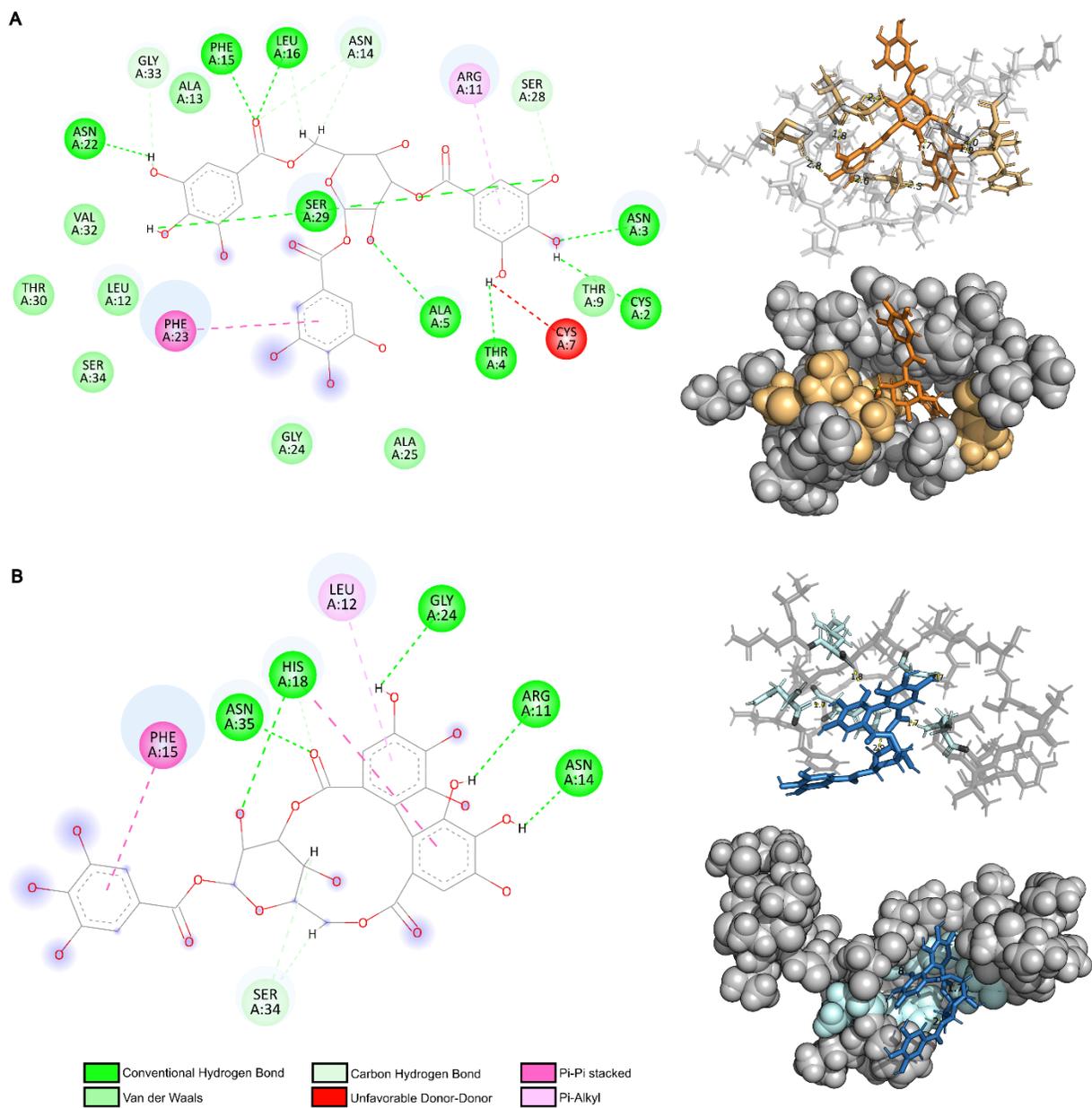


Figure 2.4 β -TGG and corilagin interact with random coil IAPP mainly by hydrogen bonds, van der Waals, and π - π stacking. All-atom MD simulation of IAPP with A) TGG or B) corilagin over 2000 ns. 2D interaction maps were generated and the complexes were visualized under spherical and licorice representations. The binding free energies were determined using the MMPBSA command in GROMACS, indicating an apparent ΔG of -23 and -18 kcal/mol for β -TGG and corilagin, respectively.

Tableau 2.1 Hydrogen bonds and other interactions between IAPP and β -TGG or corilagin, including amino acids with hydrophobic side chains (shown in bold).

Ligand and binding free energy (MMPBSA)	Hydrogen bond (Residue)	Hydrogen bond length (Å)	Other residues binding with gallotannins
Random coiled IAPP + β -TGG (-23 kcal/mol) ¹	Cys2	2.8	
	Asn3	3.1	
	Thr4	1.8	Thr9, Arg11, Leu12 ,
	Ala5	2.7	Ala13 , Asn14, Phe 23 ,
	Phe15	1.9	Gly24, Ala25 , Ser28,
	Leu16	2.0	Thr30, Val32 , Gly33,
			Ser34.
Random coiled IAPP +corilagin (-18 kcal/mol) ¹	Asn22	1.7	
	Ser29	2.3	
	Arg11	1.8	
	Asn14	1.7	
	His18	2.9	
	Gly24	2.7	Leu12 , Phe15 , Ser34.
	Asn35	1.7	

¹MMPBSA was computed using GROMACS v. 2023.3 (Genheden and Ryde 2015).

2.4.4 Corilagin inhibits fibril elongation and targets secondary nucleation

Subsequently, we undertook a mechanistic study to elucidate the molecular basis of the effect of corilagin on IAPP aggregation. Mathematical models suggested that corilagin mainly influences elongation and/or secondary nucleation (Figure 2.2F, G), prompting a more detailed investigation of this aspect. To promote secondary nucleation, we employed seeded kinetics by introducing pre-formed IAPP fibrils to IAPP monomerized solution, catalyzing the aggregation process (Come, Fraser *et al.* 1993). As expected, the addition of 5% amyloid seeds significantly accelerated the aggregation process, resulting in a relatively nonexistent elongation phase (Figure 2.5A). In presence of corilagin at a 1:0.4 molar ratio, there was no notable change in the lag-time of the seeded kinetics (Figure 2.5 A, C), but the final ThT fluorescence was notably reduced (Figure 2.5B). However, in presence of a molar equivalent of corilagin, the lag and half times were similar to those observed for unseeded IAPP (Figure 2.5C, D). Additionally, the maximum ThT fluorescence significantly decreased to levels observed in unseeded conditions in presence of corilagin at

a 1:1 molar ratio (Figure 2.5B). These observations suggest that corilagin can inhibit the binding of IAPP to pre-assembled fibril seeds, leading to an inhibition of fibril surface-catalyzed secondary nucleation.

Next, corilagin was added at different timepoints of the self-assembly reaction to assess whether its effect changes depending on the stage of the IAPP aggregation process. When corilagin was added in IAPP solution at the end of the lag phase, the resulting kinetic curve appeared similar to the one observed when corilagin was added at the beginning of the assembly (time 0 h) (Figure 2.5 F). When corilagin was added at the onset of the elongation phase (6-7 h), ThT fluorescence rapidly decreased and stabilized at significantly low fluorescence intensities, comparable to the levels observed with corilagin addition at time zero (Figure 2.5F, G). When corilagin was added later in the elongation phase, at around 8 h, a rapid decrease in ThT fluorescence intensity was observed, but the final fluorescence remained higher than lower addition timepoints. Finally, when corilagin was added at the end of the elongation phase, the kinetic curve was identical to that of IAPP alone, indicating a lack of effect when the self-assembly reaches the elongation phase (Figure 2.5F, G). MD simulations revealed that corilagin binds to IAPP fibrils and form a stable complex after approximately 100 ns without disassembling the fibrils during a 500 ns trajectory, forming hydrogen bonds with three surface valines (Figure 2.5I). When corilagin was added to mature fibrils, no structural changes were observed in CD spectroscopy (Figure 2.10 A). However, AFM microscopy showed the presence of very large clusters (Figure 2.10 B). Furthermore, IAPP turbidity at 600 nm showed a significant decrease in presence of corilagin caused by the formation of very large IAPP-corilagin entanglements that sediment (Figure 2.10 C). Similar effects were observed with ThT and ANS fluorescence (Figure 2.10 D, E). In contrast, when monomerized IAPP was incubated with corilagin over 72 hours, turbidity at 600 nm showed higher absorbance in the presence of corilagin, indicating the formation of clustered fibrillar aggregates (Figure 2.5H), as opposed to IAPP alone, whose absorbance levels remained relatively constant (Figure 2.5H, Figure 2.11 A, B). This can also be observed by AFM (Figure 2.5J). Together, these observations suggest that corilagin acts specifically during the elongation phase and effectively inhibits the seeding effect, possibly by forming fibril clusters and preventing elongation and fibril surface-catalyzed secondary nucleation.

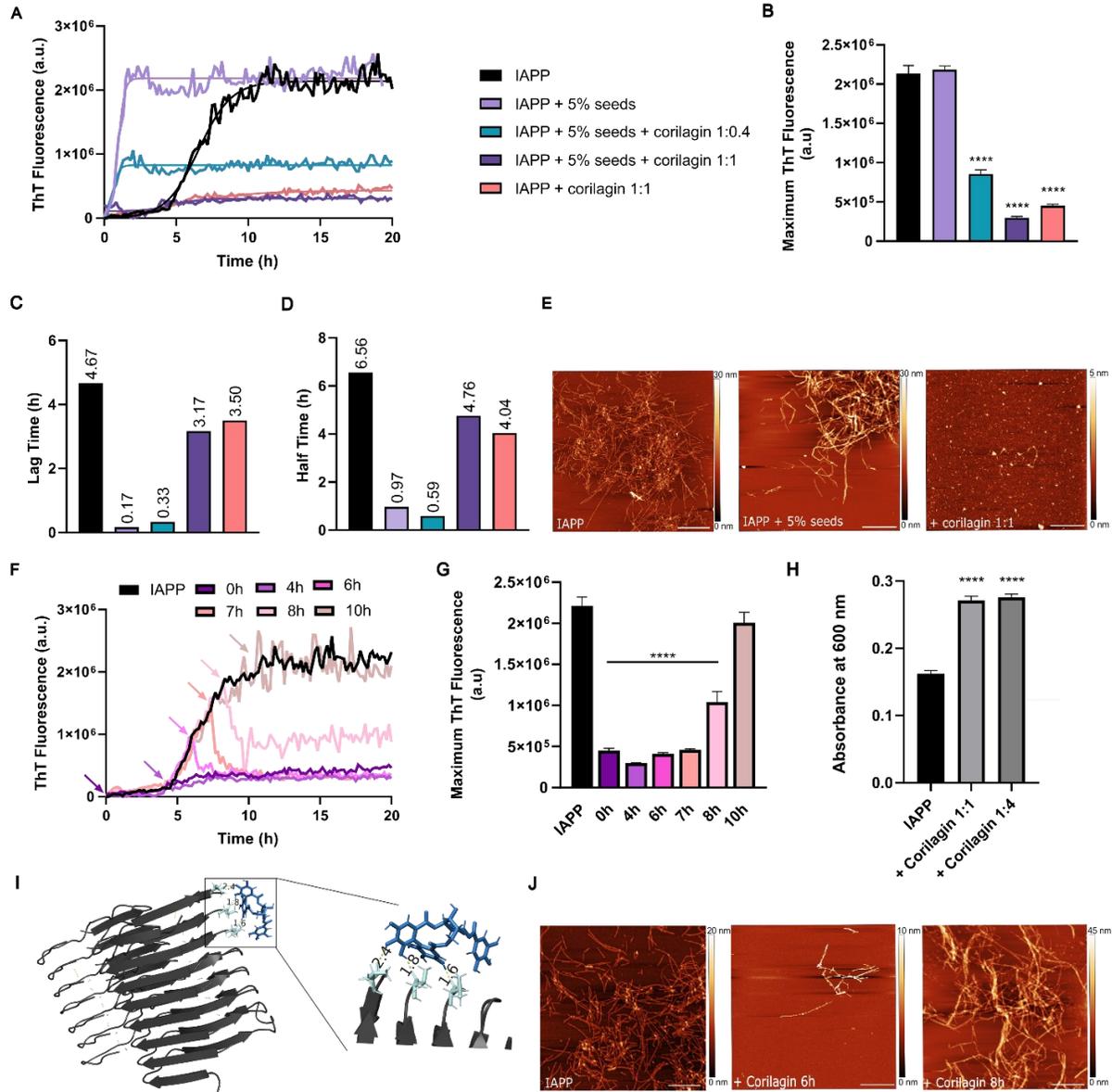


Figure 2.5 Corilagin inhibits secondary nucleation. **A**) Representative ThT kinetic curves of seeded IAPP aggregation. IAPP was incubated at 25 μ M with 5% (wt/wt) of pre-formed IAPP seeds. Corilagin was added at 1:1 and 1:4 IAPP:corilagin molar ratios to observe its effects on the seeding process. Control conditions with unseeded IAPP alone or with 1:1 corilagin were done for comparative purposes. **B**) Maximum ThT fluorescence, **C**) Lag time and **D**) Half time were also quantified from the seeded kinetic experiment in (A). **E**) AFM images of samples collected at the end of (A). **F**) Representative ThT fluorescence curves of IAPP aggregation with the addition of corilagin at different stages of the aggregation process. Corilagin was introduced at time zero, at the end of the lag phase (4 hours), at different times in the elongation phase (6, 7 and 8 hours) and at the beginning of the saturation phase (10 hours). **G**) Quantification of total fluorescence in (F). **H**) Turbidity assessment at 600 nm of IAPP alone and in the presence of 1:1 or 1:4 molar equivalents of corilagin. **I**) Resulting complex of a 500 ns MD simulation of an IAPP fibril (6Y1A.pdb) with corilagin. **J**) AFM images taken at the end of the kinetic experiment in (F). Scale bars represent 500 nm. Statistically significant differences were established at $p < 0.0001$ (****) between untreated and corilagin-treated conditions using one-way ANOVA in Prism 8.4.3.

2.4.5 Corilagin protects pancreatic cells against IAPP-induced cytotoxicity

To assess the cytotoxicity of IAPP aggregates formed in the presence of corilagin, we conducted assays on INS-1E pancreatic cells. IAPP was pre-incubated at a concentration of 75 μ M alone, or in presence of corilagin, for 3 hours according to pre-established protocols to specifically study the effect on the production of early oligomeric species (Nguyen, Zottig *et al.* 2021, Kihal, Nguyen *et al.* 2024). The cytoprotective effects of corilagin were evaluated by measuring cell metabolic activity using a resazurin assay. Notably, IAPP:corilagin molar ratios of 1:1, 1:2 and 1:4 resulted in a significant reduction in IAPP-mediated cytotoxicity, with the 1:4 ratio demonstrating the most pronounced cytoprotective effect, with over 80% metabolically active cells (Figure 2.6 A). Similar results were observed on CHO-K1 cells (Figure 2.12 A). To further elucidate the protective mechanism of corilagin against IAPP toxicity, additional experiments were performed using the 1:4 (IAPP:corrilagin) molar ratio. Given that IAPP is known to disrupt the cell membrane, we examined the membrane integrity of INS-1E cells using a Live/Dead assay. Ethidium bromide homodimer (red) served as an indicator of membrane integrity, as it can only penetrate the nucleus if the membrane is compromised. Calcein AM (green) was used as a live-cell indicator. Confocal microscopy images showed an important presence of red stained cells when treated with IAPP alone, unlike when IAPP was pre-incubated with corilagin (Figure 2.6B). Quantification of the confocal microscopy images shows a significantly lower level of EtBr-II staining for cells treated with IAPP pre-incubated in the presence of corilagin (Figure 2.6B), confirming a membrane-protective effect. Membrane damage was also assessed in CHO-K1 cells using an LDH assay, which showed an important, concentration-dependent protection against membrane perturbation effect of IAPP (Figure 2.12 B). Subsequently, apoptosis was evaluated in INS-1E cells to determine whether the presence of corilagin triggers an apoptotic response. Annexin V-FITC (green) and propidium iodide (red) were used to determine apoptosis levels. Healthy cells exhibit no or very light green fluorescence, intense green fluorescence indicates pre-apoptotic cells, and co-localization of green and red fluorescence denotes late-apoptotic cells. Confocal microscopy revealed an absence of fluorescence in the presence of corilagin, whereas cells treated with IAPP alone display green and red fluorescence, comparable to the controlled cells treated with H₂O₂ (Figure 2.6D). Quantification of these images shows a significant difference in apoptosis levels (Figure 2.6E), highlighting the protective effect of corilagin against IAPP-induced apoptosis. Finally, the generation of reactive oxygen species secretion was also evaluated in CHO-K1 cells using a DHE assay, which also revealed a significant decrease in ROS levels for IAPP incubated in presence of corilagin in a concentration-dependent manner (Figure 2.12 C). Together, these results highlight the cytoprotective properties of corilagin against IAPP cytotoxicity.

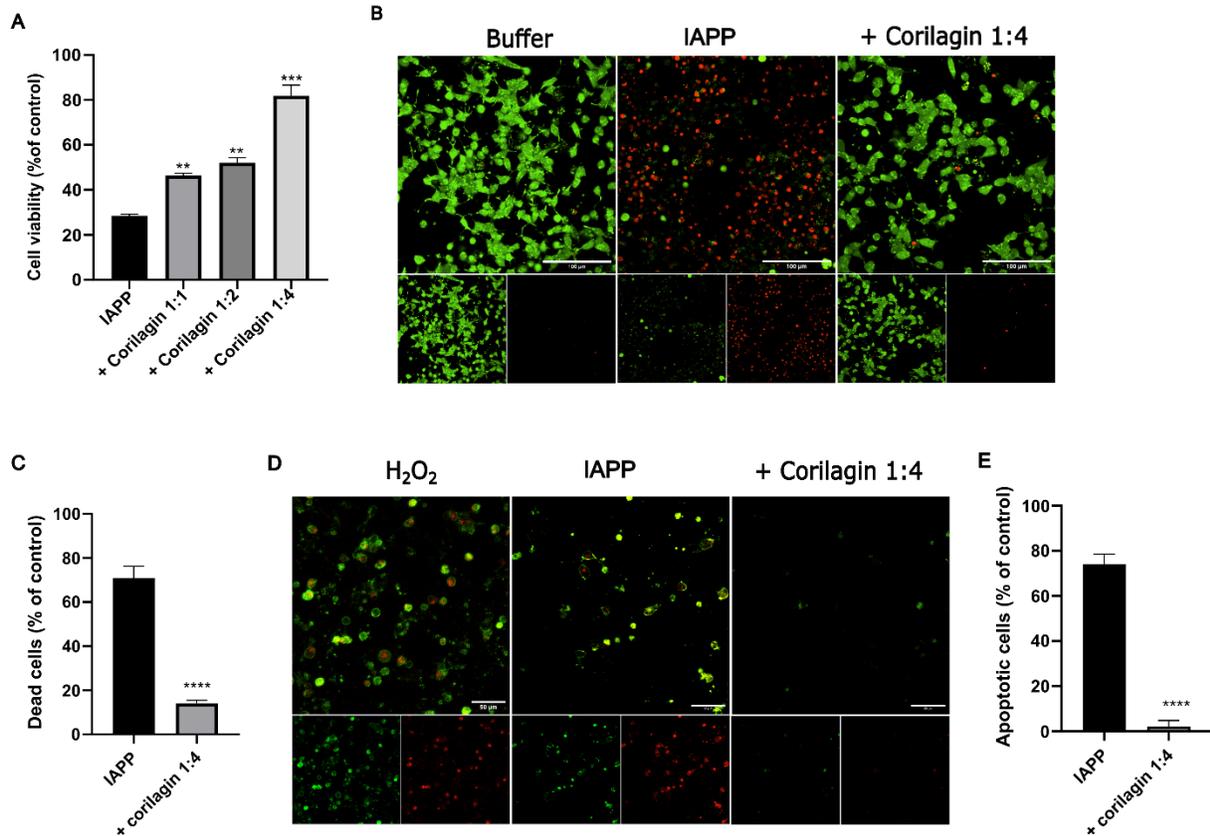


Figure 2.6 Corilagin shows cytoprotective effects against IAPP cytotoxicity on INS-1E cells. INS-1E pancreatic cells were plated in 24-well plates at a density of 150,000 cells per well and incubated under standard conditions. IAPP was pre-incubated alone or with corilagin for 3 hours before being applied directly in the cell media. Cell activity was investigated by confocal microscopy using **A**) Live/Dead assay with Calcein AM (green) and Ethidium Bromide Homodimer (red). **B**) Dead cells were quantified using ImageJ and compared to the negative control condition (Buffer). Apoptosis was assessed in **C**) using Annexin V-FITC (green) and Propidium Iodide (red). **D**) Images were quantified using ImageJ and compared to the positive control condition (H₂O₂). Quantification results of corilagin-treated IAPP were compared to untreated IAPP using student's *t* test. A statistically significant difference between IAPP alone and corilagin-treated cells was established at $p < 0.0001$ (****).

2.5 Discussion

Polyphenols have consistently demonstrated their therapeutical potential owing to their significant antioxidant and anti-inflammatory properties (Almatroodi, A. Alsahli *et al.* 2022). Several studies performed in the context of neurodegenerative diseases, cancers, and cardiovascular diseases, have highlighted their ability to modulate ROS production, apoptosis, and neuroinflammation (Bhullar and Rupasinghe 2013, Mileo and Miccadei 2016, Almatroodi, A. Alsahli *et al.* 2022). Furthermore, polyphenols

have been recognized as key regulators of amyloid aggregation, with different molecules exhibiting strong inhibitory effects at various stages of the aggregation process (Ngoungoure, Schluesener *et al.* 2015). Notably, gallotannins – a sub-class of polyphenols – have not been extensively studied in relation to IAPP aggregation, despite their considerable anti-amyloid potential. In this study, we investigated the effects of two gallotannins, β -TGG and corilagin, on IAPP amyloidogenesis and associated cytotoxicity. Both β -TGG and corilagin demonstrated significant anti-aggregative effects, with the latter showing important effects even at lower concentrations, evidenced by an important reduction in ThT fluorescence and final fibril load, and significantly reduced cytotoxicity.

Analysis of ThT kinetics curves indicated that β -TGG slightly reduces primary and secondary nucleation rate constants, consistent with the increased lag time and half-time observed in kinetic assays. Conversely, corilagin increased the primary rate constant, while significantly decreasing the secondary rate constant, suggesting a specific action on secondary nucleation. TEM and AFM imaging showed shorter filaments in the presence of both gallotannins, especially corilagin, supporting the hypothesis of an effect on the elongation phase. Interestingly, β -TGG displayed more hydrogen bonds and hydrophobic interactions with IAPP than corilagin, despite the latter having a more important effect at lower concentrations. Studies on other amyloid peptides suggest that more planar molecules, including polyphenols, might have better aggregation-inhibiting potential (Bulic, Pickhardt *et al.* 2010). Given the flexibility of β -TGG compared to the more rigid corilagin (Haddad, Gaudreault *et al.* 2022), it could interact with IAPP in a non-planar conformation. Additionally, seeded aggregation kinetics revealed the ability of corilagin in inhibiting fibril formation to non-seeded levels at a 1:1 molar ratio, underscoring its capacity to regulate secondary nucleation. Time-dependent addition of corilagin showed that it modulates IAPP aggregation specifically during the elongation phase. Upon the addition of corilagin, a sharp decrease in ThT fluorescence is observed. This suggests that it might promote the clustering of pre-fibrillar aggregates and amyloid assemblies, thereby reducing ThT binding. This is supported by a significant increase in solution turbidity when IAPP is assembled with corilagin as opposed to IAPP alone. Consequently, one potential mechanism by which corilagin inhibits secondary nucleation is by promoting pre-fibrillar clustering, preventing the binding of monomers to the newly formed fibrils and thus preventing surface-catalyzed secondary nucleation (Törnquist, Michaels *et al.* 2018). Our observations showing that corilagin-induced aggregates do not catalyze fibril formation also support this hypothesis.

The addition of corilagin at the beginning or end of the elongation phase does not change the effect on the aggregation process, indicating that the action of corilagin is initiated during the elongation phase, likely targeting oligomers and pre-fibrillar proteospecies. Molecular dynamics simulations indicate that corilagin interacts more extensively with helical IAPP than with random coiled IAPP. Given the growing evidence linking early oligomerization to helical conformations (Stangl and Schneider 2015), this finding supports the notion that corilagin selectively targets specific IAPP structures. AFM and TEM images captured at the end of the experiments revealed that larger IAPP fibrils are formed when corilagin is added at the end of the elongation phase, whereas smaller aggregates are observed when corilagin is added earlier. This observation aligns with the hypothesis that corilagin promotes fibril clustering. Similar effects have been reported for IAPP and other amyloid proteins in the presence of EGCG (Cao and Raleigh 2012, Zaidi and Bhat 2022), where the importance of the gallate ester and trihydroxyl phenyl ring were highlighted, both of which are present in corilagin. However, unlike EGCG which disassembles mature IAPP fibrils after a few hours of incubation, corilagin causes the fibrils to agglomerate. These findings highlight the specific action of corilagin as a modulator of amyloid aggregation, particularly in the context of diseases such as type 2 diabetes.

IAPP contributes to T2DM pathology by inducing pancreatic β -cell death, thereby exacerbating the disease. The precise species among the various forms of IAPP responsible for toxicity remains uncertain. While mature fibrils are known to contribute to cytotoxicity, numerous studies have suggested that soluble oligomers are the most cytotoxic species (Kanatsuka, Kou *et al.* 2018). It was demonstrated that oligomers are the most abundant species at the beginning of the secondary nucleation, which coincides with the most cytotoxic time during the aggregation process (Rodriguez Camargo, Chia *et al.* 2021). Here, we pre-incubated IAPP with corilagin before applying it to cells to see how it can modulate the toxicity of early oligomeric species. IAPP cytotoxicity is often associated with plasma membrane disruption, increasing cell permeability and triggering oxidative stress and ROS production, which further damages cellular components (Kanatsuka, Kou *et al.* 2018). Additionally, IAPP oligomers can induce apoptosis by activating caspases, leading to β -cell death (Park, Woo *et al.* 2014). Polyphenols, known for their antioxidant and anti-inflammatory properties, have shown potential in mitigating these effects (Zhang and Tsao 2016). Molecules like EGCG, resveratrol, and quercetin showed significant protection against amyloid cytotoxicity by scavenging ROS, modulating inflammation and protecting cell membrane (Choi, Jung *et al.* 2001, Jang and Surh 2003, Li, Zhou *et al.* 2015). Corilagin previously demonstrated its cytoprotective effect on various

cell types, including neurons, where it significantly decreased A β -induced inflammation and apoptosis (Zhang, Liu *et al.* 2017). Here, corilagin effectively prevented IAPP-induced oxidative stress and apoptosis in β -pancreatic cells, consistent with the protective effects observed previously. The reduction of ROS is a well-established mechanism for inhibiting amyloid toxicity (Stefani and Rigacci 2013), further highlighting the potential of corilagin as a robust modulator of IAPP aggregation and its associated cytotoxic effects. By targeting secondary nucleation, corilagin considerably decreases the formation and availability of toxic aggregates by inhibiting surface catalyzed aggregation. This supports the suggested mechanism that corilagin promotes the clustering of prefibrillar species, preventing their elongation and toxicity (Figure 2.7). The concentration dependent results of corilagin suggest that an IAPP:corilagin molar ratio of at least 1:4 is needed for optimal cytoprotective effectiveness. This correlates with the ratio needed to totally inhibit the seeding effect, confirming that the inhibition of secondary nucleation plays an important role in preventing cytotoxicity. Furthermore, corilagin and β -TGG were effective at non-toxic concentrations, unlike other polyphenols that were only effective against amyloid cytotoxicity at lethal concentrations (Zaidi and Bhat 2022). This highlights the therapeutic properties of gallotannins, which on top of their important anti-aggregative and cytoprotective properties, show very low toxicity.

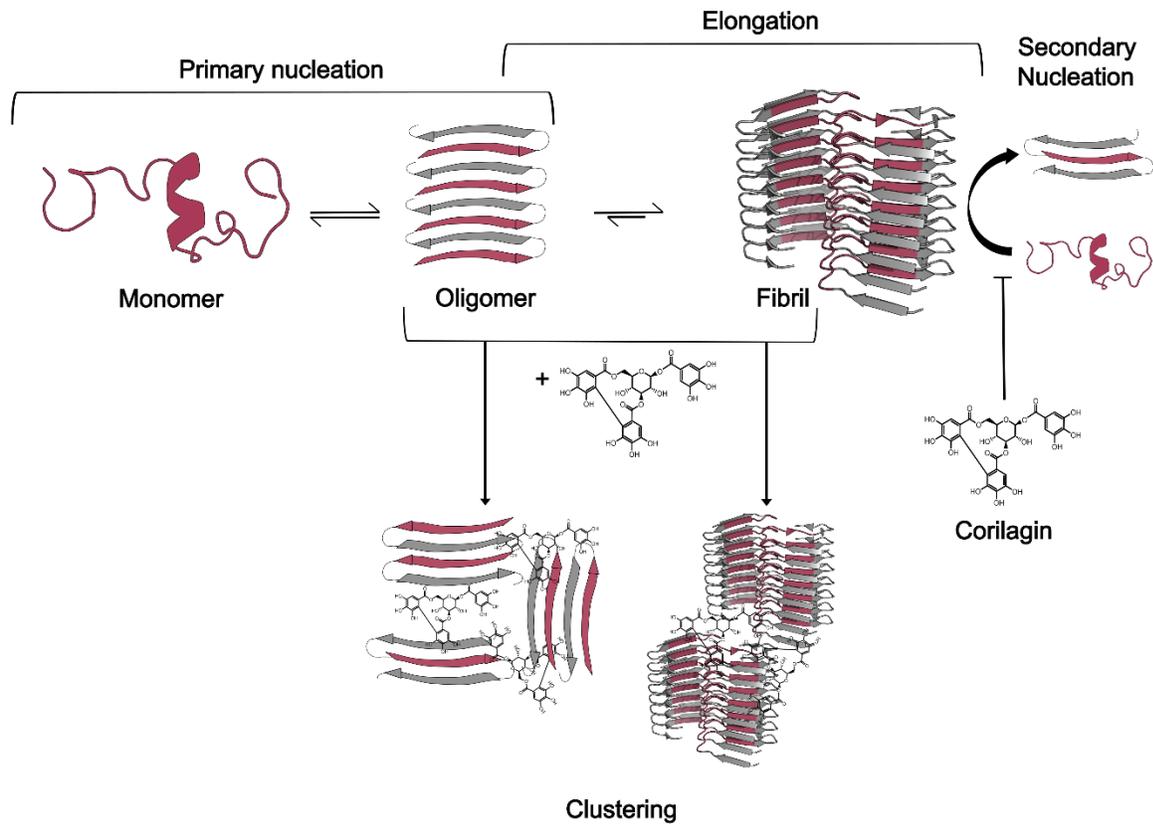


Figure 2.7 Suggested mechanism of action of corilagin on IAPP amyloid aggregation. Corilagin could target pre-fibrillar and early fibrillar species formed during the elongation phase and prevent their elongation by forming clusters, preventing surface-catalyzed secondary nucleation. Corilagin can also cluster mature IAPP fibrils without remodeling them. The resulting IAPP-corilagin clusters show no cytotoxicity on pancreatic cells.

2.6 Conclusion

This study revealed the therapeutic potential of two gallotannins, β -TGG and corilagin, against IAPP aggregation and toxicity. Our experimental and computational results revealed that β -TGG and corilagin show an important reduction in the formation of elongated amyloid fibrils, with corilagin having a particularly significant cytoprotective effect by targeting secondary nucleation and preventing the progression to toxic fibrillar structures. These findings can help our knowledge of IAPP-gallotannin interactions, contributing to understanding amyloid diseases and T2DM. Recent research found growing evidence that targeting secondary nucleation could be the most effective way to inhibit amyloid aggregation (Rodriguez Camargo, Chia *et al.* 2021), highlighting the importance of our findings. Future research should explore the *in vivo* relevance of these findings and evaluate the therapeutic potential and the bioavailability of gallotannins in animal models to further assess the therapeutic potential of corilagin to fight peptide aggregation associated with the etiology of T2DM.

2.7 Supporting information

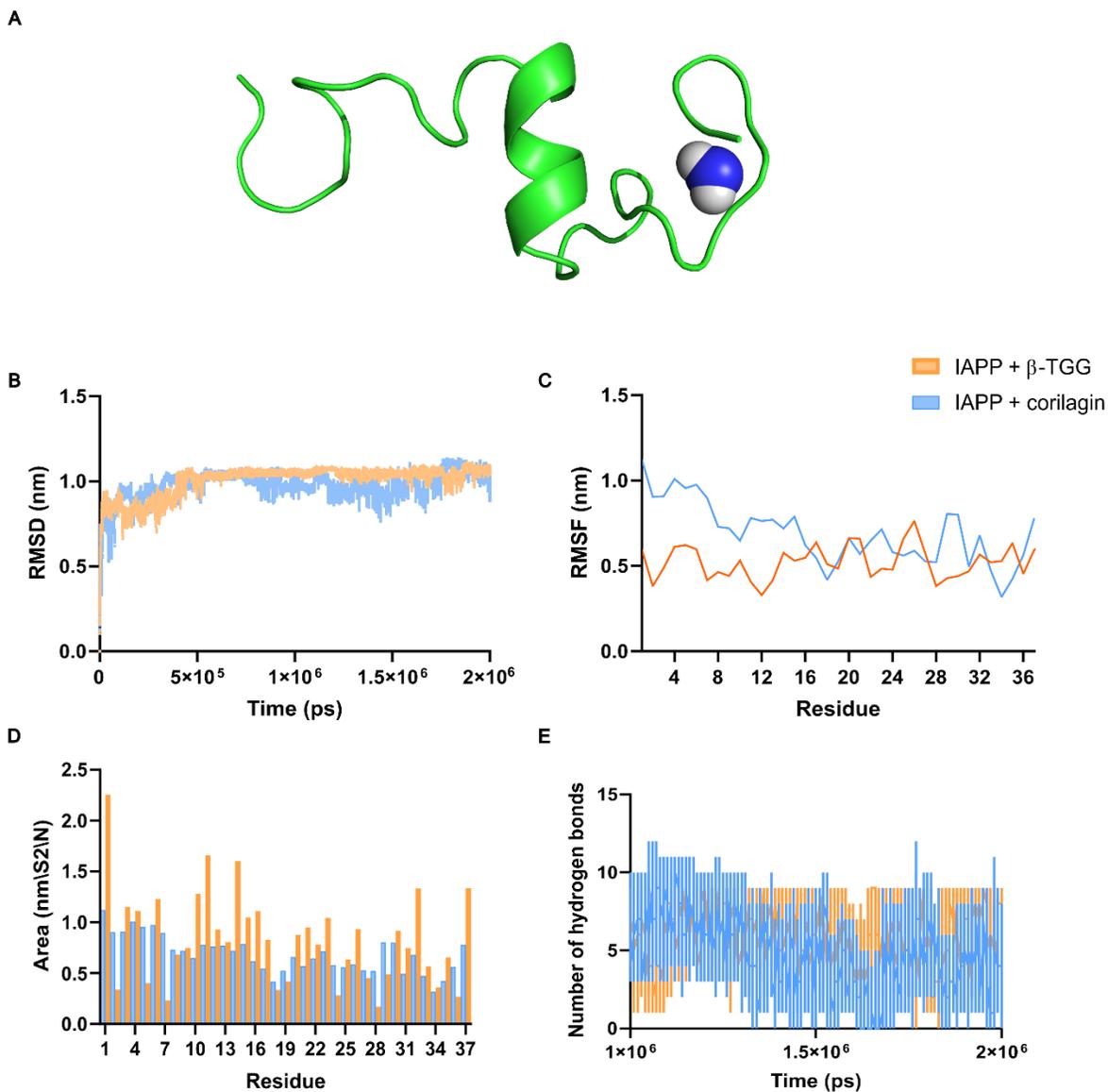


Figure 2.8 Molecular dynamics information of IAPP with β -TGG or corilagin. A) IAPP (2L86.pdb) was computed alone for 100 ns to form a mostly random coiled conformation. TGG (orange) and corilagin (blue) were added at a distance of 3 nm and computed for 2000 ns. The resulting complexes were analyzed by plotting: B) Root mean square deviation (RMSD) on the backbone atoms (N, C α , C and O) from the protein structures as a function of time for the whole trajectory (2000 ns); C) the root mean square fluctuations (RMSF) per residue and D) the solvent accessible surface area (SASA) per residue, both for the 1250–2000 ns interval and E) the number hydrogen bonds for the 1000–2000 ns interval.

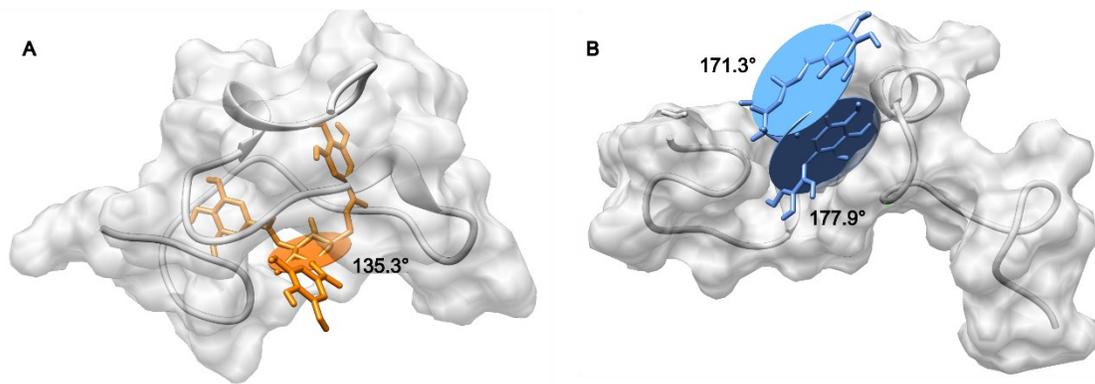


Figure 2.9 Analysis of β -TGG and corilagin structure in the presence of IAPP. Overall planarity of A) TGG and B) corilagin at the end of the 2000 ns MD simulation was analyzed using UCSF Chimera 1.18.

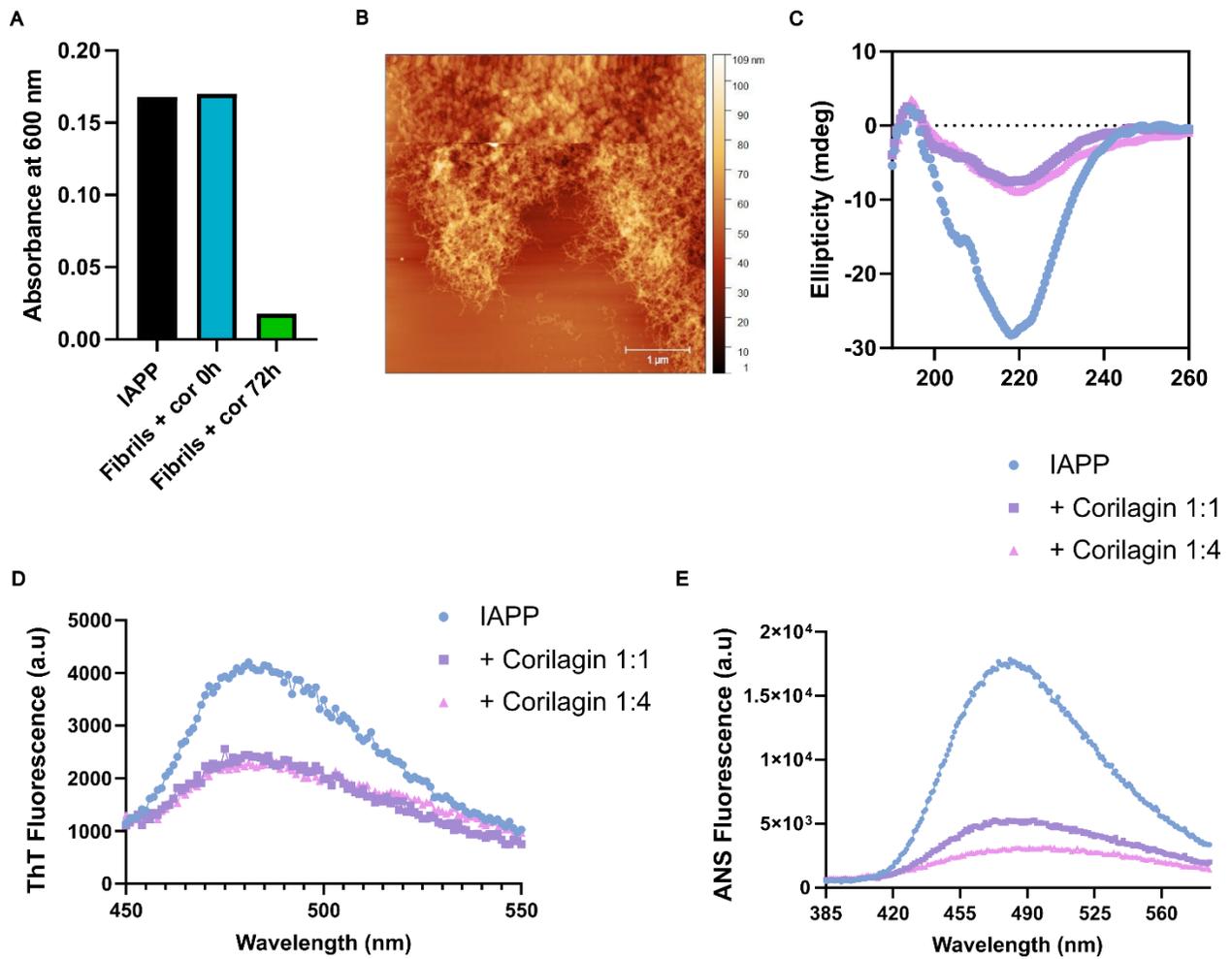


Figure 2.10 Corilagin forms clusters with mature IAPP fibrils without remodeling them. Corilagin was added to mature IAPP fibrils and incubated for 72 hours. The solutions were monitored using **A)** Turbidity at 600 nm at initial and final timepoints. After 72 hours of incubation, **B)** AFM pictures were taken and **C)** CD spectroscopy **D)** ThT and **E)** ANS fluorescence were measured.

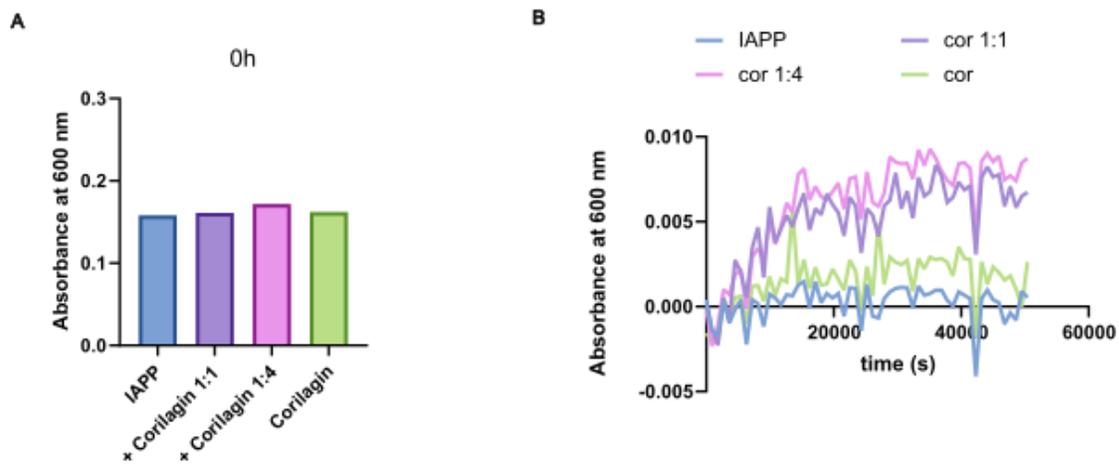


Figure 2.11 IAPP forms larger aggregates in the presence of corilagin over time. **A)** Solution turbidity measured at 600 nm at time 0. **B)** Turbidity kinetic curve of IAPP alone or in the presence of corilagin at IAPP:corilagin ratios of 1:1 and 1:4. Absorbance at 600 nm was monitored for 15 hours. Blank cell values were subtracted from experimental values.

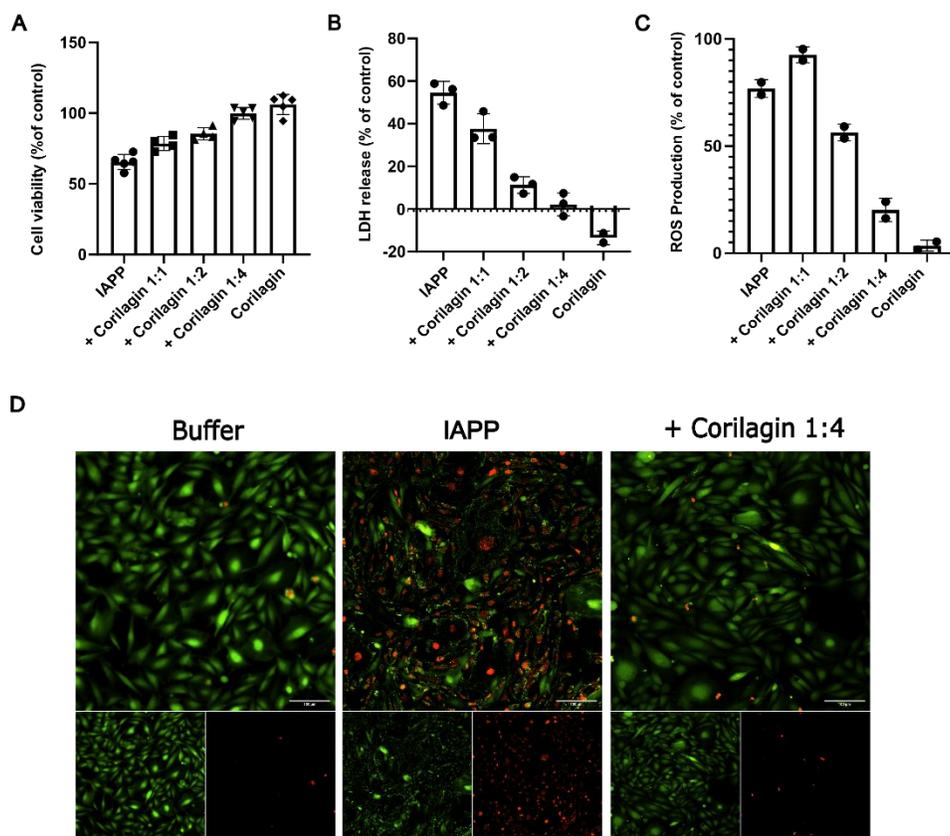


Figure 2.12 Corilagin has concentration-dependent cytoprotective effects against IAPP toxicity on CHO-K1 and INS-1E cells. Monomeric IAPP was pre-incubated for 3 hours alone or with corilagin at different IAPP:gallotannin ratios. Cellular metabolism was assessed using a resazurin assay on **A**) INS-1E cells and **B**) CHO-K1 cells. Release of **C**) lactate dehydrogenase and **D**) Dihydroethidium were monitored on CHO-K1 cells to evaluate membrane damage and ROS production, respectively. **E**) Live/dead assay with Calcein AM (green) and Ethidium Bromide Homodimer (red). A statistically significant difference between IAPP alone and corilagin-treated cells was established at at $p < 0.01$ (**); $p < 0.0005$ (***); $p < 0.0001$ (****).

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Les polyphénols sont une classe de composés naturels présents dans de nombreux aliments d'origine végétale, tels que les fruits, les légumes, le thé, le café, le chocolat et le vin rouge (Abbas, Saeed *et al.* 2017). Ils sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, qui permettent de neutraliser les radicaux libres et de protéger les cellules contre le stress oxydatif. En particulier, les polyphénols ont attiré l'attention des chercheurs pour leur rôle potentiel dans la prévention et le traitement des amyloïdoses, telles que la maladie d'Alzheimer et le diabète de type 2 (Bhullar and Rupasinghe 2013). Ces maladies sont caractérisées par l'agrégation anormale de protéines amyloïdes dans le cerveau et les tissus périphériques, conduisant à la formation de plaques et à la dégénérescence cellulaire et tissulaire. Les polyphénols peuvent inhiber l'agrégation des polypeptides amyloïdogéniques, empêchant ainsi la formation de plaques et protégeant les cellules contre les dommages résultants (Bhullar and Rupasinghe 2013, Mileo and Miccadei 2016). Ces composés se distinguent en effet par leur capacité à interférer avec les différentes étapes du processus d'agrégation des protéines amyloïdes. Ils peuvent se lier aux oligomères des amyloïdes et les empêcher de s'autoassembler pour former des espèces plus toxiques (Ngoungoure, Schluesener *et al.* 2015). De plus, les polyphénols peuvent stabiliser les structures amyloïdes intermédiaires moins toxiques, réduisant ainsi la toxicité globale des agrégats amyloïdes (Ngoungoure, Schluesener *et al.* 2015). Les gallotannins, un sous-groupe de polyphénols, ont montré un potentiel anti-amyloïde prometteur. Ces composés, présents dans certaines plantes comme le chêne et le sumac, possèdent des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires similaires à celles des autres polyphénols (Kamarudin, Nik Salleh *et al.* 2021). Notamment, les gallotannins se distinguent par leur noyau de glucose, qui pourrait renforcer leurs propriétés anti-agrégatives (He, Shi *et al.* 2006). Particulièrement, les deux gallotannins β -TGG et corilagine ont un potentiel anti-agrégatif qui demeure encore aujourd'hui très peu exploré.

Actuellement, les thérapies approuvées pour traiter les amyloïdoses peuvent avoir des effets secondaires significatifs, notamment les anticorps monoclonaux contre l'A β qui conduisent à des problèmes neurologiques et cardiovasculaires (Söderberg, Johannesson *et al.* 2023). En raison de ces effets indésirables, l'utilisation de ces agents est souvent limitée. Les gallotannins naturels, en revanche, pourraient présenter une alternative plus sûre (He 2023). Ainsi, il est intéressant d'étudier l'effet du β -TGG

et de la corilagine afin de potentiellement identifier de nouveaux mécanismes d'action et de nouvelles cibles thérapeutiques contre l'agrégation amyloïde.

3.1 L'effet des gallotannins sur la cinétique de l'agrégation de l'IAPP

Dans cette étude, le processus d'autoassemblage de l'IAPP a été examiné en présence de deux gallotannins, le β -TGG et la corilagine, afin de mieux comprendre leur impact sur les mécanismes cinétiques d'agrégation. La cinétique de l'IAPP est caractérisée par un profil sigmoïdal divisé en trois phases : la phase de nucléation, la phase d'élongation et la phase de saturation (Kayed, Bernhagen *et al.* 1999). Ces phases sont facilement observables en mesurant la fluorescence de la ThT, qui se lie aux feuillets- β -croisés, ce qui donne des données importantes sur l'état d'agrégation de l'IAPP (Gade Malmos, Blancas-Mejia *et al.* 2017). En effet, l'analyse de la courbe cinétique repose sur deux aspects principaux : la durée de la phase de latence (t_{lag}), qui est le temps avant que l'élongation amyloïde ne commence réellement, et le demi-temps (t_{50}), qui est le temps requis pour que la fluorescence atteigne 50% de sa valeur finale. Des analyses mathématiques permettent également de calculer les constantes de vitesse et de comprendre l'impact de la nucléation primaire (la formation initiale) et secondaire (l'amplification) sur l'ensemble du processus (Meisl, Kirkegaard *et al.* 2016). Ainsi, il a été possible d'évaluer l'amplitude des modifications induites dans la cinétique d'agrégation de l'IAPP par l'ajout des deux composés sur un intervalle de 15 h. Trois ratios molaires IAPP:gallotannins ont été testés, soit les ratios 1:0.4, 1:1 et 1:4.

Comme il est possible de l'observer sur la Figure 2.2, l'ajout de β -TGG a entraîné une diminution significative de l'intensité totale de fluorescence de la ThT, dépendante de la concentration. De plus, il est possible d'observer une augmentation des temps de latence et de demi-vie pour atteindre le plateau de fluorescence (Figure 2.2 A, C-E). Ces résultats suggèrent que β -TGG ralentit à la fois les phases de nucléation et d'élongation. En comparaison, l'effet de la corilagine est plus marqué, notamment sur l'intensité finale de fluorescence de la ThT, qui diminue fortement même au plus faible ratio molaire de 1:0.4. Au plus haut ratio molaire (1:4), la formation de structures en feuillets- β -croisés est complètement inhibée (Figure 2.2 B). Fait intéressant, la corilagine diminue les temps de latence et de demi-vie, ce qui pourrait indiquer un effet complexe où la nucléation primaire est favorisée, tandis que la nucléation secondaire est inhibée. L'analyse mathématique des constantes de vitesse a d'abord confirmé les données de la littérature indiquant que la nucléation secondaire domine la cinétique d'agrégation de l'IAPP. En présence de β -TGG à un ratio molaire de 1:1, les constantes de nucléation primaire (k_1 , k_n) et secondaire (k_2 , k_2) diminuent légèrement, alors que la corilagine augmente légèrement la constante de nucléation

primaire tout en réduisant significativement la constante de nucléation secondaire. Ces résultats corroborent les observations cinétiques précédentes, mettant en lumière des mécanismes distincts par lesquels les deux gallotannins affectent l'agrégation de l'IAPP. Néanmoins, il faut avoir une certaine réserve par rapport aux résultats observés par ThT, car l'ajout de gallotannins pourrait tout simplement réduire les sites de liaison avec l'IAPP, ce qui expliquerait la diminution importante de fluorescence. Des tests supplémentaires sont donc nécessaires pour valider l'effet des gallotannins sur l'agrégation de l'IAPP. Les échantillons obtenus à la fin des essais cinétiques ont donc ensuite été analysés par la microscopie électronique à transmission (TEM). Comme il est possible de l'observer à la figure 2.2H, la TEM a révélé des structures nanométriques désorganisées en présence des deux gallotannins, montrant des agrégats plus petits. Ceci contraste avec les fibres d'IAPP bien définies observées obtenues en absence de gallotannins. De plus, la présence de fibres définies était difficile à détecter dans les échantillons traités avec des gallotannins, suggérant que ces composés favorisent la formation de nanostructures non-fibrillaires. Ces résultats suggèrent que les deux gallotannins pourraient agir différemment sur l'autoassemblage de l'IAPP. En effet, bien que les deux réduisent la formation de fibres amyloïdes positives à la ThT, possiblement en influençant le processus d'élongation des fibres, le β -TGG semble avoir un effet plus général et non spécifique, tandis que la corilagine pourrait avoir un effet plus ciblé sur la nucléation secondaire.

Cependant, certaines limitations doivent être notées. Les essais ont été réalisés dans des conditions *in vitro* qui ne reproduisent pas entièrement la complexité du milieu biologique. Il faudrait des validations supplémentaires et une étude plus approfondie de l'effet des gallotannins sur la cinétique d'agrégation de l'IAPP dans différentes conditions de température et de pH, ainsi qu'en présence de membranes. En effet, tous ces facteurs influencent le processus d'agrégation de l'IAPP (Abedini, Plesner *et al.* 2016), et la validation de l'effet du β -TGG et de la corilagine dans ces conditions est nécessaire. Malgré ces limites, les résultats montrent clairement le potentiel des gallotannins à moduler l'agrégation de l'IAPP.

3.2 L'effet des gallotannins sur la morphologie des fibres d'IAPP

Étant donné que le β -TGG et la corilagine ont démontré un effet anti-agrégatif, il devient crucial d'examiner les caractéristiques morphologiques des fibres formées en présence de ces gallotannins pour mieux comprendre leur mécanisme d'action. Ainsi, dans cette étude, nous avons exploré comment les gallotannins β -TGG et corilagine influencent la structure et l'organisation des fibres d'IAPP.

L'analyse par spectroscopie CD a révélé des différences marquées dans la transition conformationnelle de l'IAPP en présence de ces polyphénols. Initialement, toutes les conditions ont présenté une conformation désordonnée, caractérisée par un minimum autour de 203 nm, indiquant la présence de monomères et d'espèces pré-fibrillaires désordonnés (Figure 2.3 A, gauche). Après 24 heures, l'IAPP seul montre une transition vers une structure riche en feuillets- β , comme en témoigne l'apparition d'un minimum à 220 nm (Figure 2.3 A, milieu). Une transition similaire a été observée avec la corilagine, mais pas avec le β -TGG, qui a maintenu une structure aléatoire. Après 72 heures, toutefois, toutes les conditions ont abouti à des structures dominées par des feuillets- β , caractérisées par un minimum unique autour de 218 nm (Figure 2.3 A, droite).

Ensuite, pour évaluer l'organisation mésoscopique des fibres, les fluorescences de l'ANS et de la ThT ont été mesurées après 72 heures d'incubation. L'ANS, qui peut interagir avec les surfaces hydrophobes des fibres amyloïdes, a montré une diminution significative de sa fluorescence en présence des gallotannins. En présence de corilagine, une réduction de plus de six fois a été observée (Figure 2.3 B). Ces résultats suggèrent que les polyphénols modifient l'accessibilité aux environnements hydrophobes des agrégats d'IAPP. Similairement, la fluorescence de la ThT montre une diminution importante en présence des deux gallotannins, avec une diminution plus marquée avec la corilagine (Figure 2.3 C).

Les images obtenues par TEM et AFM après 72 heures d'incubation ont révélé que les gallotannins réduisent la densité totale des fibres et modifient leur morphologie (Figure 2.3 D). Les fibres formées avec β -TGG étaient significativement plus courtes (150 nm de longueur en moyenne) et plus épaisses (8.9 nm) que celles de l'IAPP seul (0,6 à 3 μ m de longueur, 4 à 18 nm de hauteur). Avec la corilagine, les fibres étaient également raccourcies (220 nm) et plus fines (5 nm), accompagnées d'agrégats non fibrillaires observés par TEM (Figure 2.3 E, F). Il est à noter que seules les fibres totalement distinguables ont été comptées. Les agrégats amorphes ainsi que les régions de haute densité fibrillaire n'ont pas pu être quantifiées précisément et sont donc exclues des moyennes de longueur et d'épaisseur.

Ces résultats suggèrent que les deux gallotannins, β -TGG et corilagine, agissent sur l'élongation des fibres. Les données expérimentales proposent que le β -TGG pourrait ralentir la transition de l'IAPP d'une structure principalement monomérique à une structure oligomérique ou fibrillaire, tandis que la corilagine ne semble pas agir sur cet aspect. Cependant, les essais de fluorescence de l'ANS et de la ThT, ainsi que les images prises en AFM et en TEM montrent moins de fibres formées en présence des deux gallotannins,

avec un effet plus prononcé en présence de corilagine. Ceci soutient la présence de mécanismes d'interaction distincts entre la corilagine et le β -TGG, malgré leur similarité structurelle. Le β -TGG semble agir plus tôt dans la voie amyloïdogénique, tandis que la corilagine agirait potentiellement plus tard dans le processus d'agrégation. Ainsi, les deux composés se lient probablement aux extrémités des oligomères, à des étapes différentes du processus d'agrégation, ce qui empêche la formation de structures fibrillaires et favorise la formation de structures plus courtes et moins organisées.

3.3 Étude *in silico* des interactions entre l'IAPP et les gallotannins

Afin de confirmer les hypothèses suggérées précédemment, une étude *in silico* a été effectuée. Dans cette étude, des simulations de dynamique moléculaire (MD) tout-atome en solvant explicite ont été réalisées pour explorer les interactions entre l'IAPP et les gallotannins β -TGG et corilagine. À l'aide du logiciel GROMACS version 2023.3 et du champ de force AMBER99sb*-ildnp, nous avons examiné les interactions de ces composés avec l'IAPP sous ses formes hélicoïdale (3.3.1) et aléatoire (3.3.2).

3.3.1 Interactions des gallotannins avec la structure hélicoïdale de l'IAPP

La structure hélicoïdale de l'IAPP a été étudiée afin de mieux comprendre les interactions des gallotannins avec la structure bioactive du peptide. En effet, l'IAPP adopte une structure hélicoïdale lorsqu'en contact avec les membranes cellulaires. De plus, des preuves suggèrent l'existence d'une structure oligomérique intermédiaire hélicoïdale. Par conséquent, l'étude de cette structure est cruciale. Les structures hélicoïdales d'IAPP en présence de micelles SDS (2L86.pdb) ont été simulées avec les gallotannins initialement positionnés à 3 nm de distance dans une boîte dodécaédrique. Après 1000 ns de simulation, le complexe s'est stabilisé (Figure 2.9 A, B) et les interactions résultantes ont été analysées. Tel qu'illustré dans la figure 2.9, les deux gallotannins interagissent avec l'IAPP principalement en formant des ponts hydrogène, par interactions π - π et forces de van der Waals. La corilagine semble former plus d'interactions avec l'IAPP hélicoïdal avec 11 liaisons hydrogène, comparativement à 3 liaisons hydrogène pour le β -TGG.

3.3.2 Interactions des gallotannins avec la structure aléatoire de l'IAPP

Ensuite, afin de représenter les structures monomériques utilisées expérimentalement, l'IAPP en conformation aléatoire a été étudié *in silico*. La structure hélicoïdale précédemment utilisée a d'abord été simulée seule pendant 100 ns pour obtenir une structure désordonnée. Les gallotannins ont ensuite été ajoutés à une distance de 3nm dans une boîte dodécaédrique, similairement au complexe hélicoïdal. Les

simulations ont été effectuées pour une durée de 2000 ns et ont montré des complexes stables à partir de 500 ns (Figure 2.8). Similairement aux résultats avec l'IAPP hélicoïdal, les gallotannins interagissent avec l'IAPP désordonné principalement en formant des liaisons hydrogène et des interactions π - π . Cependant, les résultats révèlent des variations dans les sites d'interaction entre le β -TGG et la corilagine. La dernière semble former moins de liaisons avec l'IAPP sous forme aléatoire que le β -TGG. Celui-ci montre 8 liaisons hydrogène, tandis que la corilagine a 5 liaisons hydrogène. Les énergies libres de liaison calculées par la méthode MMPBSA sur GROMACS ont montré que le β -TGG et la corilagine se lient avec des ΔG apparents de -23 et -18 kcal/mol, respectivement.

Ces résultats indiquent que les deux gallotannins interagissent avec l'IAPP, qu'il soit sous forme hélicoïdale ou aléatoire. Cependant, la corilagine forme considérablement plus de liens hydrogène avec l'IAPP hélicoïdal, tandis que le β -TGG semble former plus de liens avec l'IAPP sous forme aléatoire. Ceci suggère que chacun des gallotannins interagit préférentiellement avec une espèce de l'IAPP, corroborant les hypothèses ultérieures d'un mécanisme d'interaction distinct pour chaque gallotannin. Ces résultats suggèrent que la corilagine aurait une préférence pour les conformations hélicoïdales et pourrait donc intervenir plus tard dans le processus d'agrégation. En effet, les espèces oligomériques intermédiaires pourraient avoir une structure en hélice (Pannuzzo, Raudino et al. 2013). Ces résultats soutiennent les observations précédentes suggérant une action plus tardive de la corilagine. De même, le β -TGG montre une préférence pour les espèces en conformation aléatoire, soutenant les résultats précédents proposant une action plus rapide du β -TGG.

Cependant, plusieurs limitations doivent être considérées. Bien que nous ayons ajouté trois ions chlorure (Cl^-) par monomère d'IAPP pour assurer la neutralité du système, les calculs *in silico* ne simulent pas les conditions de type physiologique. En effet, les simulations ont été réalisées dans des conditions simplifiées ne reflétant pas complètement l'environnement biologique complexe, notamment en l'absence de membranes cellulaires ou d'autres cofacteurs biologiques. De plus, la durée de simulation, bien que longue, pourrait être insuffisante pour capturer tous les états conformationnels possibles. Il est également difficile de représenter adéquatement la conformation désordonnée de l'IAPP monomérique, ainsi que les conformations oligomériques puisque celles-ci n'ont pas encore été modélisées. Il aurait été pertinent d'utiliser le « Hamiltonian replica exchange » (HREX), qui permet de simuler plusieurs trajectoires pour le même complexe en variant l'énergie potentielle ou la température afin d'explorer plusieurs paysages énergétiques. Ceci permet de s'assurer d'avoir une simulation juste et représentative de la réalité. Malgré

ces limites, ces simulations fournissent des informations clés sur les mécanismes d'interaction des galotannins avec l'IAPP et leur rôle potentiel dans la modulation de son agrégation toxique.

3.4 Mécanisme d'action de la corilagine

Vu la capacité de la corilagine à inhiber l'agrégation à plus petite concentration, ainsi que sa capacité suspectée d'interagir préférentiellement avec les oligomères toxiques, celle-ci a été privilégiée pour la suite des expériences. Puisque les résultats précédents suggèrent un effet sur la phase d'élongation, cette étude a exploré le mécanisme d'inhibition de la corilagine en se concentrant spécifiquement sur la phase d'élongation et sur la nucléation secondaire.

Pour valider cette hypothèse, une cinétique d'agrégation de l'IAPP a été effectuée, où des fibres préformées ont été introduites dans une solution de monomères d'IAPP. Ceci permet de catalyser la nucléation secondaire (Harper and Lansbury Jr 1997). Tel qu'il est possible de l'observer sur la figure 2.5 A, l'ajout de 5 % de fibres d'IAPP préformées a accéléré considérablement le processus d'agrégation, éliminant presque complètement la phase d'élongation. En présence d'un ratio molaire de 1:0,4 de corilagine, aucune modification notable du temps de latence ni du demi-temps n'a été observée, bien que l'intensité finale de fluorescence ThT ait été réduite (Figure 2.5 B). Cependant, à des concentrations équimolaires d'IAPP et de corilagine, la cinétique ressemble à celle de la condition sans fibres préformées, avec une réduction significative de la fluorescence totale. Ces résultats suggèrent que la corilagine inhibe l'effet catalytique des fibres préformées, suggérant un effet sur la nucléation secondaire.

L'effet de la corilagine a ensuite été évalué à différents points temporels de la cinétique d'agrégation. Lorsque la corilagine a été ajoutée au début ou à la fin de la phase de latence, les courbes cinétiques étaient similaires, indiquant une absence d'effet sur la phase de latence. Cependant, lorsque le galotannin a été introduit au début de la phase d'élongation, la fluorescence a rapidement diminué, se stabilisant à de faibles niveaux. Lorsque l'ajout est survenu plus tard dans l'élongation, une diminution rapide a été observée, mais l'intensité finale était plus élevée. La diminution rapide observée au moment de l'ajout de la corilagine suggère un effet d'agglomération des fibres et de blocage des sites d'élongation. Pour confirmer ceci, la turbidité des solutions a été mesurée à 600 nm. Comme il est possible de l'observer à la figure 2.5 H, la turbidité de l'IAPP était constante entre le début et la fin de l'incubation. Cependant, les échantillons incubés avec la corilagine ont montré une augmentation de l'absorbance, confirmant la formation de larges structures agglomérées.

Afin d'évaluer l'effet sur les fibres matures, la corilagine a également été rajoutée à la fin de la phase d'élongation. Comme il est possible de l'observer sur la figure 2.5 F, la courbe cinétique résultante est semblable à celle de l'IAPP sans corilagine. De plus, des simulations de dynamique moléculaire ont révélé que la corilagine forme des complexes stables avec la fibrille d'IAPP (6Y1A.pdb), établissant des liaisons hydrogène avec trois valines de surface, sans les désassembler. Cependant, les images d'AFM ont montré la formation de grands agrégats de corilagine et de fibres matures (Figure 2.10 B). D'ailleurs, ces agrégats sont associés à une réduction de la turbidité mesurée à 600 nm ainsi que de la fluorescence de la ThT. Il y a donc un effet agglomérant des fibres matures également.

Ces résultats suggèrent que l'impact de la corilagine est spécifique à l'étape d'élongation, ce qui valide les résultats précédents suggérant un effet sur la nucléation secondaire spécifiquement. Cet effet est comparable à l'effet de l'EGCG sur l'IAPP, où un effet spécifique sur la nucléation secondaire a été observé (Franko, Rodriguez Camargo *et al.* 2018). Malgré ces résultats, certaines limitations subsistent. D'abord, l'évaluation des effets de la corilagine sur des modèles simplifiés *in vitro* ne reflète pas entièrement la complexité biologique. Le mode d'action de la corilagine pourrait donc être totalement différent de ce qui est observé. Ensuite, la nature exacte des interactions spécifiques entre la corilagine et les surfaces fibrillaires reste à élucider. Enfin, l'effet potentiel de la corilagine sur d'autres types de peptides amyloïdes n'a pas été exploré, ce qui limite la généralisation des conclusions. Malgré cela, cette étude a pu démontrer que la corilagine agit principalement en bloquant l'élongation et la nucléation secondaire, probablement via la formation de assemblages fibrillaires complexes, réduisant ainsi l'efficacité des noyaux d'IAPP.

3.5 Effet de la corilagine sur la cytotoxicité induite par l'IAPP

L'IAPP induit une toxicité chez les cellules β pancréatiques à travers une multitude de mécanismes comme la perturbation membranaire, la production de ROS et le stress du RE, menant ultimement à la mort cellulaire (Raleigh, Zhang *et al.* 2017). Il est intéressant de noter que plusieurs hypothèses suggèrent que le processus de nucléation secondaire est principalement impliqué dans la production d'espèces cytotoxiques d'IAPP (Padrick and Miranker 2002). Ainsi, il est important d'évaluer le potentiel cyto-protecteur de la corilagine vu son effet ciblé sur la nucléation secondaire établi précédemment.

Cette étude visait donc à évaluer les effets cyto-protecteurs de la corilagine contre la cytotoxicité induite par les agrégats d'IAPP. Des essais de viabilité cellulaire ont été réalisés sur des cellules β pancréatiques INS-1E ainsi que les cellules d'ovaires de hamster chinois CHO-K1 pour explorer les effets de la corilagine.

L'IAPP a été pré-incubé seul ou en présence du gallotannin à différentes concentrations pendant trois heures afin de permettre la formation d'oligomères toxiques, qui ont ensuite été appliquées sur les deux types de cellules (Kihal, Nguyen et al. 2024). La cytotoxicité de l'IAPP seul ou en présence de corilagine a donc été évaluée en utilisant le test d'activité métabolique de la résazurine. Comme il est possible de l'observer sur la figure 2.12 A, l'ajout de corilagine a un effet cyto-protecteur et agit de façon concentration-dépendante. Le ratio molaire IAPP:corilagine de 1:4 a montré la meilleure inhibition de la mort cellulaire, où plus de 80 % des cellules ont conservé leur activité métabolique. Ce ratio a donc été retenu pour les essais subséquents. Ensuite, pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents, l'intégrité membranaire des cellules INS-1E a été évaluée à l'aide d'un essai Live/Dead. Les images de microscopie confocale montrent une augmentation notable des cellules mortes marquées avec le bromure d'éthidium homodimère (en rouge) en présence d'IAPP seul, tandis que l'IAPP pré-incubé avec la corilagine réduit significativement cette proportion au ratio 1:4 (Figure 2.6 A). Les résultats quantifiés confirment cet effet protecteur de la corilagine sur la membrane cellulaire (Figure 2.6 B). Cette observation a été corroborée par des tests LDH sur des cellules CHO-K1, qui démontrent également une protection dépendante de la concentration contre les perturbations membranaires induites par l'IAPP.

L'effet de la corilagine sur l'apoptose a ensuite été exploré en utilisant un marquage à l'annexine V-FITC et à l'iodure de propidium (PI). Ces marqueurs sont supposés émettre une fluorescence rouge pour les cellules en apoptose tardive, une co-localisation du vert et du rouge pour les cellules en début d'apoptose et une fluorescence faible verte pour les cellules vivantes. Les images confocales de la figure 2.6 D révèlent une absence de fluorescence indicative d'apoptose dans les cellules traitées avec la corilagine, contrairement aux cellules traitées avec l'IAPP seule, qui affichent des niveaux similaires à ceux des contrôles traités au H₂O₂. Les données quantifiées confirment que la corilagine réduit efficacement l'apoptose induite par l'IAPP (Figure 2.6 E). Enfin, la production d'espèces réactives de l'oxygène, un mécanisme clé de la cytotoxicité, a été évaluée dans des cellules CHO-K1 à l'aide de l'essai au dihydroéthidium (DHE). Les niveaux de ROS ont diminué de manière significative en présence de corilagine, selon une relation dose-dépendante (Figure 2.12 C). Ces résultats démontrent la capacité de la corilagine à moduler la cytotoxicité de l'IAPP en démontrant un effet simultané sur plusieurs processus de toxicité cellulaire médiés par l'IAPP.

Bien que ces résultats démontrent des effets intéressants contre la toxicité de l'IAPP, les essais *in vitro* ne reflètent pas totalement l'environnement biologique complexe, en particulier en termes d'interactions

multicellulaires ou de l'impact systémique de la corilagine. Une étude de la cytotoxicité basée sur les cellules uniques pourraient offrir une plus grande sensibilité et aider à identifier des inhibiteurs plus puissants que les essais standard basés sur les cultures cellulaires (Jonczyk, Kurth *et al.* 2016, Asthana, Mallick *et al.* 2018). Néanmoins, l'utilisation de lignées cellulaires β pancréatiques ou des modèles de cellules β reste particulièrement utile, car ces cellules fournissent des informations directes sur l'efficacité des inhibiteurs potentiels contre la toxicité amyloïde de l'IAPP (Asthana, Mallick *et al.* 2018). Cependant, des études plus approfondies sont nécessaires pour clarifier les cibles moléculaires précises de la corilagine. Enfin, l'effet potentiel sur d'autres types cellulaires ou en utilisant d'autres peptides amyloïdes n'a pas été exploré, limitant la portée des conclusions. En somme, ces résultats confirment les propriétés cytoprotectrices de la corilagine, agissant via la préservation de l'intégrité membranaire, la réduction de l'apoptose et l'atténuation des niveaux de ROS. Ces résultats soulignent son potentiel en tant qu'agent thérapeutique contre la toxicité de l'IAPP.

3.6 Limitations générales de l'étude

L'IAPP est présente dans la circulation sanguine à des concentrations de l'ordre du picomolaire, autour de 3 à 5 pM chez les rats (Akter, Cao *et al.* 2016). Dans le cadre du diabète, les concentrations locales d'IAPP peuvent atteindre 15 pM (Akter, Cao *et al.* 2016). Cependant, les essais *in vitro* nécessitent des concentrations plus élevées, allant de 25 à 75 μ M (Hebda, Saraogi *et al.* 2009). Pour les essais cellulaires, ces concentrations sont nécessaires pour induire la mort cellulaire et engendrer un signal de cytotoxicité suffisant pour être détecté (Meng, Marek *et al.* 2008). Par conséquent, des concentrations élevées d'inhibiteurs sont nécessaires, ce qui fait que la plupart des agents anti-agrégatifs étudiés ont un IC_{50} de l'ordre du micromolaire, voire du millimolaire (Alexandrescu 2000). Ces conditions expérimentales rendent donc difficile l'estimation des doses qui seraient réellement utilisées *in vivo*. Néanmoins, il est à noter que les concentrations locales au niveau des granules de sécrétion sont plus hautes que celles en circulation (Akter, Cao *et al.* 2016), ce qui peut justifier l'utilisation de concentrations plus élevées.

Il est essentiel de tester les gallotannins dans des conditions expérimentales plus proches de la réalité biologique, notamment en présence de membranes cellulaires et à différents pH correspondant aux variations physiologiques des différentes parties du corps rencontrées après l'administration du composé. Cette approche permettrait de mieux comprendre leur stabilité et leur comportement dans le corps humain (Abuhelwa, Williams *et al.* 2017). De plus, l'évaluation de l'activité des gallotannins dans des modèles *in vivo* est cruciale pour étudier les mécanismes biologiques activés en réponse à leur

administration, tels que les interactions avec les enzymes ou les cellules immunitaires (Liu and Jia 2007). En particulier, la formation de larges agrégats observée avec la corilagine soulève des questions importantes sur leur élimination par l'organisme. Il est donc nécessaire de déterminer si ces structures peuvent être dégradées ou si elles risquent de s'accumuler dans les tissus, ce qui pourrait avoir des implications toxicologiques. L'étude des processus de phagocytose et du rôle du protéasome dans la dégradation de ces agrégats est primordiale, car ces mécanismes jouent un rôle clé dans l'élimination des complexes protéiques volumineux et le maintien de l'homéostasie cellulaire (Glickman and Ciechanover 2002).

De plus, la biodisponibilité des gallotannins n'est pas encore établie. En effet, une grande attention est portée à l'identification de polyphénols et l'étude de leurs propriétés, mais leur biodisponibilité est très variable au vu de leur diversité structurale (Scalbert, Morand *et al.* 2002). La biodisponibilité des molécules naturelles dépend de plusieurs facteurs tels que les caractéristiques chimiques et physiques du composé, la stabilité du processus digestif, ainsi que leur métabolisation par les enzymes intestinales, le foie et le microbiote intestinal (Câmara, Albuquerque *et al.* 2020, Wojtunik-Kulesza, Oniszczuk *et al.* 2020). La bioaccessibilité des polyphénols, en particulier, peut être influencée par leur taille. En effet, les petits polyphénols sont facilement absorbés à travers la barrière intestinale, mais les polyphénols plus larges sont très peu absorbés (Scalbert, Morand *et al.* 2002). Les fluides sécrétés par le tractus gastro-intestinal au cours du processus de digestion jouent aussi un rôle important dans leur biodisponibilité (Wojtunik-Kulesza, Oniszczuk *et al.* 2020). Des études sur les anthocyanines, typiquement retrouvées dans les fruits rouges et les oignons rouges, ont récemment révélé leur faible biodisponibilité (Tena, Martín *et al.* 2020). En effet, seulement 1 à 2 % des anthocyanines ingérées conservent leur structure moléculaire d'origine (Tena, Martín *et al.* 2020, Bertelli, Biagi *et al.* 2021). Cela s'explique par les variations de pH dans le tractus gastro-intestinal et les réactions hydrolytiques des enzymes de l'intestin grêle. De plus, le fait que ces composés peuvent interagir de manière imprévisible avec d'autres molécules est souvent négligé. Les processus de métabolisation de phase 2 dans l'intestin et le foie, comme la glucuronidation et la méthylation, peuvent avoir un effet significatif sur la transformation de ces composés, en plus de l'action enzymatique et catabolique du microbiote intestinal (Tena, Martín *et al.* 2020).

Comme continuation à cette étude, il serait possible d'étudier le métabolisme des gallotannins en utilisant des modèles porcins, dont la physiologie digestive et le métabolisme sont proches de ceux de l'humain, en particulier pour l'absorption et le métabolisme des polyphénols (Chen, Kritchevsky *et al.* 2015). Il est

également possible d'utiliser des souris transgéniques exprimant l'IAPP humain, ce qui fait en sorte qu'elles peuvent développer le diabète de type 2 de façon spontanée après environ 10 mois (Janson, Soeller et al. 1996). Ces souris homozygotes hIAPP/VB/N montrent une déposition intracellulaire et extracellulaire d'IAPP, accompagnée par une perte importante des cellules β -pancréatiques (Janson, Soeller et al. 1996, Matveyenko and Butler 2006). Ces modèles seraient donc pertinents pour l'étude de la biodisponibilité des polyphénols et de leur capacité à inhiber l'agrégation de l'IAPP, à la fois en les administrant avant et après le développement du T2DM.

3.7 Impact de l'étude

Les molécules d'origine naturelle sont importantes pour la découverte de nouveaux médicaments en raison de leur diversité chimique et de leurs propriétés biologiques uniques (Velander, Wu *et al.* 2017). De nombreux médicaments modernes, tels que la morphine et la pénicilline, ont été découverts à partir de sources naturelles, démontrant l'efficacité des composés naturels dans le traitement de maladies variées (Newman and Cragg 2020). Notamment, les polyphénols jouent un rôle crucial dans la conception de nouveaux médicaments en raison de leurs propriétés biologiques variées et de leurs bienfaits démontrés pour la santé (Abbas, Saeed *et al.* 2017). La compréhension des mécanismes par lesquels les gallotannins peuvent moduler l'agrégation de l'IAPP est donc essentielle pour identifier des cibles efficaces dans le mécanisme d'agrégation de l'IAPP et comprendre quelles molécules utiliser pour le design de molécules inhibitrices efficaces.

Les résultats obtenus montrent que la corilagine a la capacité d'inhiber significativement la nucléation secondaire de l'IAPP. Cette étape de nucléation est particulièrement importante dans la formation de fibres amyloïdes. Une étude a également démontré que la nucléation secondaire est fortement impliquée dans l'agrégation membranaire de l'IAPP (Elenbaas, Khemtemourian *et al.* 2022). Certaines études démontrent même que les agents ciblant la nucléation secondaire seraient les plus efficaces (Rodriguez Camargo, Chia et al. 2021). Ainsi, les propriétés inhibitrices de la corilagine représentent une piste importante pour la compréhension des mécanismes d'agrégation de l'IAPP et l'identification de cibles pertinentes pour avoir une inhibition efficace de l'agrégation. En effet, cibler la nucléation secondaire pourrait offrir une intervention plus efficace et spécifique pour contrôler les maladies amyloïdes en limitant la propagation rapide des espèces oligomériques toxiques, sans compromettre la stabilité des protéines monomériques. Ainsi, contrairement aux anticorps monoclonaux présents sur le marché en ce moment, qui visent principalement les fibres matures, ce qui signifie une intervention à un stade tardif de

la maladie, cibler la nucléation secondaire permettrait de freiner la progression précoce des dépôts amyloïdes ou au moins significativement retarder celle-ci.

Il est important de souligner la différence dans l'action du β -TGG et de la corilagine, malgré leur structure très semblable. Cette différence peut être causée par leur conformation au moment d'interagir avec l'IAPP. En effet, la liaison entre deux cycles aromatiques dans la corilagine la rend plus rigide que le β -TGG, connu pour sa flexibilité (Gaudreault, van de Ven *et al.* 2002). Il est possible que les deux gallotannins adoptent des conformations différentes au contact avec l'IAPP, entraînant un effet différent (Haddad, Gaudreault *et al.* 2022). En effet, plusieurs études ont démontré que les molécules agissant de façon planaire avec les protéines amyloïdes montrent une meilleure efficacité (Mizuno, Mori *et al.* 2019). Une analyse des structures obtenues à partir des simulations de MD a démontré que la corilagine interagirait avec l'IAPP avec une structure planaire, contrairement au β -TGG (Figure 2.8 E, F). En outre, la conformation du glucose central pourrait influencer l'interaction des gallotannins avec l'IAPP. En effet, le glucose du β -TGG et celui de la corilagine favorisent des conformations différentes (Gaudreault, van de Ven *et al.* 2002). Les résultats de MD montrent que le β -TGG adopte une conformation en chaise au contact avec l'IAPP, tandis que la corilagine adopte une conformation « skew-boat » en présence d'IAPP, suggérant une influence potentielle sur l'agrégation du peptide.

En somme, ces résultats montrent un effet inhibiteur significatif de l'agrégation de l'IAPP par les deux gallotannins. En particulier, la corilagine cible la nucléation secondaire, l'étape qui est critique pour l'amplification des dépôts amyloïdes. Ceci démontre son potentiel thérapeutique considérable et la pertinence de continuer les recherches en utilisant ce gallotannin comme base pour le développement d'agents anti-agrégatifs efficaces.

CONCLUSION

Les protéines amyloïdes, comme l'IAPP, jouent un rôle central dans le développement de maladies graves, notamment le diabète de type II. Comprendre les mécanismes d'agrégation de l'IAPP, en particulier les étapes de nucléation primaire et secondaire, est essentiel pour développer des stratégies ciblées afin de prévenir ou limiter les dommages cellulaires et les complications métaboliques associées. D'ailleurs, l'utilisation de molécules naturelles comme les polyphénols, et plus particulièrement les gallotannins, représente une approche prometteuse pour inhiber l'agrégation amyloïde. Ces composés, présents dans de nombreux végétaux, possèdent des propriétés chimiques et structurales qui leur permettent d'interagir avec les monomères ou fibres d'IAPP et d'empêcher leur élongation. De plus, étant d'origine naturelle, ces composés ont généralement une faible toxicité, faisant d'elles des options thérapeutiques sécuritaires. Les études montrent que les gallotannins perturbent le processus d'autoassemblage en modifiant la cinétique d'agrégation, en empêchant l'élongation des fibres et/ou en réduisant la formation de structures amyloïdes bien définies. Ces propriétés confèrent aux polyphénols un fort potentiel thérapeutique. Contrairement à de nombreuses molécules synthétiques, les polyphénols sont souvent mieux tolérés par l'organisme et peuvent offrir des bénéfices additionnels grâce à leurs effets antioxydants et anti-inflammatoires.

Ainsi, ce projet a permis de caractériser l'effet de deux polyphénols, le β -TGG et la corilagine, sur l'agrégation de l'IAPP, ainsi que d'élucider le mécanisme d'action par lequel la corilagine agit et prévient la cytotoxicité sur des cellules β pancréatiques. Les principales observations de cette étude sont :

- 1) Les deux gallotannins étudiés, β -TGG et corilagine, montrent d'importantes propriétés inhibitrices contre l'agrégation amyloïde de l'IAPP, en empêchant l'élongation des fibres, résultant en des agrégats fibrillaires plus courts et moins denses.
- 2) Les deux gallotannins montrent un mode d'action différent, potentiellement dû à la conformation avec laquelle ils interagissent avec l'IAPP.
- 3) La corilagine montre une meilleure affinité pour l'IAPP hélicoïdal, tandis que le β -TGG semble mieux interagir avec les monomères d'IAPP sous conformation aléatoire.
- 4) La corilagine agit seulement durant l'étape d'élongation du processus d'agrégation et cible précisément la nucléation secondaire.

- 5) La corilagine est capable d'inhiber significativement la cytotoxicité de l'IAPP au même ratio moléculaire permettant d'inhiber la nucléation secondaire.

Ces résultats mettent en évidence l'effet thérapeutique important de la corilagine. En effet, comparé à la nucléation primaire, la nucléation secondaire contribue davantage à la formation d'agrégats amyloïdes. En ciblant celle-ci, on pourrait atteindre un effet thérapeutique significatif, même avec une inhibition partielle. Ainsi, cette étude permet non seulement de découvrir de nouvelles thérapies ou inspirations de thérapies pour les amyloïdoses et le T2DM en particulier, mais permet également de mieux comprendre le mode de fonctionnement de l'IAPP, les facteurs favorisant son agrégation, l'importance de la nucléation secondaire, ainsi que d'en apprendre plus sur les composés thérapeutiques les plus adaptés pour contrer sa cytotoxicité.

L'exploration de ces approches naturelles est essentielle dans le contexte actuel, où les traitements disponibles pour les maladies liées aux agrégats amyloïdes sont limités. Les résultats obtenus jusqu'à présent démontrent non seulement le potentiel des gallotannins pour inhiber l'agrégation de l'IAPP, mais ouvrent également des perspectives pour l'application de ces molécules à d'autres amyloïdopathies, comme la maladie d'Alzheimer. En combinant des études mécanistiques approfondies et l'utilisation de composés naturels, des stratégies innovantes et moins invasives peuvent être développées pour contrer ces maladies invalidantes.

Pour les recherches futures, il serait nécessaire d'évaluer l'effet des gallotannins *in vivo* afin de mieux comprendre les conditions nécessaires à leur efficacité optimale. Par exemple, vérifier si le composé reste actif malgré les variations de pH et de température, ou si son action demeure spécifique en présence d'autres composantes biologiques telles que les membranes cellulaires, différentes enzymes, et cofacteurs. Il serait également intéressant de créer une bibliothèque de dérivés de corilagine pour déterminer quelles composantes sont essentielles pour inhiber l'agrégation de l'IAPP et pour augmenter le potentiel inhibiteur de la corilagine. De plus, il serait pertinent d'étudier l'effet des gallotannins et de leurs dérivés sur d'autres protéines amyloïdes, telles que l'A β et la protéine tau, ainsi que de réaliser des expériences de « cross-seeding » en utilisant l'IAPP en présence d'A β , comme dans le contexte de la maladie d'Alzheimer.

RÉFÉRENCES

Abbas, M., F. Saeed, F. M. Anjum, M. Afzaal, T. Tufail, M. S. Bashir, A. Ishtiaq, S. Hussain and H. A. R. Suleria (2017). "Natural polyphenols: An overview." International Journal of Food Properties **20**(8): 1689-1699.

Abedini, A., A. Plesner, P. Cao, Z. Ridgway, J. Zhang, L.-H. Tu, C. T. Middleton, B. Chao, D. J. Sartori and F. Meng (2016). "Time-resolved studies define the nature of toxic IAPP intermediates, providing insight for anti-amyloidosis therapeutics." Elife **5**: e12977.

Abedini, A. and D. P. Raleigh (2005). "The role of His-18 in amyloid formation by human islet amyloid polypeptide." Biochemistry **44**(49): 16284-16291.

Abuhelwa, A. Y., D. B. Williams, R. N. Upton and D. J. Foster (2017). "Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption." European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics **112**: 234-248.

Ahmad, A. and R. Mishra (2022). "Polyol and sugar osmolytes stabilize the molten globule state of α -lactalbumin and inhibit amyloid fibril formation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics **1870**(11-12): 140853.

Ahmad, E., S. Lim, R. Lamptey, D. R. Webb and M. J. Davies (2022). "Type 2 diabetes." The Lancet **400**(10365): 1803-1820.

Akter, R., P. Cao, H. Noor, Z. Ridgway, L.-H. Tu, H. Wang, A. G. Wong, X. Zhang, A. Abedini and A. M. Schmidt (2016). "Islet amyloid polypeptide: structure, function, and pathophysiology." Journal of diabetes research **2016**(1): 2798269.

Alawode, D. O., A. J. Heslegrave, N. C. Fox and H. Zetterberg (2021). "Donanemab removes Alzheimer's plaques: what is special about its target?" The Lancet Healthy Longevity **2**(7): e395-e396.

Alexandrescu, A. T. (2000). An NMR-based quenched hydrogen exchange investigation of model amyloid fibrils formed by cold shock protein A. Biocomputing 2001, World Scientific: 67-78.

Alghrably, M., I. Czaban, Ł. Jaremko and M. Jaremko (2019). "Interaction of amylin species with transition metals and membranes." Journal of inorganic biochemistry **191**: 69-76.

Almatroodi, S. A., M. A. Alsahli, A. SM Aljohani, F. A. Alhumaydhi, A. Y. Babiker, A. A. Khan and A. H. Rahmani (2022). "Potential therapeutic targets of resveratrol, a plant polyphenol, and its role in the therapy of various types of cancer." Molecules **27**(9): 2665.

Almeida, Z. L. and R. M. Brito (2020). "Structure and aggregation mechanisms in amyloids." Molecules **25**(5): 1195.

Alrouji, M., H. M. Al-Kuraishy, A. I. Al-Gareeb, A. Alexiou, M. Papadakis, H. M. Saad and G. E.-S. Batiha (2023). "The potential role of human islet amyloid polypeptide in type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's diseases." Diabetology & Metabolic Syndrome **15**(1): 101.

Andreetto, E., L. M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, R. Frank and A. Kapurniotu (2010). "Identification of Hot Regions of the A β –IAPP Interaction Interface as High-Affinity Binding Sites in both Cross-and Self-Association." Angewandte Chemie International Edition **17**(49): 3081-3085.

Apostolidou, M., S. A. Jayasinghe and R. Langen (2008). "Structure of α -helical membrane-bound human islet amyloid polypeptide and its implications for membrane-mediated misfolding." Journal of Biological Chemistry **283**(25): 17205-17210.

Association, A. D. (2021). "2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2021." Diabetes care **44**(Supplement_1): S15-S33.

Asthana, S., B. Mallick, A. T. Alexandrescu and S. Jha (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**(9): 1765-1782.

Axell, E., J. Hu, M. Lindberg, A. J. Dear, L. Ortigosa-Pascual, E. A. Andrzejewska, G. Šneiderienė, D. Thacker, T. P. Knowles and E. Sparr (2024). "The role of shear forces in primary and secondary nucleation of amyloid fibrils." Proceedings of the National Academy of Sciences **121**(25): e2322572121.

Bailey, R., C. Walker, A. Ferner, K. Loomes, G. Prijic, A. Halim, L. Whiting, A. Phillips and D. Hay (2012). "Pharmacological characterization of rat amylin receptors: implications for the identification of amylin receptor subtypes." British journal of pharmacology **166**(1): 151-167.

Bertelli, A., M. Biagi, M. Corsini, G. Bainsi, G. Cappellucci and E. Miraldi (2021). "Polyphenols: From theory to practice." Foods **10**(11): 2595.

Bhullar, K. S. and H. V. Rupasinghe (2013). "Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases." Oxidative medicine and cellular longevity **2013**(1): 891748.

Bieschke, J., J. Russ, R. P. Friedrich, D. E. Ehrnhoefer, H. Wobst, K. Neugebauer and E. E. Wanker (2010). "EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(17): 7710-7715.

Biessels, G. J., S. Staekenborg, E. Brunner, C. Brayne and P. Scheltens (2006). "Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review." The Lancet Neurology **5**(1): 64-74.

Bower, R. L. and D. L. Hay (2016). "Amylin structure–function relationships and receptor pharmacology: implications for amylin mimetic drug development." British journal of pharmacology **173**(12): 1883-1898.

Brailovsky, Y., I. Rajapreyar and R. Alvarez (2023). TTR amyloidosis: current state of affairs and promise for the future, American College of Cardiology Foundation Washington DC. **10**: 101759.

Bram, Y., A. Frydman-Marom, I. Yanai, S. Gilead, R. Shaltiel-Karyo, N. Amdursky and E. Gazit (2014). "Apoptosis induced by islet amyloid polypeptide soluble oligomers is neutralized by diabetes-associated specific antibodies." Scientific reports **4**(1): 4267.

Brender, J. R., K. Hartman, R. P. R. Nanga, N. Popovych, R. de la Salud Bea, S. Vivekanandan, E. N. G. Marsh and A. Ramamoorthy (2010). "Role of zinc in human islet amyloid polypeptide aggregation." Journal of the American Chemical Society **132**(26): 8973-8983.

Bruno, E., C. Pereira, K. P. Roman, M. Takiguchi, P.-Y. Kao, L. A. Nogaj and D. A. Moffet (2013). "IAPP aggregation and cellular toxicity are inhibited by 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- β -D-glucose." Amyloid **20**(1): 34-38.

Bulic, B., M. Pickhardt, E.-M. Mandelkow and E. Mandelkow (2010). "Tau protein and tau aggregation inhibitors." Neuropharmacology **59**(4-5): 276-289.

Câmara, J. S., B. R. Albuquerque, J. Aguiar, R. C. Corrêa, J. L. Gonçalves, D. Granato, J. A. Pereira, L. Barros and I. C. Ferreira (2020). "Food bioactive compounds and emerging techniques for their extraction: Polyphenols as a case study." Foods **10**(1): 37.

Cao, P., P. Marek, H. Noor, V. Patsalo, L.-H. Tu, H. Wang, A. Abedini and D. P. Raleigh (2013). "Islet amyloid: from fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity." FEBS letters **587**(8): 1106-1118.

Cao, P. and D. P. Raleigh (2012). "Analysis of the inhibition and remodeling of islet amyloid polypeptide amyloid fibers by flavanols." Biochemistry **51**(13): 2670-2683.

Chatterjee, S., K. Khunti and M. J. Davies (2017). "Type 2 diabetes." The lancet **389**(10085): 2239-2251.

Chen, L., Z. Zhuang, H. Duan, D. Lv, S. Hong, P. Chen, B. He and Z. Shen (2024). "Corilagin improves cognitive impairment in APP/PS1 mice by reducing A β generation and enhancing synaptic plasticity." European Journal of Pharmacology **981**: 176893.

Chen, T. Y., J. Kritchevsky, K. Hargett, K. Feller, R. Klobusnik, B. J. Song, B. Cooper, Z. Jouni, M. G. Ferruzzi and E. M. Janle (2015). "Plasma bioavailability and regional brain distribution of polyphenols from apple/grape seed and bilberry extracts in a young swine model." Molecular nutrition & food research **59**(12): 2432-2447.

Chiti, F. and C. M. Dobson (2017). "Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade." Annual review of biochemistry **86**(1): 27-68.

Choi, Y.-T., C.-H. Jung, S.-R. Lee, J.-H. Bae, W.-K. Baek, M.-H. Suh, J. Park, C.-W. Park and S.-I. Suh (2001). "The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates β -amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons." Life sciences **70**(5): 603-614.

Ciechanover, A. and Y. T. Kwon (2015). "Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies." Experimental & molecular medicine **47**(3): e147-e147.

Come, J. H., P. E. Fraser and P. T. Lansbury Jr (1993). "A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(13): 5959-5963.

Cunningham, D. F. and B. O'Connor (1997). "Proline specific peptidases." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology **1343**(2): 160-186.

Daval, M., S. Bedrood, T. Gurlo, C.-J. Huang, S. Costes, P. C. Butler and R. Langen (2010). "The effect of curcumin on human islet amyloid polypeptide misfolding and toxicity." Amyloid **17**(3-4): 118-128.

de Almeida, N. E., T. D. Do, N. E. LaPointe, M. Tro, S. C. Feinstein, J.-E. Shea and M. T. Bowers (2017). "1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose binds to the N-terminal metal binding region to inhibit amyloid β -protein oligomer and fibril formation." International journal of mass spectrometry **420**: 24-34.

De Felice, F. G., R. A. Gonçalves and S. T. Ferreira (2022). "Impaired insulin signalling and allostatic load in Alzheimer disease." Nature Reviews Neuroscience **23**(4): 215-230.

Dobson, C. M., A. Šali and M. Karplus (1998). "Protein folding: a perspective from theory and experiment." Angewandte Chemie International Edition **37**(7): 868-893.

Doran, T. M., A. J. Kamens, N. K. Byrnes and B. L. Nilsson (2012). "Role of amino acid hydrophobicity, aromaticity, and molecular volume on IAPP (20–29) amyloid self-assembly." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **80**(4): 1053-1065.

Dubey, R., K. Patil, S. C. Dantu, D. M. Sardesai, P. Bhatia, N. Malik, J. D. Acharya, S. Sarkar, S. Ghosh and R. Chakrabarti (2019). "Azadirachtin inhibits amyloid formation, disaggregates pre-formed fibrils and protects pancreatic β -cells from human islet amyloid polypeptide/amylin-induced cytotoxicity." Biochemical Journal **476**(5): 889-907.

Duckworth, W., C. Abraira, T. Moritz, D. Reda, N. Emanuele, P. D. Reaven, F. J. Zieve, J. Marks, S. N. Davis and R. Hayward (2009). "Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes." New England journal of medicine **360**(2): 129-139.

Edwards, G., B. Gedulin, C. Jodka, R. Dilts, C. Miller and A. Young (1998). "Area postrema (AP)-lesions block the regulation of gastric emptying by amylin." Gastroenterology(114): A748.

Eizirik, D. L., A. K. Cardozo and M. Cnop (2008). "The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus." Endocrine reviews **29**(1): 42-61.

El Saghir, A., G. Farrugia and N. Vassallo (2021). "The human islet amyloid polypeptide in protein misfolding disorders: Mechanisms of aggregation and interaction with biomembranes." Chemistry and Physics of Lipids **234**: 105010.

Elenbaas, B. O., L. Khemtemourian, J. A. Killian and T. Sinnige (2022). "Membrane-catalyzed aggregation of islet amyloid polypeptide is dominated by secondary nucleation." Biochemistry **61**(14): 1465-1472.

Engel, M. F. (2009). "Membrane permeabilization by islet amyloid polypeptide." Chemistry and physics of lipids **160**(1): 1-10.

Ferreira, S., A. F. Raimundo, R. Menezes and I. C. Martins (2021). "Islet amyloid polypeptide & amyloid beta peptide roles in Alzheimer's disease: two triggers, one disease." Neural regeneration research **16**(6): 1127-1130.

Fortier, M., M. Côté-Cyr, V. Nguyen, M. Babych, P. T. Nguyen, R. Gaudreault and S. Bourgault (2022). "Contribution of the 12–17 hydrophobic region of islet amyloid polypeptide in self-assembly and cytotoxicity." Frontiers in Molecular Biosciences **9**: 1017336.

Franko, A., D. C. Rodriguez Camargo, A. Böddrich, D. Garg, A. Rodriguez Camargo, B. Rathkolb, D. Janik, M. Aichler, A. Feuchtinger and F. Neff (2018). "Epigallocatechin gallate (EGCG) reduces the intensity of pancreatic amyloid fibrils in human islet amyloid polypeptide (hIAPP) transgenic mice." Scientific reports **8**(1): 1116.

Fujiwara, H., M. Tabuchi, T. Yamaguchi, K. Iwasaki, K. Furukawa, K. Sekiguchi, Y. Ikarashi, Y. Kudo, M. Higuchi and T. C. Saido (2009). "A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid β proteins in vitro and in vivo." Journal of neurochemistry **109**(6): 1648-1657.

Gade Malmos, K., L. M. Blancas-Mejia, B. Weber, J. Buchner, M. Ramirez-Alvarado, H. Naiki and D. Otzen (2017). "ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation." Amyloid **24**(1): 1-16.

Gaudreault, R., V. Hervé, T. G. van de Ven, N. Mousseau and C. Ramassamy (2021). "Polyphenol-peptide interactions in mitigation of Alzheimer's disease: role of biosurface-induced aggregation." Journal of Alzheimer's Disease **81**(1): 33-55.

Gaudreault, R., T. G. van de Ven and M. A. Whitehead (2002). "Molecular modeling of poly (ethylene oxide) model cofactors; 1, 3, 6-tri-O-galloyl- β -D-glucose and corilagin." Molecular modeling annual **8**: 73-80.

Genheden, S. and U. Ryde (2015). "The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities." Expert opinion on drug discovery **10**(5): 449-461.

Giorgetti, S., C. Greco, P. Tortora and F. A. Aprile (2018). "Targeting amyloid aggregation: an overview of strategies and mechanisms." International journal of molecular sciences **19**(9): 2677.

Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." Physiological reviews.

Götz, J., Y.-A. Lim and A. Eckert (2013). "Lessons from two prevalent amyloidoses—what amylin and A β have in common." Frontiers in aging neuroscience **5**: 38.

Gross, A. and S. G. Katz (2017). "Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins." Cell Death & Differentiation **24**(8): 1348-1358.

Group, U. P. D. S. (1998). "Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)." The lancet **352**(9131): 837-853.

Guillausseau, P.-J., T. Meas, M. Virally, M. Laloi-Michelin, V. Médeau and J.-P. Kevorkian (2008). "Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus." Diabetes & metabolism **34**: S43-S48.

Haddad, M., R. Gaudreault, G. Sasseville, P. T. Nguyen, H. Wiebe, T. Van De Ven, S. Bourgault, N. Mousseau and C. Ramassamy (2022). "Molecular interactions of tannic acid with proteins associated with SARS-CoV-2 infectivity." International journal of molecular sciences **23**(5): 2643.

Han, Y.-L., H.-H. Yin, C. Xiao, M. T. Bernards, Y. He and Y.-X. Guan (2023). "Understanding the molecular mechanisms of polyphenol inhibition of amyloid β aggregation." ACS Chemical Neuroscience **14**(22): 4051-4061.

Harborne, J. B. and C. A. Williams (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." Phytochemistry **55**(6): 481-504.

Harper, J. D. and P. T. Lansbury Jr (1997). "Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins." Annual review of biochemistry **66**(1): 385-407.

Hartl, F. U., A. Bracher and M. Hayer-Hartl (2011). "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis." Nature **475**(7356): 324-332.

Hassanpour, A., C. A. De Carufel, S. Bourgault and P. Forgione (2014). "Synthesis of 2, 5-Diaryl-Substituted Thiophenes as Helical Mimetics: Towards the Modulation of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) Amyloid Fibril Formation and Cytotoxicity." Chemistry—A European Journal **20**(9): 2522-2528.

He, H.-F. (2022). "Recognition of gallotannins and the physiological activities: from chemical view." Frontiers in Nutrition **9**: 888892.

He, H.-F. (2023). Gallotannins. Handbook of food bioactive ingredients: Properties and applications, Springer: 427-441.

He, Q., B. Shi and K. Yao (2006). "Interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars." Food Chemistry **95**(2): 250-254.

Hebda, J. A., I. Saraogi, M. Magzoub, A. D. Hamilton and A. D. Miranker (2009). "A peptidomimetic approach to targeting pre-amyloidogenic states in type II diabetes." Chemistry & biology **16**(9): 943-950.

Hu, R., M. Zhang, H. Chen, B. Jiang and J. Zheng (2015). "Cross-seeding interaction between β -amyloid and human islet amyloid polypeptide." ACS chemical neuroscience **6**(10): 1759-1768.

Hu, Y., X. Hu, Y. Lu, S. Shi, D. Yang and T. Yao (2020). "New strategy for reducing tau aggregation cytologically by a hairpinlike molecular inhibitor, tannic acid encapsulated in liposome." ACS Chemical Neuroscience **11**(21): 3623-3634.

Hu, Y., D. Yang, Y. Tu, K. Chai, L. Chu, S. Shi and T. Yao (2021). "Dynamic-inspired perspective on the molecular inhibitor of Tau aggregation by glucose gallates based on human neurons." ACS Chemical Neuroscience **12**(21): 4162-4174.

Hull, R. L., S. Zraika, J. Udayasankar, R. Kisilevsky, W. A. Szarek, T. N. Wight and S. E. Kahn (2007). "Inhibition of glycosaminoglycan synthesis and protein glycosylation with WAS-406 and azaserine result

in reduced islet amyloid formation in vitro." American Journal of Physiology-Cell Physiology **293**(5): C1586-C1593.

Hussain, T., B. Tan, Y. Yin, F. Blachier, M. C. Tossou and N. Rahu (2016). "Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?" Oxidative medicine and cellular longevity **2016**(1): 7432797.

Iannuzzi, C., G. Irace and I. Sirangelo (2015). "The effect of glycosaminoglycans (GAGs) on amyloid aggregation and toxicity." Molecules **20**(2): 2510-2528.

Janciauskiene, S. and B. Ahren (2000). "Fibrillar islet amyloid polypeptide differentially affects oxidative mechanisms and lipoprotein uptake in correlation with cytotoxicity in two insulin-producing cell lines." Biochemical and biophysical research communications **267**(2): 619-625.

Jang, J.-H. and Y.-J. Surh (2003). "Protective effect of resveratrol on β -amyloid-induced oxidative PC12 cell death." Free Radical Biology and Medicine **34**(8): 1100-1110.

Janson, J., W. C. Soeller, P. C. Roche, R. T. Nelson, A. J. Torchia, D. K. Kreutter and P. C. Butler (1996). "Spontaneous diabetes mellitus in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide." Proceedings of the National Academy of Sciences **93**(14): 7283-7288.

Jha, S. (2009). The amyloidogenic propensity of human proislet amyloid polypeptide in the presence of lipids. Chemistry, Citeseer.

Jha, S., S. M. Patil, J. Gibson, C. E. Nelson, N. N. Alder and A. T. Alexandrescu (2011). "Mechanism of amylin fibrillization enhancement by heparin." Journal of Biological Chemistry **286**(26): 22894-22904.

Jiang, P., W. Li, J.-E. Shea and Y. Mu (2011). "Resveratrol inhibits the formation of multiple-layered β -sheet oligomers of the human islet amyloid polypeptide segment 22–27." Biophysical Journal **100**(6): 1550-1558.

Johnson, S. L., R. D. Kirk, N. A. DaSilva, H. Ma, N. P. Seeram and M. J. Bertin (2019). "Polyphenol microbial metabolites exhibit gut and blood–brain barrier permeability and protect murine microglia against LPS-induced inflammation." Metabolites **9**(4): 78.

Jonczyk, R., T. Kurth, A. Lavrentieva, J.-G. Walter, T. Scheper and F. Stahl (2016). "Living cell microarrays: an overview of concepts." Microarrays **5**(2): 11.

Kahn, S. E., S. Andrikopoulos and C. B. Verchere (1999). "Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes." Diabetes **48**(2): 241-253.

Kahn, S. E., C. B. Verchere, S. Andrikopoulos, P. J. Asberry, D. L. Leonetti, P. W. Wahl, E. J. Boyko, R. S. Schwartz, L. Newell-Morris and W. Y. Fujimoto (1998). "Reduced amylin release is a characteristic of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in Japanese Americans." Diabetes **47**(4): 640-645.

Kakinen, A., Y. Sun, I. Javed, A. Faridi, E. H. Pilkington, P. Faridi, A. W. Purcell, R. Zhou, F. Ding and S. Lin (2019). "Physical and toxicological profiles of human IAPP amyloids and plaques." Science bulletin **64**(1): 26-35.

Kamarudin, N. A., N. N. H. Nik Salleh and S. C. Tan (2021). "Gallotannin-enriched fraction from quercus infectoria galls as an antioxidant and inhibitory agent against human glioblastoma multiforme." Plants **10**(12): 2581.

Kanatsuka, A., S. Kou and H. Makino (2018). "IAPP/amylin and β -cell failure: Implication of the risk factors of type 2 diabetes." Diabetology international **9**(3): 143-157.

Kanatsuka, A., H. Makino, H. Ohsawa, Y. Tokuyama, T. Yamaguchi, S. Yoshida and M. Adachi (1989). "Secretion of islet amyloid polypeptide in response to glucose." FEBS letters **259**(1): 199-201.

Karvani, M., P. Simos, S. Stavrakaki and D. Kapoukranidou (2019). "Neurocognitive impairment in type 2 diabetes mellitus." Hormones **18**(4): 523-534.

Kayed, R., J. Bernhagen, N. Greenfield, K. Sweimeh, H. Brunner, W. Voelter and A. Kapurniotu (1999). "Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro." Journal of molecular biology **287**(4): 781-796.

Kayed, R., Y. Sokolov, B. Edmonds, T. M. McIntire, S. C. Milton, J. E. Hall and C. G. Glabe (2004). "Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases." Journal of Biological Chemistry **279**(45): 46363-46366.

Kee, J.-Y., Y.-H. Han, D.-S. Kim, J.-G. Mun, J. Park, M.-Y. Jeong, J.-Y. Um and S.-H. Hong (2016). "Inhibitory effect of quercetin on colorectal lung metastasis through inducing apoptosis, and suppression of metastatic ability." Phytomedicine **23**(13): 1680-1690.

Khalifa, J., S. Bourgault and R. Gaudreault (2023). "Interactions of Polyphenolic Gallotannins with Amyloidogenic Polypeptides Associated with Alzheimer's Disease: From Molecular Insights to Physiological Significance." Current Alzheimer Research **20**(9): 603-617.

Kihal, N., P. T. Nguyen, A. Nazemi, A. A. Greschner, M. A. Gauthier and S. Bourgault (2024). "DNA nanostructures prevent the formation of and convert toxic amyloid proteospecies into cytocompatible and biodegradable spherical complexes." Aggregate: e502.

Kiriyama, Y. and H. Nochi (2018). "Role and cytotoxicity of amylin and protection of pancreatic islet β -cells from amylin cytotoxicity." Cells **7**(8): 95.

Klabunde, T., H. M. Petrassi, V. B. Oza, P. Raman, J. W. Kelly and J. C. Sacchettini (2000). "Rational design of potent human transthyretin amyloid disease inhibitors." Nature structural biology **7**(4): 312-321.

Knight, J. D., J. A. Williamson and A. D. Miranker (2008). "Interaction of membrane-bound islet amyloid polypeptide with soluble and crystalline insulin." Protein Science **17**(10): 1850-1856.

Knowles, T. P., M. Vendruscolo and C. M. Dobson (2014). "The amyloid state and its association with protein misfolding diseases." Nature reviews Molecular cell biology **15**(6): 384-396.

Konarkowska, B., J. F. Aitken, J. Kistler, S. Zhang and G. J. Cooper (2005). "Thiol reducing compounds prevent human amylin-evoked cytotoxicity." The FEBS journal **272**(19): 4949-4959.

Korshavn, K. J., M. Jang, Y. J. Kwak, A. Kochi, S. Vertuani, A. Bhunia, S. Manfredini, A. Ramamoorthy and M. H. Lim (2015). "Reactivity of metal-free and metal-associated amyloid- β with glycosylated polyphenols and their esterified derivatives." Scientific reports **5**(1): 17842.

Kumar, S., M. A. Brown, A. Nath and A. D. Miranker (2014). "Folded small molecule manipulation of islet amyloid polypeptide." Chemistry & Biology **21**(6): 775-781.

Lakey-Beitia, J., R. Berrocal, K. Rao and A. A. Durant (2015). "Polyphenols as therapeutic molecules in Alzheimer's disease through modulating amyloid pathways." Molecular neurobiology **51**: 466-479.

Law, E., S. Lu, T. Kieffer, G. Warnock, Z. Ao, M. Woo and L. Marzban (2010). "Differences between amyloid toxicity in alpha and beta cells in human and mouse islets and the role of caspase-3." Diabetologia **53**: 1415-1427.

Lee, C.-C., Y. Sun and H. W. Huang (2012). "How type II diabetes-related islet amyloid polypeptide damages lipid bilayers." Biophysical journal **102**(5): 1059-1068.

Lee, S.-H., M. Jun, J.-Y. Choi, E.-J. Yang, J.-M. Hur, K. Bae, Y.-H. Seong, T.-L. Huh and K.-S. Song (2007). "Plant phenolics as prolyl endopeptidase inhibitors." Archives of pharmacal research **30**: 827-833.

Li, L. and C. Hölscher (2007). "Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review." Brain research reviews **56**(2): 384-402.

Li, Y., S. Zhou, J. Li, Y. Sun, H. Hasimu, R. Liu and T. Zhang (2015). "Quercetin protects human brain microvascular endothelial cells from fibrillar β -amyloid₁₋₄₀-induced toxicity." Acta Pharmaceutica Sinica B **5**(1): 47-54.

Liu, X. and L. Jia (2007). "The conduct of drug metabolism studies considered good practice (I): analytical systems and in vivo studies." Current drug metabolism **8**(8): 815-821.

Logovinsky, V., A. Satlin, R. Lai, C. Swanson, J. Kaplow, G. Osswald, H. Basun and L. Lannfelt (2016). "Safety and tolerability of BAN2401-a clinical study in Alzheimer's disease with a protofibril selective A β antibody." Alzheimer's research & therapy **8**: 1-10.

Lopes, D., A. Meister, A. Gohlke, A. Hauser, A. Blume and R. Winter (2007). "Mechanism of islet amyloid polypeptide fibrillation at lipid interfaces studied by infrared reflection absorption spectroscopy." Biophysical journal **93**(9): 3132-3141.

Lorenzo, A., B. Razzaboni, G. C. Weir and B. A. Yankner (1994). "Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus." Nature **368**(6473): 756-760.

Lutz, T. A. (2022). "Creating the amylin story." Appetite **172**: 105965.

Ma, L., C. Yang, J. Zheng, Y. Chen, Y. Xiao and K. Huang (2020). "Non-polyphenolic natural inhibitors of amyloid aggregation." European journal of medicinal chemistry **192**: 112197.

Macfarlane, W. M., S. C. Campbell, L. J. Elrick, V. Oates, G. Bermano, K. J. Lindley, A. Aynsley-Green, M. J. Dunne, R. F. James and K. Docherty (2000). "Glucose regulates islet amyloid polypeptide

gene transcription in a PDX1-and calcium-dependent manner." Journal of Biological Chemistry **275**(20): 15330-15335.

Masters, S. L., A. Dunne, S. L. Subramanian, R. L. Hull, G. M. Tannahill, F. A. Sharp, C. Becker, L. Franchi, E. Yoshihara and Z. Chen (2010). "Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes." Nature immunology **11**(10): 897-904.

Matveyenko, A. V. and P. C. Butler (2006). "Islet amyloid polypeptide (IAPP) transgenic rodents as models for type 2 diabetes." ILAR journal **47**(3): 225-233.

Maurer, M. S., J. H. Schwartz, B. Gundapaneni, P. M. Elliott, G. Merlini, M. Waddington-Cruz, A. V. Kristen, M. Grogan, R. Witteles and T. Damy (2018). "Tafamidis treatment for patients with transthyretin amyloid cardiomyopathy." New England Journal of Medicine **379**(11): 1007-1016.

Meersman, F. and C. M. Dobson (2006). "Probing the pressure–temperature stability of amyloid fibrils provides new insights into their molecular properties." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics **1764**(3): 452-460.

Meisl, G., J. B. Kirkegaard, P. Arosio, T. C. Michaels, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, S. Linse and T. P. Knowles (2016). "Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models." Nature protocols **11**(2): 252-272.

Meng, F., A. Abedini, A. Plesner, C. B. Verchere and D. P. Raleigh (2010). "The flavanol (–)-epigallocatechin 3-gallate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide, disaggregates amyloid fibrils, and protects cultured cells against IAPP-induced toxicity." Biochemistry **49**(37): 8127-8133.

Meng, F., P. Marek, K. J. Potter, C. B. Verchere and D. P. Raleigh (2008). "Rifampicin does not prevent amyloid fibril formation by human islet amyloid polypeptide but does inhibit fibril thioflavin-T interactions: implications for mechanistic studies of β -cell death." Biochemistry **47**(22): 6016-6024.

Mileo, A. M. and S. Miccadei (2016). "Polyphenols as modulator of oxidative stress in cancer disease: new therapeutic strategies." Oxidative medicine and cellular longevity **2016**(1): 6475624.

Mishra, R., B. Bulic, D. Sellin, S. Jha, H. Waldmann and R. Winter (2008). "Small-molecule inhibitors of islet amyloid polypeptide fibril formation." Angewandte Chemie **120**(25): 4757-4760.

Mizuno, M., K. Mori, T. Misawa, T. Takaki, Y. Demizu, M. Shibamura and K. Fukuhara (2019). "Inhibition of β -amyloid–induced neurotoxicity by planar analogues of procyanidin B3." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **29**(18): 2659-2663.

Mohankumar, K., S. Sridharan, S. Pajaniradje, V. K. Singh, L. Ronsard, A. C. Banerjee, D. B. Somasundaram, M. S. Coumar, L. Periyasamy and R. Rajagopalan (2015). "BDMC-A, an analog of curcumin, inhibits markers of invasion, angiogenesis, and metastasis in breast cancer cells via NF- κ B pathway—a comparative study with curcumin." Biomedicine & pharmacotherapy **74**: 178-186.

Montane, J., A. Klimek-Abercrombie, K. Potter, C. Westwell-Roper and C. Bruce Verchere (2012). "Metabolic stress, IAPP and islet amyloid." Diabetes, Obesity and Metabolism **14**: 68-77.

Mori, T., K. Rezai-Zadeh, N. Koyama, G. W. Arendash, H. Yamaguchi, N. Kakuda, Y. Horikoshi-Sakuraba, J. Tan and T. Town (2012). "Tannic acid is a natural β -secretase inhibitor that prevents cognitive impairment and mitigates Alzheimer-like pathology in transgenic mice." Journal of Biological chemistry **287**(9): 6912-6927.

N. Fawver, J., Y. Ghiwot, C. Koola, W. Carrera, J. Rodriguez-Rivera, C. Hernandez, K. T. Dineley, Y. Kong, J. Li and J. Jhamandas (2014). "Islet amyloid polypeptide (IAPP): a second amyloid in Alzheimer's disease." Current Alzheimer Research **11**(10): 928-940.

Nanga, R. P. R., J. R. Brender, S. Vivekanandan and A. Ramamoorthy (2011). "Structure and membrane orientation of IAPP in its natively amidated form at physiological pH in a membrane environment." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1808**(10): 2337-2342.

Nanga, R. P. R., J. R. Brender, J. Xu, K. Hartman, V. Subramanian and A. Ramamoorthy (2009). "Three-dimensional structure and orientation of rat islet amyloid polypeptide protein in a membrane environment by solution NMR spectroscopy." Journal of the American Chemical Society **131**(23): 8252-8261.

Nedumpully-Govindan, P. and F. Ding (2015). "Inhibition of IAPP aggregation by insulin depends on the insulin oligomeric state regulated by zinc ion concentration." Scientific reports **5**(1): 8240.

Nedumpully-Govindan, P., A. Kaminen, E. H. Pilkington, T. P. Davis, P. Chun Ke and F. Ding (2016). "Stabilizing Off-pathway Oligomers by Polyphenol Nanoassemblies for IAPP Aggregation Inhibition." Scientific Reports **6**(1): 19463.

Nedumpully-Govindan, P., Y. Yang, R. Andorfer, W. Cao and F. Ding (2015). "Promotion or inhibition of islet amyloid polypeptide aggregation by zinc coordination depends on its relative concentration." Biochemistry **54**(50): 7335-7344.

Newman, D. J. and G. M. Cragg (2020). "Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019." Journal of natural products **83**(3): 770-803.

Ngoungoure, V. L. N., J. Schluesener, P. F. Moundipa and H. Schluesener (2015). "Natural polyphenols binding to amyloid: A broad class of compounds to treat different human amyloid diseases." Molecular nutrition & food research **59**(1): 8-20.

Nguyen, P. T., X. Zottig, M. Sebastiao, A. A. Arnold, I. Marcotte and S. Bourgault (2021). "Identification of transmissible proteotoxic oligomer-like fibrils that expand conformational diversity of amyloid assemblies." Communications Biology **4**(1): 939.

Nishi, M., S. J. Chan, S. Nagamatsu, G. I. Bell and D. F. Steiner (1989). "Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone." Proceedings of the National Academy of Sciences **86**(15): 5738-5742.

Obici, L., V. Perfetti, G. Palladini, R. Moratti and G. Merlini (2005). "Clinical aspects of systemic amyloid diseases." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics **1753**(1): 11-22.

Ono, K., K. Hasegawa, H. Naiki and M. Yamada (2004). "Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-molecular basis of disease **1690**(3): 193-202.

Padrick, S. B. and A. D. Miranker (2002). "Islet amyloid: phase partitioning and secondary nucleation are central to the mechanism of fibrillogenesis." Biochemistry **41**(14): 4694-4703.

Palhano, F. L., J. Lee, N. P. Grimster and J. W. Kelly (2013). "Toward the molecular mechanism (s) by which EGCG treatment remodels mature amyloid fibrils." Journal of the American Chemical Society **135**(20): 7503-7510.

Pandey, K. B. and S. I. Rizvi (2009). "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease." Oxidative medicine and cellular longevity **2**(5): 270-278.

Pannuzzo, M., A. Raudino, D. Milardi, C. La Rosa and M. Karttunen (2013). " α -helical structures drive early stages of self-assembly of amyloidogenic amyloid polypeptide aggregate formation in membranes." Scientific reports **3**(1): 2781.

Park, Y. J., G. L. Warnock, Z. Ao, N. Safikhan, M. Meloche, A. Asadi, T. J. Kieffer and L. Marzban (2017). "Dual role of interleukin-1 β in islet amyloid formation and its β -cell toxicity: Implications for type 2 diabetes and islet transplantation." Diabetes, Obesity and Metabolism **19**(5): 682-694.

Park, Y. J., M. Woo, T. J. Kieffer, R. Hakem, N. Safikhan, F. Yang, Z. Ao, G. L. Warnock and L. Marzban (2014). "The role of caspase-8 in amyloid-induced beta cell death in human and mouse islets." Diabetologia **57**: 765-775.

Patil, S. M. and A. T. Alexandrescu (2015). "Charge-Based Inhibitors of Amylin Fibrillization and Toxicity." Journal of Diabetes Research **2015**(1): 946037.

Pauvert, Y., R. Gaudreault and A. B. Charette (2023). "Improved Total Synthesis of 1, 3, 6-Trigalloyl- β -d-glucose from Glucose." Synthesis **55**(15): 2325-2332.

Pepys, M. B., J. Herbert, W. L. Hutchinson, G. A. Tennent, H. Lachmann, J. R. Gallimore, L. Lovat, T. Bartfai, A. Alanine and C. Hertel (2002). "Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis." Nature **417**(6886): 254-259.

Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng and T. E. Ferrin (2004). "UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis." Journal of computational chemistry **25**(13): 1605-1612.

Phan, H. T., K. Samarat, Y. Takamura, A. F. Azo-Oussou, Y. Nakazono and M. d. C. Vestergaard (2019). "Polyphenols modulate alzheimer's amyloid beta aggregation in a structure-dependent manner." Nutrients **11**(4): 756.

Phelps, J., E. Blase and J. Koda (1996). "Development and characterization of monoclonal antibodies specific for amylin." Hybridoma **15**(5): 379-386.

Pithadia, A., J. R. Brender, C. A. Fierke and A. Ramamoorthy (2016). "Inhibition of IAPP aggregation and toxicity by natural products and derivatives." Journal of diabetes research **2016**(1): 2046327.

Raimundo, A. F., S. Ferreira, M. I. Farrim, C. N. Santos and R. Menezes (2020). "Heterologous expression of immature forms of human islet amyloid polypeptide in yeast triggers intracellular aggregation and cytotoxicity." Frontiers in Microbiology **11**: 2035.

Raleigh, D., X. Zhang, B. Hastoy and A. Clark (2017). "The β -cell assassin: IAPP cytotoxicity." Journal of molecular endocrinology **59**(3): R121-R140.

Rambaran, R. N. and L. C. Serpell (2008). "Amyloid fibrils: abnormal protein assembly." Prion **2**(3): 112-117.

Rasouli, H., M. H. Farzaei and R. Khodarahmi (2017). "Polyphenols and their benefits: A review." International Journal of Food Properties **20**(sup2): 1700-1741.

Reyes-Farias, M. and C. Carrasco-Pozo (2019). "The anti-cancer effect of quercetin: molecular implications in cancer metabolism." International journal of molecular sciences **20**(13): 3177.

Richards, D. B., L. M. Cookson, A. C. Berges, S. V. Barton, T. Lane, J. M. Ritter, M. Fontana, J. C. Moon, M. Pinzani and J. D. Gillmore (2015). "Therapeutic clearance of amyloid by antibodies to serum amyloid P component." New England Journal of Medicine **373**(12): 1106-1114.

Rivera, J., T. Gurlo, M. Daval, C. Huang, A. Matveyenko, P. Butler and S. Costes (2011). "Human-IAPP disrupts the autophagy/lysosomal pathway in pancreatic β -cells: protective role of p62-positive cytoplasmic inclusions." Cell Death & Differentiation **18**(3): 415-426.

Robertson, R. P. and J. S. Harmon (2006). "Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: a case of double jeopardy for the pancreatic islet β cell." Free Radical Biology and Medicine **41**(2): 177-184.

Roden, M. and G. I. Shulman (2019). "The integrative biology of type 2 diabetes." Nature **576**(7785): 51-60.

Rodriguez Camargo, D. C., S. Chia, J. Menzies, B. Mannini, G. Meisl, M. Lundqvist, C. Pohl, K. Bernfur, V. Lattanzi and J. Habchi (2021). "Surface-catalyzed secondary nucleation dominates the generation of toxic IAPP aggregates." Frontiers in Molecular Biosciences **8**: 757425.

Rudrapal, M., S. J. Khairnar, J. Khan, A. B. Dukhyil, M. A. Ansari, M. N. Alomary, F. M. Alshabrmi, S. Palai, P. K. Deb and R. Devi (2022). "Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: Insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism (s) of action." Frontiers in pharmacology **13**: 806470.

Sabaté, R., M. Gallardo and J. Estelrich (2005). "Temperature dependence of the nucleation constant rate in β amyloid fibrillogenesis." International journal of biological macromolecules **35**(1-2): 9-13.

Sakuraba, H., H. Mizukami, N. Yagihashi, R. Wada, C. Hanyu and S. Yagihashi (2002). "Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients." Diabetologia **45**: 85-96.

Scalbert, A., C. Morand, C. Manach and C. Rémésy (2002). "Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health." Biomedicine & Pharmacotherapy **56**(6): 276-282.

Sciacca, M. F., C. La Rosa and D. Milardi (2021). "Amyloid-mediated mechanisms of membrane disruption." Biophysica **1**(2): 137-156.

Shi, M., F. Chu, F. Zhu and J. Zhu (2022). "Impact of anti-amyloid- β monoclonal antibodies on the pathology and clinical profile of Alzheimer's disease: a focus on aducanumab and lecanemab." Frontiers in aging neuroscience **14**: 870517.

Söderberg, L., M. Johannesson, P. Nygren, H. Laudon, F. Eriksson, G. Osswald, C. Möller and L. Lannfelt (2023). "Lecanemab, aducanumab, and gantenerumab—binding profiles to different forms of amyloid-beta might explain efficacy and side effects in clinical trials for Alzheimer's disease." Neurotherapeutics **20**(1): 195-206.

Soto, C., M. S. Kindy, M. Baumann and B. Frangione (1996). "Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent β -sheet conformation." Biochemical and biophysical research communications **226**(3): 672-680.

Sparks, S., G. Liu, K. J. Robbins and N. D. Lazo (2012). "Curcumin modulates the self-assembly of the islet amyloid polypeptide by disassembling α -helix." Biochemical and biophysical research communications **422**(4): 551-555.

Stangl, M. and D. Schneider (2015). "Functional competition within a membrane: Lipid recognition vs. transmembrane helix oligomerization." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes **1848**(9): 1886-1896.

Stefani, M. and S. Rigacci (2013). "Protein folding and aggregation into amyloid: the interference by natural phenolic compounds." International journal of molecular sciences **14**(6): 12411-12457.

Subramanian, S., R. Hull, S. Zraika, K. Aston-Mourney, J. Udayasankar and S. Kahn (2012). "cJUN N-terminal kinase (JNK) activation mediates islet amyloid-induced beta cell apoptosis in cultured human islet amyloid polypeptide transgenic mouse islets." Diabetologia **55**: 166-174.

Tabrez, S., N. R. Jabir, V. M. Adhami, M. I. Khan, M. Moulay, M. A. Kamal and H. Mukhtar (2020). "Nanoencapsulated dietary polyphenols for cancer prevention and treatment: successes and challenges." Nanomedicine **15**(11): 1147-1162.

Tain, Y.-L. and C.-N. Hsu (2022). "Novel insights on dietary polyphenols for prevention in early-life origins of hypertension: a review focusing on preclinical animal models." International Journal of Molecular Sciences **23**(12): 6620.

Tena, N., J. Martín and A. G. Asuero (2020). "State of the art of anthocyanins: Antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health." Antioxidants **9**(5): 451.

Törnquist, M., T. C. Michaels, K. Sanagavarapu, X. Yang, G. Meisl, S. I. Cohen, T. P. Knowles and S. Linse (2018). "Secondary nucleation in amyloid formation." Chemical communications **54**(63): 8667-8684.

Torres-León, C., J. Ventura-Sobrevilla, L. Serna-Cock, J. A. Ascacio-Valdés, J. Contreras-Esquivel and C. N. Aguilar (2017). "Pentagalloylglucose (PGG): A valuable phenolic compound with functional properties." Journal of Functional Foods **37**: 176-189.

Velander, P., L. Wu, F. Henderson, S. Zhang, D. R. Bevan and B. Xu (2017). "Natural product-based amyloid inhibitors." Biochemical pharmacology **139**: 40-55.

Verma, M., A. Vats and V. Taneja (2015). "Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils." Annals of Indian Academy of Neurology **18**(2): 138-145.

Vogt, A.-C. S., E. S. Roesti, M. O. Mohsen, A. Leonchiks, M. Vogel and M. F. Bachmann (2021). "Anti-IAPP monoclonal antibody improves clinical symptoms in a mouse model of type 2 diabetes." Vaccines **9**(11): 1316.

Wang, H., Z. Ridgway, P. Cao, B. Ruzsicska and D. P. Raleigh (2015). "Analysis of the ability of pramlintide to inhibit amyloid formation by human islet amyloid polypeptide reveals a balance between optimal recognition and reduced amyloidogenicity." Biochemistry **54**(44): 6704-6711.

Wen, C., N. Dechsupa, Z. Yu, X. Zhang, S. Liang, X. Lei, T. Xu, X. Gao, Q. Hu and P. Innuan (2023). "Pentagalloyl glucose: a review of anticancer properties, molecular targets, mechanisms of action, pharmacokinetics, and safety profile." Molecules **28**(12): 4856.

Westermarck, P. (1994). "Amyloid and polypeptide hormones: what is their interrelationship?" Amyloid **1**(1): 47-60.

Westermarck, P., U. Engström, G. T. Westermarck, K. H. Johnson, J. Permerth and C. Betsholtz (1989). "Islet amyloid polypeptide (IAPP) and pro-IAPP immunoreactivity in human islets of Langerhans." Diabetes research and clinical practice **7**(3): 219-226.

Westermarck, P., Z.-C. Li, G. T. Westermarck, A. Leckström and D. F. Steiner (1996). "Effects of beta cell granule components on human islet amyloid polypeptide fibril formation." FEBS letters **379**(3): 203-206.

Westwell-Roper, C., D. L. Dai, G. Soukhatcheva, K. J. Potter, N. van Rooijen, J. A. Ehses and C. B. Verchere (2011). "IL-1 blockade attenuates islet amyloid polypeptide-induced proinflammatory cytokine release and pancreatic islet graft dysfunction." The journal of immunology **187**(5): 2755-2765.

Withington, C. G. and R. S. Turner (2022). "Amyloid-related imaging abnormalities with anti-amyloid antibodies for the treatment of dementia due to Alzheimer's disease." Frontiers in neurology **13**: 862369.

Wojtunik-Kulesza, K., A. Oniszczuk, T. Oniszczuk, M. Combrzyński, D. Nowakowska and A. Matwijczuk (2020). "Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—A non-systematic review." Nutrients **12**(5): 1401.

Wu, W., Y. Ji, Z. Wang, X. Wu, J. Li, F. Gu, Z. Chen and Z. Wang (2023). "The FDA-approved anti-amyloid- β monoclonal antibodies for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials." European journal of medical research **28**(1): 544.

Xu, W., P. Jiang and Y. Mu (2009). "Conformation preorganization: effects of S20G mutation on the structure of human islet amyloid polypeptide segment." The Journal of Physical Chemistry B **113**(20): 7308-7314.

Yao, J., X. Gao, W. Sun, T. Yao, S. Shi and L. Ji (2013). "Molecular hairpin: a possible model for inhibition of tau aggregation by tannic acid." Biochemistry **52**(11): 1893-1902.

Youn, K. and M. Jun (2013). "In vitro BACE1 inhibitory activity of geraniin and corilagin from *Geranium thunbergii*." Planta medica **79**(12): 1038-1042.

Zaidi, F. K. and R. Bhat (2022). "Two polyphenols with diverse mechanisms towards amyloidosis: differential modulation of the fibrillation pathway of human lysozyme by curcumin and EGCG." Journal of Biomolecular Structure and Dynamics **40**(10): 4593-4611.

Zhang, H.-x., F.-w. Liu, F. Ren, Y.-l. Zhang and Z. Nie (2017). "Neuroprotective effect corilagin in spinal cord injury rat model by inhibiting nuclear factor-kb, inflammation and apoptosis." African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines **14**(5): 41-48.

Zhang, H. and R. Tsao (2016). "Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects." Current Opinion in Food Science **8**: 33-42.

Zhang, S., H. Liu, C. L. Chuang, X. Li, M. Au, L. Zhang, A. R. Phillips, D. W. Scott and G. J. Cooper (2014). "The pathogenic mechanism of diabetes varies with the degree of overexpression and oligomerization of human amylin in the pancreatic islet β cells." The FASEB Journal **28**(12): 5083-5096.

Zhang, S., J. Liu, M. Dragunow and G. J. Cooper (2003). "Fibrillogenic amylin evokes islet β -cell apoptosis through linked activation of a caspase cascade and JNK1." Journal of Biological Chemistry **278**(52): 52810-52819.

Zhang, X., J. R. St. Clair, E. London and D. P. Raleigh (2017). "Islet amyloid polypeptide membrane interactions: effects of membrane composition." Biochemistry **56**(2): 376-390.

Zhang, Y. and W. Song (2017). "Islet amyloid polypeptide: another key molecule in Alzheimer's pathogenesis?" Progress in neurobiology **153**: 100-120.

Zheng, Y., S. H. Ley and F. B. Hu (2018). "Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications." Nature reviews endocrinology **14**(2): 88-98.

Ziaunys, M., A. Sakalauskas, K. Mikalauskaite and V. Smirnovas (2021). "Polymorphism of alpha-synuclein amyloid fibrils depends on ionic strength and protein concentration." International journal of molecular sciences **22**(22): 12382.

Zraika, S., R. Hull, J. Udayasankar, K. Aston-Mourney, S. Subramanian, R. Kisilevsky, W. Szarek and S. Kahn (2009). "Oxidative stress is induced by islet amyloid formation and time-dependently mediates amyloid-induced beta cell apoptosis." Diabetologia **52**: 626-635.