

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

L'EFFET DE L'HYDROPHOBICITÉ DES SURFACES SUR L'AGRÉGATION
AMYLOÏDE DES POLYPEPTIDES : *ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE* ET SON
INHIBITION PAR LE POLYPHÉNOL CORILAGINE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
À LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR SHABEENA JEGAMOHAN

AVRIL 2026

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Ces années ont été l'occasion d'un approfondissement académique mais aussi d'un véritable cheminement personnel, ponctué de défis, de découvertes et d'expériences qui ont contribué à ma maturité.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma gratitude à mon directeur de recherche Pr. Roger Gaudreault et mon co-directeur Pr. Steve Bourgault pour votre encadrement attentif, vos disponibilités et vos conseils précieux tout au long de mon projet de recherche. Je souhaite également remercier mes collaborateurs ainsi que mes camarades du laboratoire pour leur aide et les échanges constructifs tout au long de ce travail.

Un immense merci à mes amis Jihane, Vy, Laetitia, Arunima, Océane et Rana dont la présence et les souvenirs partagés ont rendu ces années agréables. Vos encouragements dans les moments de doute, vos conseils et les rires partagés ont été une source de motivation et de réconfort. Un merci tout particulier à mes amis Marylin, Noémie et Alexis qui ont été un soutien mental inestimable dans mes moments difficiles.

Merci à ma famille pour votre amour et vos encouragements. Votre confiance en moi m'a permis de surmonter les difficultés et de rester motivée jusqu'au bout. Je souhaite remercier mon Abi, même si tu n'es plus en vie à mes côtés, merci pour ton amour inconditionnel et pour avoir été ma raison de sourire et de continuer lorsque je n'en avais plus la force. Ton absence laisse une cicatrice profonde et indélébile dans mon cœur.

Finalement, je remercie mon seigneur Jésus-Christ de m'avoir mené jusqu'à ici et de m'avoir guidée.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	ix
RÉSUMÉ.....	xi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1.....	2
REVUE DE LA LITTÉRATURE	2
1.1 L'implication de l'agrégation des polypeptides dans le domaine médical et biopharmaceutique.	2
1.1.1 Maladies associées à l'agrégation des peptides.....	2
1.1.2 Limitation en formulation biopharmaceutique liée à l'agrégation.....	4
1.1.3 Les étapes d'agrégation de fibres amyloïdes.....	5
1.1.4 Paramètres influençant l'agrégation des peptides	7
1.2 Effets des propriétés physico-chimiques des surfaces sur l'agrégation.....	13
1.2.1 Les différents types de surfaces	13
1.2.2 L'effet des propriétés de la surface induisant l'agrégation	17
1.3 Islet amyloid polypeptide.....	19
1.3.1 Structure primaire et secondaire.....	19
1.3.2 Les fonctions physiologiques de l'IAPP	22
1.3.3 Le mécanisme d'agrégation de l'IAPP.....	24
1.4. Les polyphénols.....	25
1.4.1 Les propriétés	25
1.4.2 Le rôle inhibiteur des polyphénols dans l'agrégation des peptides amyloïdes.	26
1.5 Problématiques et objectifs.....	28
1.5.1 Problématique	28
1.5.2 Hypothèses	28
1.5.3 Objectifs	29
CHAPITRE 2.....	30
IAPP Surface-Induced Aggregation and Corilagin's Inhibitory Effect	30
2.1 Résumé	31

2.2 Abstract	32
Introduction.....	33
2.3 Materials and Methods.....	35
2.3.1 Synthesis and Monomerization of IAPP.....	35
2.3.2 Preparation of Polymer-Coated Surface	36
2.3.3 Surface Induced Aggregation	36
2.3.4 Bulk Aggregation	36
2.3.5 Atomic Force Microscopy	37
2.3.6 Photo-induced Force Microscopy	37
2.3.7 Circular Dichroism Spectroscopy.....	38
2.3.8 Thioflavin T (ThT) Fluorescence	38
2.3.9 Transmission Electron Microscopy	38
2.3.10 Goniometer	38
2.3.11 Statistical Tests	39
2.4 Results and Discussion.....	39
2.4.1 Selection and Preparation of Surfaces	39
2.4.2 Surface-induced aggregation of IAPP.....	41
2.4.3 Surface Effects on Fibril Morphology	44
2.4.4 Effect of Corilagin on Surface-induced IAPP Fibrillogenesis	46
2.4.5 Surface-Adsorption and Inhibition Mode of Action of Corilagin	48
2.4.6 Correlating Surface Coverage and Fibril Inhibition.....	51
2.5 Conclusion.....	52
2.6 Supporting information.....	53
CHAPITRE 3 : DISCUSSION	58
3.1 Sélection et la préparation de surface	58
3.2 L'agrégation de l'IAPP induite par la surface	60
3.3 L'effet de surface sur la morphologie des fibrilles.....	61
3.4 L'effet de corilagine sur la fibrillogénèse de l'IAPP induite par la surface	63
3.5 Le mode d'action de la corilagine : adsorption de surface et inhibition	65
3.6 Corrélation entre la couverture de surface et l'inhibition des fibrilles	67
3.7 Perspectives et limitations de l'étude	68
CONCLUSION	70
RÉFÉRENCES.....	72

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Surface de contenant induisant l'agrégation de peptide.....	5
Figure 1.2 Les étapes de l'agrégation du polypeptide.....	6
Figure 1.3 Facteurs externes influençant l'agrégation des polypeptides	12
Figure 1.4 Les modèles de surfaces biologiques.....	14
Figure 1.5 Les modèles de surfaces non-biologiques.....	17
Figure 1.6 Schéma illustrant l'agrégation A β sur une surface	18
Figure 1.7 Structure primaire de l'IAPP	20
Figure 1.8 Fonctions physiologiques régulées par IAPP.....	23
Figure 1.9 La structure générale d'un polyphénol.....	26
Figure 2.1 Topography and PiFM mapping of surfaces	41
Figure 2.2 Bulk in-solution fibril assembly CD and ThT assays at 0 h and at 72 h	43
Figure 2.3 PiFM chemical mapping images at the amide II band of surface-induced fibril formations from 1 μ M and 10 μ M.....	45
Figure 2.4 The inhibition effect of the polyphenol corilagin on IAPP surface-induced fibril assembly investigated by PiFM.	47
Figure 2.5 Surfaces were examined by PiFM mid-infrared spectroscopy after having added 40 μ M and 400 μ M of corilagin, in the absence of IAPP monomers.....	50
Figure 2.6 Individual surface-induced self-assembled 1 μ M IAPP fibrils on surface.....	53
Figure 2.7 Chemical Segregation of IAPP, pHEMA and mica by PiFM from a single topography scan.....	54

Figure 2.8 AFM tip-scratch measurements of multilayered IAPP fibrils on mica with and without corilagin.55

Figure 2.9 AFM based quantification of corilagin surface coverage on surfaces.....56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Maladies liées à l'agrégation des polypeptides	2
Tableau 2.1 Comparison of surface content by theoretical and calculated quantification of corilagin.....	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AFM	Microscopie à force atomique
APR	Aggregation-prone regions
Aβ	Amyloïdes bêta
CAC	Critical aggregation concentration
CD	Dichroïsme circulaire
CPE	Carboxypeptidase E
CTR	Famille calcitonine récepteur
DMSO	Dimethyl sulfoxide (DMSO)
DT2	Diabète type 2
EGCG	Épigallocatechine gallate
ESI-TOF	Electrospray ionization time-of-flight
GLP-1	Glucagon-like peptide
HCTU	2-(6-chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3 tétraméthylamminium hexafluorophosphate
HOPG	Graphite pyrolytique hautement orienté
HPLC	Chromatographie liquid à haute performance
HSD	Honest significant difference
IAPP	Islet amyloid polypeptide
IR	Infrarouge
MA	Maladie d'Alzheimer
NPs	Nanoparticules
PAM	Peptidylglycine α -amidating monooxygenase
PD	Maladie de Parkinson
PEG	Polyéthylène glycol
PEO	Poly (éthylène oxide)
pHEMA	Polyhydroxyéthylméthacrylate
pl	Point isoélectrique
PiFM	Microscopie à force photo-induite
PS	Polystyrène
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
QCL	Quantum cascade laser
RAMP	Receptor activity modifying protein

SAM	Les monocouches autoassemblées
TEM	Microscopie électronique à transmission
TFA	Acide trifluoroacétique
ThT	Thioflavin T
WCA	Angle de contact de l'eau

RÉSUMÉ

Plusieurs protéines et peptides peuvent s'autoassembler spontanément en diverses entités supramoléculaires structurées, assurant des fonctions physiologiques essentielles et variées. Sous certaines conditions pathologiques et lors de la biofabrication de médicaments biologiques et biopharmaceutiques, ce processus d'agrégation non-désiré peut conduire à la formation d'oligomères ou protofibrilles cytotoxiques. La majorité des études ciblant ce phénomène se concentrent sur les processus d'agrégation et d'inhibition en solution. Cependant, les interactions locales avec les surfaces sont largement responsables des changements structuraux des protéines conduisant à leur agrégation. À ce jour, la recherche sur l'agrégation protéique induite par les surfaces demeure insuffisante pour bien comprendre les mécanismes sous-jacents. Ce mémoire de maîtrise présente une méthodologie systématique permettant de produire exclusivement des fibrilles d'amyloïde du polypeptide de l'amyline (IAPP) induite par des surfaces de mica recouvertes de polymères comme le polyéthylène glycol (PEG), polyhydroxyéthylméthacrylate (pHEMA) et polystyrène (PS). L'IAPP s'adsorbe et forme des protofibrilles, fibrilles ou particules sphériques à l'échelle nanométrique en fonction du type de surface polymérique. D'autre part, les polyphénols sont connus pour modifier les structures et inhiber l'agrégation protéique, prévenant ainsi la cytotoxicité oligomérique. Cette étude vise aussi à caractériser l'effet inhibiteur du polyphénol corilagine sur l'agrégation induite par les surfaces. Dans l'ensemble, la corilagine a montré des effets inhibiteurs variables sur les structures d'IAPP induites par les surfaces et ce, en fonction des propriétés physico-chimiques des surfaces.

Mots clés : Agrégation protéique, Fibrilles amyloïdes, surface, polymères, polyphénol, corilagine

INTRODUCTION

L'agrégation des peptides est un mécanisme complexe impliqué dans certaines pathologies humaines. Elle correspond à l'autoassemblage progressif des monomères de peptides conduisant à la formation de structures fibrillaires riches en feuillets β -croisés. L'étude du mécanisme de l'agrégation ainsi que des facteurs qui la modulent constitue un enjeu scientifique majeur, tant pour la compréhension des maladies amyloïdes que pour le développement de stratégies thérapeutiques.

Parmi les nombreux facteurs externes influençant l'agrégation des peptides, la surface représente un paramètre relativement peu étudié. L'agrégation peut être induite par des surfaces biologiques, telles que la membrane cellulaire mais également par des surfaces non-biologiques, telles que le verre ou les polymères largement utilisés en milieu industriel. Les propriétés physico-chimiques de surface notamment l'hydrophobicité, la charge ionique et la rugosité modifient l'adsorption des peptides et influencent leur conformation ainsi que la cinétique d'agrégation. Dans ce contexte, l'Islet amyloid polypeptide (IAPP) ou amyline constitue un modèle pertinent pour l'étude de l'effet de l'agrégation du peptide induite par la surface. Ce peptide, impliqué dans le diabète de type 2 (DT2), présente une forte propension à s'agréger, en partie due à la présence d'acides aminés hydrophobes dans sa séquence primaire.

Afin de limiter l'agrégation des peptides amyloïdes, le polyphénol corilagine, une molécule naturelle ayant démontré une activité inhibitrice sur l'agrégation des peptides amyloïdes, est étudié dans ce mémoire. Cette molécule peut interagir avec les peptides amyloïdes et interférer avec les étapes de nucléation et de croissance fibrillaire. Ainsi, étudier l'effet inhibiteur du polyphénol sur l'agrégation induite par les surfaces est essentiel. Ce travail sur l'effet inhibiteur de la corilagine sur l'agrégation du peptide d'IAPP induite par une surface de polymère permettra d'approfondir la compréhension des mécanismes d'agrégation du peptide sous diverses conditions et de contribuer au développement de stratégies thérapeutiques plus efficaces. Il pourra également ouvrir des perspectives en biofabrication pharmaceutique notamment pour améliorer la stabilité et l'efficacité des médicaments peptidiques.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 L'implication de l'agrégation des polypeptides dans le domaine médical et biopharmaceutique.

1.1.1 Maladies associées à l'agrégation des peptides

L'agrégation des polypeptides constitue un phénomène pathologique grave associé à plus d'une cinquantaine de maladies humaines. (Chiti and Dobson et al. 2017). La compréhension de ce processus d'agrégation est essentielle pour un meilleur diagnostic et une approche thérapeutique. En effet, ces maladies reposent sur un processus commun : le mauvais repliement des polypeptides solubles en structures riches en feuillets β , qui s'assemblent en oligomères cytotoxiques (Obici, Perfetti et al. 2005) perturbant la fonction du polypeptide et la fonction cellulaire. Ce processus est le facteur déclencheur de plusieurs maladies comme le diabète de type II (DT2), la maladie d'Alzheimer (MA) et la maladie de Parkinson (PD).

Dans le cas du DT2, le polypeptide islet amyloid polypeptide (IAPP), une hormone co-sécrétée par les cellules β du pancréas avec d'insuline, peut s'agréger et provoquer la mort cellulaire et la réduction de la sécrétion de l'insuline qui est une hormone vitale pour contrôler l'hyperglycémie. Le mauvais repliement des polypeptides touche également des maladies neurodégénératives comme la MA, où les peptides amyloïdes bêta ($A\beta$) extracellulaires s'agrègent conduisant à la perte progressive des neurones et à l'altération des fonctions cognitives. De manière similaire, la maladie de Parkinson (PD) est causée par l'agrégation du polypeptide α -synucléine qui forme des agrégats intracellulaires qui induisent un stress oxydatif neuronal (Lashuel et al. 2013). Le tableau 1.1 présente quelques maladies dues à l'agrégation des polypeptides :

Tableau 1.1 Maladies liées à l'agrégation des polypeptides

Maladie	Polypeptide impliqué	Type d'agrégat
Diabète type 2	IAPP	Fibrilles amyloïdes dans le pancréas
Alzheimer	A β	Plaques extracellulaires dans le cerveau
Parkinson	α -synucléine	Fibrilles amyloïdes dans le cerveau
Huntington	Huntingtine (polyQ)	Fibrilles amyloïdes dans le cerveau
Prion	PrP	Fibrilles amyloïdes dans le système nerveux central
Amyloïdose	Transthyrétine	Fibrilles amyloïdes dans le cœur et les nerfs
Amyloïdose dialyse	β 2-microglobuline	Fibrilles amyloïdes dans les articulations et les tissus conjonctifs
Sclérose latérale amyotrophique	Superoxyde dismutase 1	Fibrilles amyloïdes dans les motoneurones

1.1.2 Limitation en formulation biopharmaceutique liée à l'agrégation

L'agrégation des polypeptides a un impact sur le développement et la fabrication des produits biopharmaceutiques. En effet, les médicaments biologiques principalement à base de polypeptides (de la Torre et al. 2024) tels que les anticorps monoclonaux, les enzymes et les hormones recombinantes ont représenté 32% de nouveaux médicaments approuvés aux États-Unis en 2024 (Martins et al. 2024). Or, lors de la formulation de ces médicaments en industrie, le mécanisme d'agrégation peut dénaturer le polypeptide et compromettre sa stabilité. Ceci représente des limites majeures dans la biopharmaceutique en réduisant l'efficacité, la durée de vie, la conservation et la sécurité des médicaments.

Plusieurs facteurs peuvent induire l'agrégation des polypeptides dans le processus de la formulation biopharmaceutique :

- **La stabilité physique et chimique** : des facteurs externes comme la variation de pH et la température peuvent conduire au mauvais repliement du polypeptide (Pham et al. 2020).
- **Les surfaces des contenants** : les parois de seringues et les flacons sont des facteurs d'induction de l'agrégation du polypeptide (Figure 1.1). Ces surfaces peuvent favoriser le mauvais repliement du polypeptide entraînant la formation d'agrégats insolubles durant la formulation, le stockage et le transport des médicaments (King et al. 2024).
- **Concentration élevée** : les formulations en industrie sont souvent produites à des hautes concentrations, ce qui peut provoquer la formation d'agrégats (Escobar et al. 2024).
- **Stress mécanique** : certains procédés industriels tels que l'agitation, le pompage et la filtration peuvent induire l'agrégation des polypeptides (Torisu et al. 2025).
- **Stockage et transport** : les polypeptides thérapeutiques sont extrêmement sensibles et peuvent changer de conformation même après la formulation. Ainsi le stockage ou transport de longue distance peuvent induire la formation d'agrégats (Rahban et al. 2023).

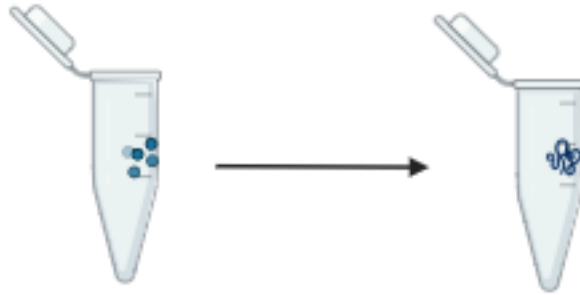


Figure 1.1 Surface de contenant induisant l'agrégation de peptide

1.1.3 Les étapes d'agrégation de fibres amyloïdes

L'agrégation de fibres amyloïdes s'effectue en trois phases :

- **Phase de nucléation** : cette étape est cinétiquement plus lente et elle est thermodynamiquement défavorable. Les monomères s'associent entre eux pour former des noyaux précurseurs. Cette phase correspond à une période de latence (lag phase) durant laquelle aucune fibrille mature n'est encore détectable. Dans cette étape, les oligomères se forment, lesquels sont des entités cytotoxiques perturbant fortement les membranes cellulaires dans le cas de certaines maladies (Bucciantini et al. 2002, Eisenberg et al. 2017, Chiti et al. 2017, Cremades et al. 2012, Arosia et al. 2015). La durée de cette phase dépend de la concentration en monomère ainsi que des conditions physicochimiques du milieu.
- **Phase d'élongation** : cette étape est cinétiquement favorisée. Les monomères s'ajoutent aux extrémités des noyaux formés et deviennent des fibrilles amyloïdes de façon exponentielle, ainsi que des structures secondaires comme le feuillet β , conférant une stabilité mécanique et thermodynamique à l'assemblage fibrillaire. Également, la nucléation secondaire a lieu, conduisant à la formation de nouveaux noyaux à partir des fragments de fibrilles préexistantes. Dans ce cas, la surface des fibrilles préexistantes favorise l'interaction avec les monomères en solution et catalyse leur réorganisation conformationnelle vers une structure riche en

feuilletés β . Ce mécanisme exploite l'ensemble de la surface des fibrilles comme site catalytique, ce qui augmente fortement le nombre de noyaux disponibles pour l'élongation et accélère significativement la cinétique globale d'agrégation.

- **Phase de plateau** : le système atteint l'équilibre dynamique entre les monomères restants et les fibrilles formées. En biopharmaceutique, cette étape est déterminante pour la stabilité du produit et par conséquent pour sa durée de conservation (Mahler et al. 2009).

La compréhension de ces étapes ainsi que l'identification des espèces cytotoxiques impliquées telles que les oligomères constituent des étapes essentielles pour optimiser une meilleure approche thérapeutique et améliorer les stratégies de stabilisation de la formation biopharmaceutique (Figure 1.2).

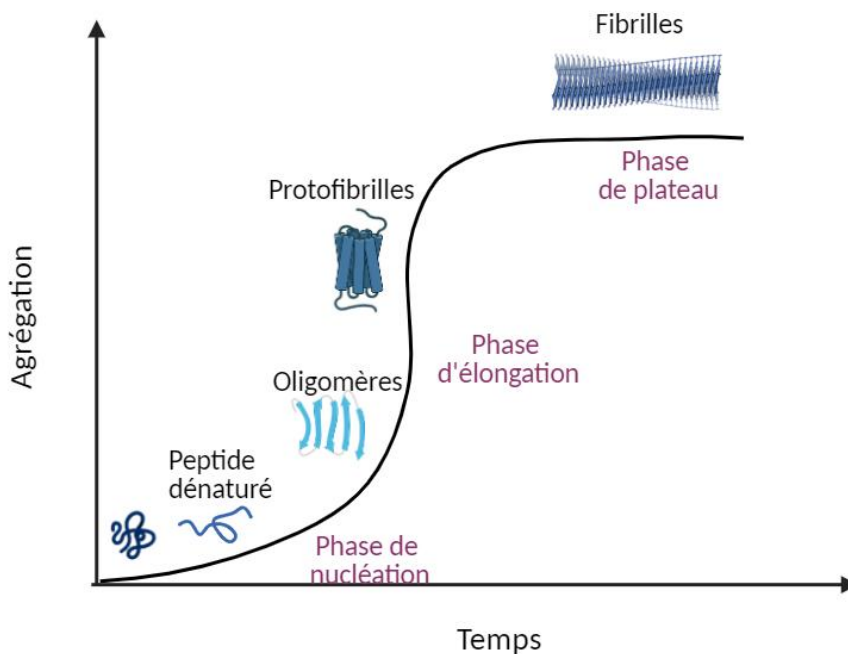


Figure 1.2 Les étapes de l'agrégation du polypeptide

1.1.4 Paramètres influençant l'agrégation des peptides

1.1.4.1 Facteurs internes : séquences d'acides aminés, mutations et structures secondaires

La propension à s'agréger et les mécanismes d'agrégation des peptides peuvent être modulés par des facteurs internes (Breydo et al. 2016) tels que la séquence d'acides aminés, les mutations et les structures secondaires. La compréhension de ces facteurs est importante pour distinguer les polypeptides intrinsèquement susceptibles d'agréger de ceux dont l'assemblage en fibrilles demeure peu favorable (Chiti et al. 2006).

La séquence d'acides aminés est un facteur interne qui détermine le comportement biophysique d'un polypeptide. Certains polypeptides possèdent des portions appelées '*aggregation-prone regions*' (APR) (Beerten et al. 2012, Sarah et al. 2014, Agrawal et al. 2011, Shahin et al. 2007, Pawar et al. 2005, Dubay et al. 2004) qui présentent une tendance intrinsèque à s'assembler en structure en feuillet- β -croisés. Ces régions sont composées d'acides aminés hydrophobes comme alanine, valine et leucine et/ou des résidus aromatiques tels que la phénylalanine, tyrosine et tryptophane. Certaines interactions faibles telles que les interactions hydrophobes et les forces de van der Waals contribuent à la nucléation primaire (Beerten et al. 2012, Trainor et al. 2017, De Baets et al. 2014, Bolognesi et al. 2013, Chiti et al. 2003). En effet, les polypeptides impliqués dans certaines maladies possèdent des acides aminés hydrophobes, tels que l'IAPP impliquée dans le DT2 qui contient plusieurs résidus de phénylalanine, leucine, et isoleucine dans la région 12-17 et 20-29 (Fortier et al. 2022). De manière similaire, A β impliqué dans la MA est hydrophobe dans la région 16-21 (Ono et al. 2021) et au niveau du segment C-terminal 32-42 (Tartaglia et al. 2008) favorisant la nucléation en fibrilles amyloïdes. La présence des régions hydrophobes explique la capacité d'un polypeptide à s'auto assembler et à s'agréger *in vivo* conduisant à la formation des plaques amyloïdes insolubles impliquées dans diverses maladies.

Également, les mutations sont un facteur interne modulant l'agrégation des polypeptides. La modification de la séquence d'acides aminés par une mutation (substitution, addition ou délétion) peut altérer les propriétés physicochimiques (Breydo et al. 2016) du polypeptide telles que l'hydrophobicité, la charge électrostatique et la modification des structures secondaires, ainsi que d'augmenter ou diminuer la probabilité d'induire la formation de fibrilles. Dans le cas de certaines pathologies neurodégénératives, des mutations favorisent la tendance du polypeptide à s'agréger. Par exemple, une mutation dite 'Arctic' (E693G) dans A β favorise la formation des oligomères cytotoxiques (Nilsberth et al. 2001), par le fait même impactant la cinétique d'agrégation d'un polypeptide. De façon inverse, Westermark et al. (1990) ont démontré que certaines mutations peuvent inhiber la capacité à former des fibrilles amyloïdes. Ils ont conclu que la substitution du résidu sérine-28 par une proline dans le polypeptide IAPP inhibe l'agrégation in vitro chez la souris.

La structure secondaire est un autre facteur interne important, elle inclut les feuillets β et les hélices α . Les feuillets β sont stabilisés par des liaisons hydrogènes favorisant ainsi la nucléation et la formation des fibrilles (Chiti et al. 2006). La structure secondaire par la suite peut impacter la structure tertiaire ou quaternaire du polypeptide donc son repliement et sa fonction.

La compréhension fine du mécanisme d'agrégation des polypeptides permettra de proposer des stratégies thérapeutiques pour des maladies ciblées. L'agrégation des polypeptides n'est pas seulement impactée par des facteurs internes, elle est aussi modulée par des facteurs externes.

1.1.4.2 Facteurs externes : pH, forces ioniques, ions spécifiques, température, agitation et concentration

Les facteurs externes ont une influence sur l'agrégation des polypeptides notamment en modifiant la stabilité de la structure native du polypeptide et les interactions intra et intermoléculaires (Figure 1.3). L'étude de ces facteurs externes permettra une meilleure compréhension des mécanismes et également d'optimiser la formulation biopharmaceutique.

Le pH est un des facteurs majeurs impactant l'agrégation du polypeptide car il modifie la charge nette du polypeptide et la distribution des charges électrostatiques à sa surface (Jeong et al. 2015). Lorsque le pH est modifié et atteint la même valeur que le point isoélectrique (pI) du polypeptide, la charge nette globale devient nulle, cela réduit les forces de répulsion électrostatique entre les molécules (Portillo et al. 2012). Ainsi, la force d'attraction devient plus importante en favorisant davantage les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes. Casa et al. ont démontré que la cinétique d'agrégation est dépendante du pH (Santhos et al. 2020), par exemple pour certains peptides comme l'IAPP, à faible pH la formation des fibrilles amyloïdes est moins rapide comparé à un pH élevé (Marek et al. 2012, Lai et al. 1996).

Les forces ioniques sont un autre facteur externe modifiant l'agrégation des polypeptides, elles interviennent en modulant les interactions électrostatiques entre les résidus chargés des chaînes peptidiques et les ions (Na^+ , K^+ , Cl^-) présents dans leur environnement (Sule et al. 2012). En effet, à faible force ionique, les charges électrostatiques du polypeptide peuvent favoriser des interactions répulsives entre les résidus de même charge, ainsi défavorisant les forces d'attraction qui vont stabiliser les monomères du peptide et limiter la formation des fibrilles amyloïdes. Tandis qu'à forte force ionique, l'augmentation de la concentration en sels favorise l'agrégation des polypeptides principalement par un effet de salting-out résultant de la compétition des ions avec les polypeptides pour les molécules d'eau, ce qui réduit leur solubilité et accélère la nucléation (Meisl et al. 2017, Portillo et al. 2012). Également, l'ajout du sel peut modifier la conformation du polypeptide, entraînant une modification du nombre de groupements chargés exposés à la surface externe. Cette variation de la charge de surface influence l'énergie d'interaction entre les polypeptides lorsqu'ils se rapprochent ainsi peut modifier leur propension à s'agréger (Sule et al. 2012). Plusieurs études (Pedersen et al. 2006, Raman et al. 2005, Klement et al. 2007, Abelein et al. 2016) démontrent que l'agrégation des polypeptides est dépendant des forces ioniques (Marek et al. 2012), par exemple une forte concentration de NaCl accélère la cinétique d'agrégation de l'IAPP (Marek et al. 2012). De plus, l'effet des ions spécifiques a un rôle déterminant selon la série de Hofmeister (Kang et al. 2020) qui classe les ions selon leur capacité à stabiliser ou déstabiliser les structures polypeptidiques en fonction de leur effet sur l'organisation de molécules d'eau et les interactions hydrophobes. Cette série est classée en deux catégories, ceux nommés 'kosmotropes' (F^- and SO_4^{2-}) sont des ions qui renforcent les interactions hydrophobes

entre les résidus du peptide et en favorisant la répulsion des molécules d'eau. Ayant pour conséquence de favoriser la nucléation ainsi la stabilisation des fibrilles amyloïdes. À l'inverse, les ions 'chaotropes' (ClO_4^-), SCN^- qui déstabilisent les agrégats ainsi à inhiber la formation des fibrilles amyloïdes (Erichsen et al. 2021).

La température est également un autre facteur externe important influençant la cinétique d'agrégation des peptides amyloïdes. Une augmentation de la température peut modifier le repliement du polypeptide entraînant l'exposition des régions hydrophobes normalement enfouies au centre du polypeptide (Matsuura et al. 2015, Qian et al. 2017). Cela a pour conséquence de favoriser les interactions intermoléculaires et la formation des fibrilles amyloïdes. Sabate et al. (2010) ont démontré que la cinétique d'agrégation amyloïde est directement liée à la température. Ils décrivent que cette relation est de type Arrhenius (Wang et al. 2018), c'est-à-dire qu'une élévation de la température peut diminuer la barrière énergétique associée au mécanisme d'agrégation favorisant ainsi la nucléation et la croissance des fibrilles amyloïdes. Cette relation est valide seulement dans l'intervalle de température de 25°C et 50°C (Chakroun et al. 2016) au-delà de cet intervalle on observe la dénaturation thermique (Mahler et al. 2009) du polypeptide (Olivia et al. 2016). En d'autres termes, une augmentation de la température dans l'intervalle mentionné peut favoriser l'agrégation du polypeptide en formant des structures ordonnées de feuillet β , et en dehors de l'intervalle de température 25°C et 50°C, (Olivia et al. 2016) elle peut dénaturer le polypeptide et former des structures amorphes désordonnées.

Également, le facteur de l'agitation mécanique comme la filtration ou le cisaillement joue un rôle important dans l'agrégation des polypeptides, pouvant induire une dénaturation partielle ou totale de la structure native du polypeptide. Cette modification de la conformation du polypeptide peut exposer à la surface des régions hydrophobes favorisant ainsi des interactions intermoléculaires qui conduisent à la formation des agrégats. Ce phénomène d'agitation a un impact majeur dans la formulation du domaine biopharmaceutique, en effet lors du transport ou agitation de flacons contenant des médicaments à base de polypeptides peuvent dénaturer, entraîner la perte de stabilité et altérer son activité biologique (Zapadka et al. 2017).

La concentration est un autre facteur important qui influence la formation des fibrilles amyloïdes. La phase de latence et la phase d'élongation de la cinétique de la formation des fibrilles amyloïdes peuvent être modifiées en fonction de la concentration du polypeptide présente en solution. Les paramètres cinétiques (temps de latence et temps de demi-réaction) peuvent diminuer de façon significative lorsque la concentration du polypeptide augmente. Ceci démontre l'accélération de l'agrégation du polypeptide lorsque la concentration augmente (Zapadka et al. 2017). En effet, l'augmentation de la concentration en polypeptides accroît leur proximité locale, ce qui augmente la fréquence des collisions intermoléculaires et favorise la nucléation et l'élongation des fibrilles.

Cependant, la relation entre la concentration et la vitesse d'agrégation n'est pas toujours linéaire, elle dépend aussi de la nature des certains polypeptides comme le Glucagon-like peptide GLP-1 (Zapadka et al. 2017). Ce peptide se dirige vers la voie 'off-pathway', produisant des oligomères intermédiaires qui n'aboutissent pas à la formation de fibrilles amyloïdes ordonnées. Ces espèces intermédiaires peuvent ralentir ou inhiber temporairement la cinétique de l'agrégation du polypeptide, en limitant la formation de noyaux stables nécessaires à l'élongation des fibrilles. Le comportement du GLP-1 dépend des conditions physico-chimiques du milieu notamment du pH. En effet, à $\text{pH} > 8$, le peptide suit la relation linéaire concentration/vitesse d'agrégation, avec une diminution du temps de latence et du temps de demi-réaction lorsque la concentration du peptide augmente (Zapadka et al. 2017). À ce pH, les oligomères formés sont majoritairement 'on-pathway' qui favorisent la formation de fibrilles amyloïdes. En revanche, à $\text{pH} < 7,5$, l'augmentation de la concentration favorise la formation des oligomères off-pathway, ralentissant la cinétique d'agrégation du peptide GLP-1 (Zapadka et al. 2017). Ainsi la concentration du polypeptide est un facteur qui peut moduler la vitesse de l'agrégation du polypeptide et également l'influence d'autres facteurs comme le pH, soulignant la complexité du mécanisme de l'agrégation et différents paramètres influençant cela (Zapadka et al. 2017). Cette voie se diffère de la voie 'on pathway' où les monomères s'assemblent en oligomères puis en protofibrilles menant à la formation de fibrilles amyloïdes structurées.

Par ailleurs, la surface est un autre facteur important dans l'agrégation des polypeptides. Les surfaces biologiques et non biologiques exercent une influence non négligeable sur l'agrégation. Dans le cas des surfaces biologiques comme la membrane cellulaire qui est amphiphile, les acides aminés hydrophobes constituant certains polypeptides peuvent interagir avec des régions hydrophobes de la bicouche lipidique (Galvagnion et al. 2017). Ceci induit les monomères à s'associer entre eux et à former des oligomères cytotoxiques, des protofibrilles et ensuite des fibrilles amyloïdes. Ces interactions entre le polypeptide et la membrane cellulaire peuvent perturber la fonction de la cellule et parfois mener à l'apoptose comme dans plusieurs cas de maladies : MA et DT2 (Galvagnion et al. 2017).

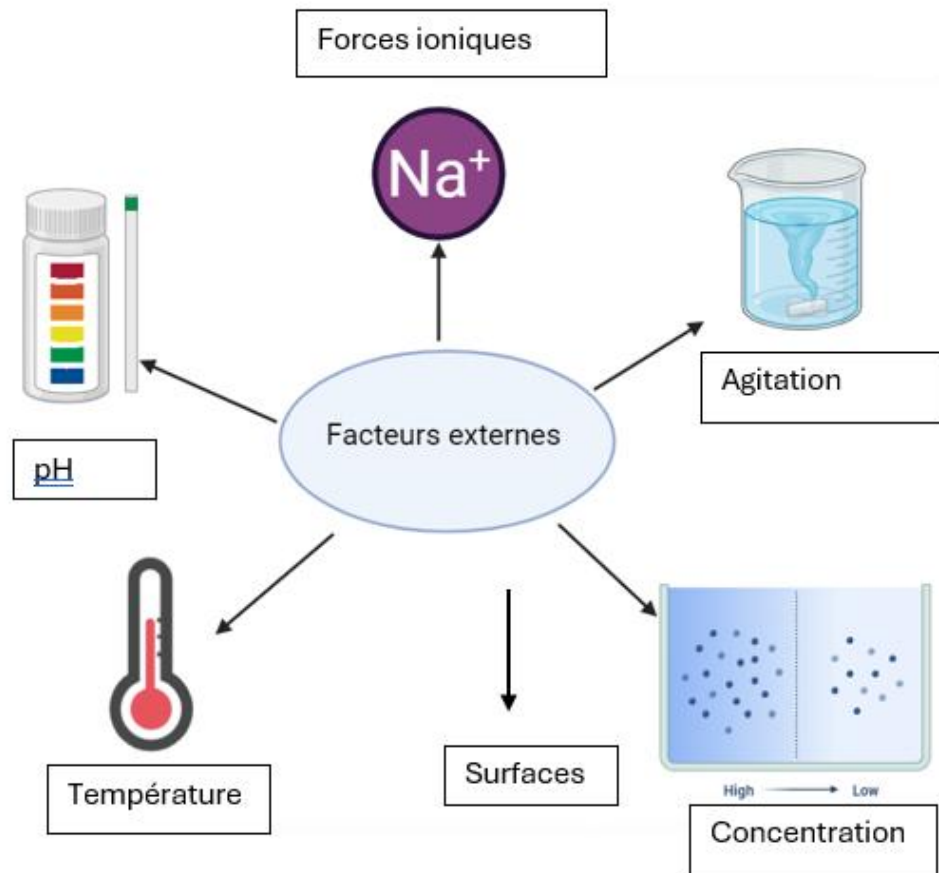


Figure 1.3 Facteurs externes influençant l'agrégation des polypeptides

1.2 Effets des propriétés physico-chimiques des surfaces sur l'agrégation.

1.2.1 Les différents types de surfaces

1.2.1.1 Les modèles de surfaces biologiques (liposomes et self assembled monolayers (SAM))

L'étude de l'effet de la surface biologique sur l'agrégation du polypeptide peut être réalisée sur des modèles de surfaces biologiques permettant de reproduire les caractéristiques physico-chimiques des membranes cellulaires. Ces modèles comme des liposomes (Andrade et al. 2021), SAM (Wang et al. 2011) et hydrogels (Simpson et al. 2020) permettent un environnement contrôlé pour une étude des propriétés de la surface influençant la nucléation et la croissance des fibrilles amyloïdes.

Les liposomes sont des vésicules sphériques constituées de bicouches lipidiques entourant un cœur hydrophobe (Figure 1.4). Il s'agit du modèle couramment utilisé pour mimer la membrane cellulaire constituée des phospholipides. De plus, la structure et la taille du liposome sont parfaitement adéquates pour concevoir des modèles expérimentaux précis et contrôlés. Une étude (Saha et al. 2013) a montré que le peptide A β peut soit s'agréger à la surface externe des liposomes ou soit diffuser à l'intérieur de la vésicule pour s'agréger à la face interne du liposome. Ce différent comportement du même polypeptide s'explique par plusieurs facteurs comme la composition lipidique, la charge de surface et du degré d'hydrophobicité du polypeptide. Ces comportements sont aussi observés in vivo dans le processus d'agrégation pathologique notamment la dégénérescence neuronale (Sebastiano et al. 2023), où l'agrégation induite par la surface membranaire conduit à la toxicité cellulaire ou l'apoptose (Kotler et al. 2014).

Le liposome est un modèle précis permettant de suivre l'agrégation par des techniques comme la microscopie à fluorescence (Terakawa et al. 2015, Uemura et al. 1983) et la microscopie à confocale (Nandhi et al. 2016, Lv Z et al. 2021).

Les monocouches autoassemblées (SAM) constituent un autre modèle de surface biologique pour étudier l'adsorption et l'agrégation des polypeptides (Figure 1.4). Les SAM sont constitués de molécules amphiphiles comme les alcanethiols (Voiciuk et al. 2012) qui sont déposés sur une surface solide telle que l'or, ce qui permet d'avoir un revêtement structuré. Le modèle de SAM permet de modifier les extrémités des chaînes afin de pouvoir modifier les propriétés physico-chimiques de cette surface comme l'hydrophobicité et la charge de surface.

Les SAM avec un groupement terminal hydrophobique tel que le méthyle $(CH_2)_{11}-CH_3$ (CH_2-CH_3) auront tendance à favoriser l'agrégation de polypeptides (Voiciuk et al. 2012). La structure amphiphile de ces SAM a un effet sur différents types de polypeptides, par exemple, l'interaction hydrophobique entre IAPP et le terminal CH_3 -SAM a tendance à retarder la fibrillation de l'IAPP (Hajiraissi et al. 2018). Tandis que dans le cas de l'A β , le terminal CH_3 -SAM provoque la formation des fibrilles constituées de feuillet β (Voiciuk et al. 2012). Dans le cas où le terminal est chargé négativement comme des groupes $-OH$ ou $-COOH$, l'adsorption est non spécifique et stabilise les conformations natives du polypeptide limitant ainsi l'agrégation amyloïde (Voiciuk et al. 2012, Hajiraissi et al. 2018).

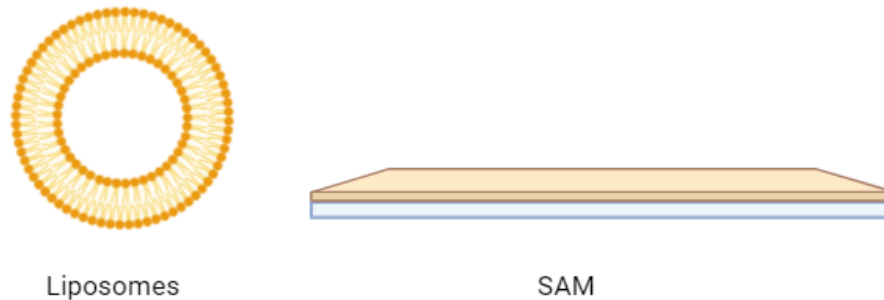


Figure 1.4 Les modèles de surfaces biologiques

1.2.1.2 Les surfaces non biologiques (verre, polymères, téflon, mica, graphite et nanoparticules)

Les modèles de surfaces non biologiques (Figure 1.5) occupent une place centrale dans l'étude de l'agrégation du polypeptide, en raison de leurs conditions expérimentales contrôlables et stables. Parmi les surfaces non biologiques, le verre (Deng et al. 2022) est couramment utilisé dans le domaine de l'industrie et la recherche. Par exemple, la pipette, l'erlenmeyer et le tube à essai sont souvent fabriqués en verre standard composé de dioxyde de silicium (Deng et al. 2022). Le groupement hydroxyles silanol (Si-OH) rend le verre très hydrophile ce qui peut favoriser l'adsorption de molécules polaires, modifier la conformation native du polypeptide ainsi que favoriser la fibrillation de certains polypeptides.

Afin d'étudier davantage l'étude de l'agrégation du polypeptide, des modèles du verre recouvert par des couches polymériques sont utilisés. Des polymères comme le polyéthylène glycol (PEG) (hydrophile), hydroxyéthylméthacrylate (pHEMA) (hydrophile modéré) et polystyrène (PS) (hydrophobe) peuvent être utilisés pour obtenir différents niveaux d'hydrophobicité. Shen et al. (2012) ont étudié l'agrégation du polypeptide A β 42 sur des surfaces de verre recouvert des polymères de PEG, pHEMA et PS. Cette étude (Shen et al. 2012) démontre que le verre recouvert du polymère pHEMA ayant une hydrophobicité modérée permet une meilleure mobilité des monomères de l'A β 42, favorisant ainsi la formation des fibrilles. Tandis que le verre recouvert du polymère PS qui est très hydrophobe réduit la mobilité libre des monomères de l'A β 42 défavorisant ainsi l'agrégation de ce polypeptide (Shen et al. 2012). Ces observations soulignent l'importance des propriétés d'hydrophobicité de la surface dans la modulation du mécanisme d'agrégation, accentuant que la surface peut être le site de nucléation des polypeptides.

Un autre exemple de surface non biologique est le téflon composé de polytétrafluoroéthylène (PTFE), qui est connu pour sa stabilité thermique, son inertie chimique et son hydrophobicité (Giacomelli et al. 2003). Le téflon est utilisé pour mimer la membrane en bicouche lipidique et étudier l'effet de l'hydrophobicité de la surface sur l'adsorption et l'agrégation du polypeptide. En effet, la surface hydrophobe est connue pour favoriser l'adsorption sélective de polypeptides possédant des régions hydrophobes exposées (Nakanishi et al. 2001). Plusieurs travaux (Williams TL et al. 2011, Giacomelli et al. 2003) ont démontré que le téflon peut accélérer la transition des monomères du peptide vers des oligomères favorisant ainsi la formation des fibrilles.

Le mica est un autre exemple de surface non biologique, composé de silicate d'aluminium (Kowalewski et al. 1999). Le mica est une surface lisse qui facilite l'étude des échantillons à haute résolution en particulier pour les analyses en microscopie à force atomique (AFM) (Kowalewski et al. 1999). Le mica est hydrophile et négativement chargé, cela permet de mimer la membrane cellulaire constituée de phospholipides. Une étude (Kowalewski et al. 1999) sur A β a été réalisée démontrant que la surface de mica induit la formation de fibrilles de A β à une très faible concentration. Plusieurs études (Kowalewski et al. 1999, Mulheran et al. 2009) ont démontré que le mica peut être des sites de nucléation pour l'agrégation des polypeptides. Le mica permet de faciliter les interactions électrostatiques attractives entre les monomères du polypeptide ainsi que la formation des fibrilles (Kowalewski et al. 1999).

Le graphite est un autre modèle connu pour sa conductivité et son inertie chimique. Le graphite pyrolytique hautement orienté (HOPG) (Joythi et al. 2012) est largement utilisé comme substrat de référence en microscopie à haute résolution. Le graphite est composé de feuillets de graphène empilés (Christopher R et al. 2012) par des interactions faibles comme le van der Waals formant une surface plane, hydrophobe et inerte (Legleiter J. et al. 2022). La propriété hydrophobique du graphite favorise des interactions hydrophobes et π - π avec les résidus aromatiques des polypeptides (Legleiter J. et al. 2022), favorisant ainsi l'agrégation du polypeptide.

Les nanoparticules (NPs) peuvent être composées d'or, de silice ou de polymères parmi de nombreux autres matériaux. Les NPs ont une surface très grande qui augmente la probabilité de contact entre le polypeptide et la surface (Linse et al. 2007), permettant une meilleure approche d'étude de l'agrégation du polypeptide induite par la surface (Colvin et al. 2007, Cabaleiro-Lago et al. 2012). Les nanoparticules telles que l'or ou la silice peuvent inhiber l'agrégation en stabilisant les monomères et en accélérant la nucléation en servant de matrice d'adsorption (Linse et al. 2007).

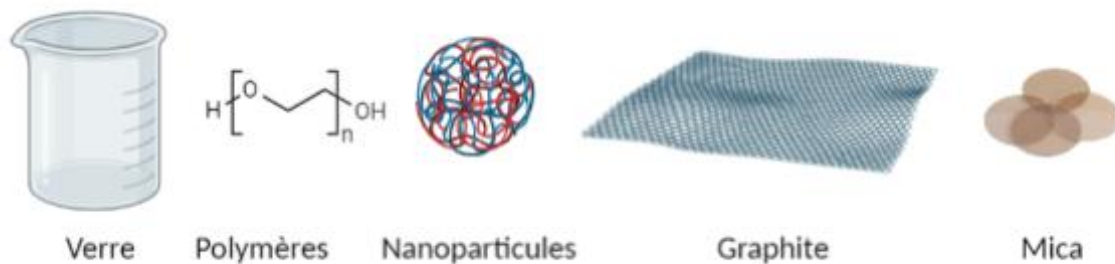


Figure 1.5 Les modèles de surfaces non-biologiques

1.2.2 L'effet des propriétés de la surface induisant l'agrégation

L'agrégation des polypeptides est un mécanisme hautement influencé par les propriétés de la surface avec laquelle ils interagissent. La surface peut agir comme un site de nucléation et altérer la conformation native du polypeptide (Figure 1.6). Parmi les propriétés de surface, l'hydrophobicité, la charge ionique et la rugosité jouent un rôle essentiel.

L'hydrophobicité de la surface constitue une propriété déterminante dans le mécanisme d'agrégation des polypeptides. Shen et al. (2012) ont démontré que des surfaces polymériques présentant des niveaux d'hydrophobicité différents induisent des comportements distincts du peptide A β . Dans leur étude, trois polymères : PEG (hydrophile), pHEMA (hydrophobicité modérée) et PS (très hydrophobe) ont été déposés sur une surface de mica afin d'évaluer leur impact sur la cinétique d'agrégation (Shen et al. 2012).

Sur le mica recouvert de PEG, fortement hydrophile, les monomères d'A β restent hautement mobiles à la surface, ce qui limite leurs interactions mutuelles et par conséquent la croissance fibrillaire n'est pas observée (Shen et al. 2012). À l'inverse, une surface recouverte de PS (hydrophobicité élevée) entraîne une adsorption irréversible d'A β . Cette immobilisation réduit la mobilité des monomères d'A β , les empêchant de s'associer pour initier la formation de fibrilles. Tandis que sur la surface de pHEMA, (hydrophobicité modérée), Shen et al. 2012 ont observé la formation de fibrilles amyloïdes. L'équilibre entre l'adsorption et la mobilité semble optimal, les monomères sont adsorbés sur la surface de façon réversible permettant la formation de fibrilles (Shen et al. 2012). Ces observations mettent en évidence que l'hydrophobicité n'exerce pas un effet linéaire sur l'agrégation mais qu'elle permet un équilibre entre l'adsorption, la mobilité et la formation de fibrilles amyloïdes. L'effet de la surface sur l'agrégation de polypeptides dépend aussi de la nature du polypeptide étudié, par exemple dans le cas de l'IAPP l'effet de l'hydrophobicité des surfaces s'exprime différemment lequel sera discuté au chapitre 2.

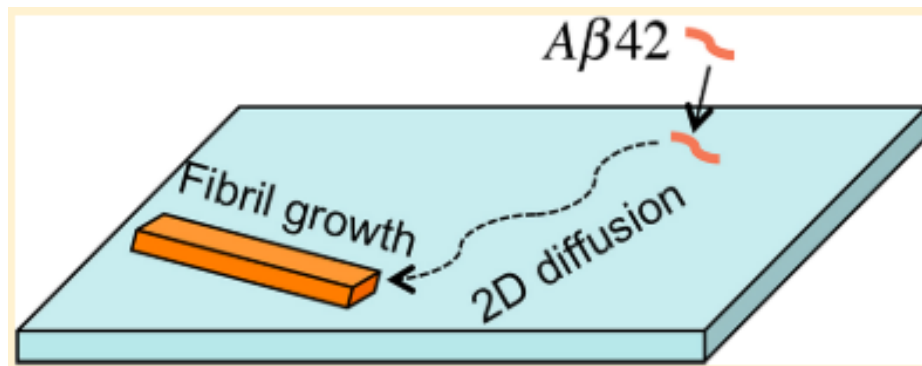


Figure 1.6 Schéma illustrant l'agrégation A β sur une surface (Extrait de Shen et al. 2012)

La charge ionique est une autre propriété importante de la surface, qui joue un rôle déterminant dans l'adsorption des peptides amyloïdes et dans l'induction de l'agrégation. Les interactions électrostatiques (Moores B. et al. 2011) entre les résidus chargés du peptide et la surface permettent une accumulation locale du peptide ainsi augmentant sa concentration locale. Les surfaces chargées négativement vont promouvoir l'agrégation de peptides cationiques à pH physiologique, tout en stabilisant des fibrilles riches en feuillets β (Moores B. et al. 2011). Des études (Linse S. et al. 2007, Moores B. et al. 2011) ont démontré que la charge de la surface influence la cinétique d'agrégation.

La rugosité de surface constitue une autre propriété de surface clé influençant l'agrégation des peptides amyloïdes. Une surface rugueuse présentant des défauts topographiques peut modifier la diffusion latérale et l'interaction des monomères peptidiques à la surface. Shezad et al. (2016) ont utilisé des surfaces recouvertes de polystyrène présentant différents degrés de rugosité nanométrique. Ils ont démontré qu'une surface ayant une rugosité modérée peut favoriser l'accumulation locale des monomères peptidiques ainsi que former des fibrilles riches en feuillets β (Shezad et al. 2016). En revanche, lorsque la rugosité est prononcée, les monomères peuvent être piégés dans les pores nanométriques de la surface, réduisant leur mobilité et limitant la formation des fibrilles. Ainsi, l'agrégation peut être interrompue ou former des agrégats amorphes (Shezad et al. 2016).

1.3 Islet amyloid polypeptide

1.3.1 Structure primaire et secondaire

L'islet amyloïd polypeptide (IAPP) aussi appelé amyline est une hormone peptidique de 37 acides aminés co-sécrétée avec l'insuline par les cellules β pancréatiques (Lutz et al. 2022). L'IAPP est impliquée dans le diabète de type II (Montane et al. 2012), et plus spécifiquement l'IAPP forme des dépôts amyloïdes cytotoxiques (Montane et al. 2012). IAPP est une hormone peptidique clé du métabolisme énergétique (Montane et al. 2012). Les taux plasmatiques du peptide suivent la masse adipeuse expliquant son rôle dans les dépenses énergétiques (Montane et al. 2012). Dans les cellules β , l'hormone est co-sécrétée avec l'insuline généralement dans un ratio molaire insuline : IAPP de 0,5 % à 5 % (Montane et al. 2012).

L'IAPP est produite sous la forme d'un précurseur, pro-IAPP qui est une protéine de 67 résidus (Akter et al. 2016, Kiriya et al. 2018). Ce précurseur est transformé en IAPP par plusieurs étapes de maturation intracellulaire. Le clivage du précurseur est assuré par les prohormones convertases PC1/3 et PC2 (Akter et al. 2016, Montane et al. 2012) qui génèrent un peptide intermédiaire qui sera suivi d'une amidation du C-terminal (Akter et al. 2016, Montane et al. 2012). Cette étape est réalisée par deux enzymes : carboxypeptidase E (CPE) et peptidylglycine α -amidating monooxygenase (PAM) (Akter et al. 2016, Montane et al. 2012). Par la suite, l'amidation du C-terminal favorise la

formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre Cys2 et Cys7 (Kiryama and Nochi et al. 2018) renforçant la stabilité conformationnelle de l'IAPP. Le pKa de l'extrémité N-terminale, équivalent à celui de His18, induit une charge net positive de +4 à pH 5,5 comparativement à +2 à pH 8 neutre (Akter et al. 2016), favorisant l'adhésion du peptide à la membrane cellulaire.



Figure 1.7 Structure primaire de l'IAPP

Cette séquence comporte :

- Un **pont disulfure interne (Cys2-Cys7)** qui est formé lors de la maturation de l'IAPP, rigidifiant le segment N-terminal (résidus 1-8) (Akter et al. 2016).
- Une **amidation du C-terminal (-NH₂)**, une étape cruciale pour l'activité fonctionnelle du peptide et modifiant la charge globale de ce dernier, influençant ainsi les interactions électrostatiques et sa propension à s'agréger (Akter et al. 2016, Montane et al. 2012).
- Le segment central entre les résidus 25 et 28 contient des acides aminés hydrophobes respectivement alanine-isoleucine-leucine-sérine connu pour sa tendance à s'agréger et cette région est impliquée dans le DT2 humain (Westermarck et al. 1987, Madine et al. 2008).

L'IAPP de toutes les espèces ne présente pas toute la même aptitude à s'agréger en structures amyloïdes fibrillaires. L'IAPP des rongeurs comme le rat ou la souris présente plusieurs substitutions en proline dans la région 25, 28 et 29 (Green et al. 2003). Ces prolines défavorisent la structure de feuillets β empêchant la formation des fibrilles, expliquant la résistance à l'amyloïdose des rongeurs. Tandis que l'IAPP humaine présente une mutation S20G correspondant au remplacement de la sérine par une glycine au résidu 20 (Sakagashira et al. 2000), ce qui accélère la formation d'oligomères et de fibrilles

amyloïdes (Figure 1.8), augmentant ainsi la forte probabilité de développer le DT2 (Sakagashira et al. 2000).

La structure secondaire de l'IAPP sous forme monomérique adopte principalement une conformation aléatoire en solution aqueuse. Dans un environnement mimant la membrane cellulaire amphiphile comme en présence de détergents ou d'un solvant organique, IAPP adopte une structure en hélice α stabilisée entre les résidus 7-17 et 21-28 (Nanga et al. 2009). L'hélice α est stabilisée par des interactions hydrophobes entre le peptide et les phospholipides alignant les monomères du peptide de l'IAPP à la surface de la membrane. Ceci expose des régions hydrophobes du peptide facilitant l'interaction entre les monomères et la formation d'oligomères. La conversion structurale de l'hélice α en feuillets β est le point critique de la nucléation amyloïde. Les oligomères membranaires issus de cette transition sont hautement cytotoxiques car ils perturbent la bicouche lipidique membranaire en déstabilisant la couche externe de la bicouche, ce qui provoque un stress oxydatif sur les cellules β pancréatiques.

La transition de l'hélice α vers des conformations riches en feuillets β combinée à l'ancrage du peptide à la surface membranaire, crée un environnement favorable à l'auto-association de l'IAPP formant des oligomères, ce qui repose sur les étapes précoces du mécanisme d'agrégation.



Figure 1.8 Fibrille d'amyloïde de l'IAPP (PDB 6ZRF)

1.3.2 Les fonctions physiologiques de l'IAPP

L'IAPP a plusieurs fonctions physiologiques impliquées dans l'homéostasie énergétique et la régulation de la glycémie. Les activités biologiques de l'IAPP sont médiées par les récepteurs de la famille des calcitonine récepteur (CTR). Cette dernière forme des hétérodimères avec des protéines de type *Receptor Activity Modifying Protein* (RAMP) (calcitonin receptor-RAMP complexe) Akter et al. 2016). L'association de CTR avec l'un des RAMPs confère au récepteur une spécificité vis-à-vis des différents peptides de la famille des calcitonines (Bower et Hay et al. 2016). Il existe trois récepteurs de l'IAPP : AMY1, hétérodimère de CTR et RAMP1, AMY2, hétérodimère de CTR et RAMP2 et AMY3, hétérodimère de CTR et RAMP3 (Hay et al. 2018, Christopoulos et al. 1999). Le système nerveux central possède ces récepteurs au niveau du tronc cérébral (Akter et al. 2016). Ce dernier est perméable à l'IAPP qui va déclencher une cascade de signalisation cellulaire à la suite de sa fixation au récepteur (Kiriya et al. 2018). Ces interactions jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique et la vidange gastrique (Edwards, Gedulin et al. 1998) (Figure 1.9).

Suite à l'activation de l'IAPP, celui-ci a plusieurs fonctions physiologiques comme la régulation de l'activité et la prolifération des ostéoblastes (Cornish et al. 1998), permet la vasodilatation et l'activité rénale (Brain et al., 1990) mais il est surtout connu sous le nom de l'hormone synergique aux actions de l'insuline (Mulder et al., 1996). L'IAPP est produit dans un ratio de 1 pour 100 molécules d'insuline (Alam et al. 1992). Il régule la sécrétion de glucagon, en effet en période post-prandiale l'IAPP supprime la sécrétion de glucagon des cellules α pancréatiques.

Le lien entre l'IAPP et le diabète de type 2 a été établi pour la première fois après la découverte de dépôts amyloïdes d'IAPP dans 90% des pancréas de patients atteints de cette pathologie (Westermarck P et al. 1987). En effet, le DT2 se caractérise par une résistance à l'insuline (Galicia-Garcia et al. 2020), réduisant l'efficacité du transport du glucose vers les cellules (Rahman et al. 2021). Lorsque l'organisme devient de moins en moins sensible à l'insuline, le pancréas réagit en augmentant la sécrétion de l'insuline afin de maintenir une glycémie optimale (Asthana et al. 2018). Cette hyperproduction d'insuline s'accompagne d'une augmentation parallèle de la synthèse d'IAPP (Asthana et al. 2018). Dans le cas de DT2, le ratio peut se réduire jusqu'à 1 molécule d'IAPP pour 20

molécules d'insuline (Hull et al. 2004), traduisant une augmentation accrue de la production de l'IAPP. Or, l'IAPP humaine a une forte propension à s'auto-assembler et à former des dépôts amyloïdes, un mécanisme directement lié à la concentration locale (Asthana et al. 2018). Ces dépôts amyloïdes exercent une toxicité importante sur les cellules β pancréatiques induisant l'apoptose de ces cellules, aggravant le DT2 (Asthana et al. 2018).

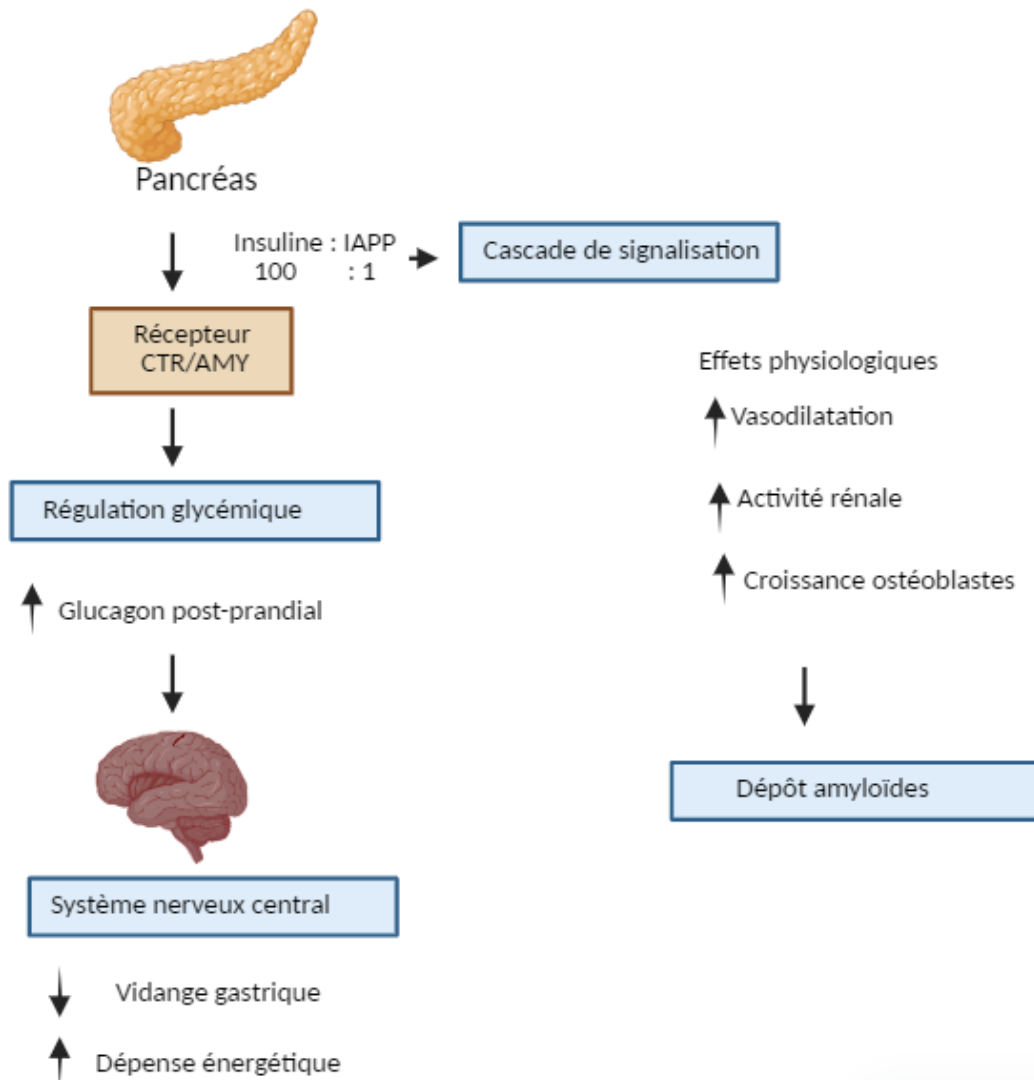


Figure 1.9 Fonctions physiologiques régulées par IAPP

1.3.3 Le mécanisme d'agrégation de l'IAPP

L'agrégation de l'IAPP débute par une nucléation primaire lente, puis évolue vers une croissance fibrillaire rapide, renforcée par une nucléation secondaire sur les surfaces préexistantes. La nucléation primaire est l'étape limitante et cette étape représente la phase de latence sur la courbe cinétique (Axell et al. 2024). La région 20-29 (Marek et al. 2013) sur la séquence primaire de l'IAPP est hydrophobes et riches en résidus amyloïdogènes et constitue le facteur clé initiant la nucléation primaire en formant des noyaux précurseurs. Tel que mentionné précédemment, l'IAPP des rongeurs n'a pas une tendance à former des feuilletts β (Sakagashira et al. 2000). Des études indiquent que cette région est essentielle à la stabilité des fibrilles amyloïdes (Marek et al. 2013) et qu'elle peut générer des fibres indépendamment des autres régions d'IAPP. Suite à la nucléation primaire, survient la nucléation secondaire, (Axell et al. 2024) qui se caractérise par une cinétique accélérée, les protofibrilles ou fibrilles existantes servant de catalyseurs à la formation de nouveaux noyaux, ce qui conduit à une amplification rapide de l'agrégation (Axell et al. 2024). Cette étape explique la rapidité des dépôts amyloïdes dans le DT2.

Par ailleurs, l'agrégation de l'IAPP peut être influencée par des facteurs externes (Marek et al. 2012, Lai et al. 1996) et internes (Tartaglia et al. 2008), mentionnés dans la section 1.1.4, plus spécifiquement l'IAPP interagit fortement avec la membrane constituée de phospholipides. Cette interaction accélère la nucléation primaire, favorisant la formation des oligomères cytotoxiques.

1.4. Les polyphénols

1.4.1 Les propriétés

Les polyphénols sont des molécules naturelles extrêmement diversifiées de métabolites secondaires végétaux (Abbas et al. 2017), caractérisés par la présence d'au moins un groupement phénolique et d'un noyau aromatique substitué, (Abbas et al. 2017) qui est naturellement présent chez les végétaux comme protection contre les agents pathogènes (Abbas et al. 2017). Les polyphénols font partie du régime alimentaire humain, étant largement présents dans les fruits, les légumes, les boissons et le thé vert (Ehrnhoefer D. et al. 2008). Les polyphénols sont utilisés depuis longtemps dans diverses médecines traditionnelles et font aujourd'hui l'objet d'un intérêt croissant en biomédecine moderne (Rasouli et al. 2017). Des études épidémiologiques ont montré qu'une alimentation riche en polyphénols est associée à une réduction du risque de pathologies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, (Kim et al. 2017) certains cancers (Han et al. 2023), les maladies métaboliques (Lanuza et al. 2023) et diverses affections liées au stress oxydatif (Scalbert A et al. 2005).

La structure du polyphénol avec des cycles aromatiques (Rasouli et al. 2017) (Figure 1.10) lui permet la délocalisation électronique (Ehrnhoefer et al. 2008). Cette résonance électronique du cycle aromatique explique leur réactivité redox conférant aux polyphénols une capacité d'oxydation contrôlée ainsi déterminant leur potentiel antioxydant. En effet, les donations d'électrons ou de protons des polyphénols permettent d'inhiber le stress oxydatif (Scalbert A et al. 2005), facteur clé du vieillissement cellulaire et du développement de maladies cardiovasculaires (Kim et al. 2017), neurodégénératives ou cancéreuses (Han et al. 2023 et Wan S et al. 2024). Les flavonoïdes et les acides phénoliques sont les plus reconnus pour leur activité antioxydante (Scalbert A et al. 2005). Également, certains polyphénols ont des motifs catéchols capables de complexer des ions métalliques Fe^{2+}/Fe^{3+} ou Cu^+/Cu^{2+} , empêchant leur participation aux réactions de Fenton et de Haber-Weiss qui génèrent des radicaux réactifs (Perron et al. 2009).

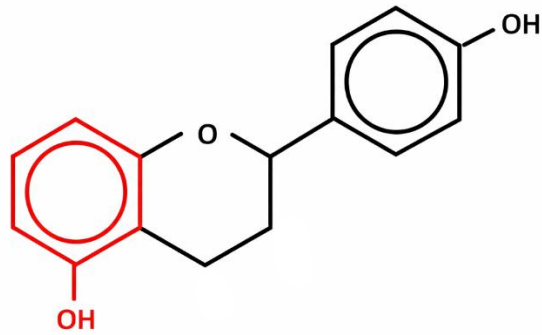


Figure 1.10 La structure générale d'un polyphénol (Adapté de Vahedian et al.2017)

Les polyphénols ont également des propriétés anti-inflammatoires et peuvent moduler des voies de signalisation intracellulaire. Par exemple, ils inhibent l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α ou IL-6 (Rahman et al. 2006), ou en activant la réponse antioxydante via Nrf2 (Rahman et al. 2006), ils permettent un effet anti-inflammatoire associé aux pathogènes métaboliques et neurodégénératifs (Rahman et al. 2006) et aussi dans la prévention des maladies liées à l'inflammation comme les maladies auto-immunes (Poti et al. 2019).

Les polyphénols sont fortement étudiés pour leur effet anti-agrégants sur les peptides qui ont tendance à s'agréger participant à des maladies comme le diabète type 2 et la MA. Des travaux (Gaudreault et al. 2021, Rahman et al. 2006), montrent que les polyphénols peuvent influencer la formation ou la stabilité d'agrégats protéiques, ce qui leur confère un intérêt croissant dans l'étude des maladies liées au mauvais repliement des protéines.

1.4.2 Le rôle inhibiteur des polyphénols dans l'agrégation des peptides amyloïdes.

Les polyphénols ayant une propriété anti-agrégante peuvent interagir avec des protéines mal repliées et moduler leur agrégation (Ehrnhoefer et al. 2008). Cette propriété repose sur leur structure aromatique conjuguée, permettant des interactions de type π - π et hydrogène avec des régions hydrophobes des peptides amyloïdes (Ehrnhoefer et al. 2008). Cette interaction permet une perturbation du mécanisme d'agrégation notamment

au niveau des étapes de la phase latence et de l'élongation de l'agrégation, ceci a pour conséquence de limiter la formation des structures fibrillaires (Ehrnhoefer et al. 2008).

Parmi les polyphénols plus étudiés pour leurs propriétés anti-agrégants, l'épigallocatechine gallate (EGCG) une catéchine du thé vert, est bien connue comme un inhibiteur puissant de l'agrégation de plusieurs peptides amyloïdes, (Capasso L et al. 2025) dont A β dans MA, IAPP dans DT2 et α -synucléine dans la maladie de Parkinson. La structure aromatique de l'EGCG lui permet de se lier aux monomères du peptide ou aux oligomères partiellement dépliés, dont les régions hydrophobes sont encore exposées, cette liaison empêche les peptides d'acquies les conformations feuillet- β (Ehrnhoefer et al. 2008). En effet, l'EGCG se lie aux monomères du peptide ou aux oligomères précoces via des interactions π - π et hydrogène. Cette interaction empêche l'organisation du peptide en feuillet- β stable, qui est nécessaire à la nucléation (Ehrnhoefer et al. 2008). Également, l'EGCG redirige les peptides vers des agrégats amorphes ou non fibrillaires, ces structures nommées 'off pathway' sont moins toxiques (Ehrnhoefer et al. 2008). L'EGCG peut aussi remodeler des fibrilles préexistantes. L'effet de l'EGCG se traduit par un effet anti-agrégant des plaques amyloïdes formées par des peptides et une diminution de la perturbation membranaire.

La corilagine est un polyphénol couramment utilisé dans l'étude de l'inhibition de l'agrégation amyloïde (Figure 1.11). La corilagine est présent dans des plantes médicinales comme *Phyllanthus urinaria* ou *Phyllanthus emblica* (*amla*) (Wang X et al. 2023). La corilagine a une structure composée d'un noyau glucose estérifié par des groupements galloyls (Gupta A et al. 2019) lui permettant d'interagir avec des protéines mal repliées. La corilagine possède aussi des effets anti-inflammatoires et antioxydants.

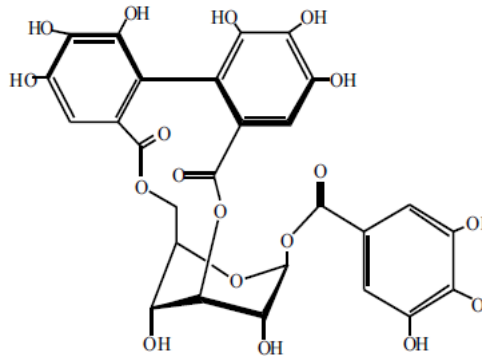


Figure 1.11 La structure de Corilagine (Wang X et al. 2023).

1.5 Problématiques et objectifs

1.5.1 Problématique

L'agrégation des peptides amyloïdes est un mécanisme connu dans de nombreuses maladies neurodégénératives et métaboliques. La conformation native de ces peptides peut être modifiée à cause des facteurs externes et internes, conduisant à la formation d'oligomères cytotoxiques et de fibrilles insolubles enrichies en feuillets- β -croisés, provoquant la dysfonction cellulaire ou l'apoptose. Parmi les facteurs modifiant leurs conformations natives, les propriétés physico-chimiques des surfaces semblent jouer un rôle crucial. Les propriétés de la surface comme la charge et l'hydrophobicité peuvent favoriser l'agrégation des peptides en modifiant la cinétique d'agrégation. Comprendre l'interaction surface-peptide constitue un élément clé afin de proposer des solutions vis-à-vis des agrégations ayant lieu dans des maladies et dans les procédures en industrie biopharmaceutique.

1.5.2 Hypothèses

Les surfaces modulent la cinétique d'agrégation des peptides amyloïdes, en favorisant ou en inhibant la formation des fibrilles. Afin d'atténuer ou d'inhiber la formation des fibrilles, le polyphénol corilagine peut être un bon inhibiteur. L'efficacité de la corilagine peut dépendre fortement de la nature, des propriétés physico-chimiques de la surface étudiée

et la nature peptidique. Comprendre cet équilibre est crucial pour la conception de stratégies thérapeutiques à base de polyphénols.

1.5.3 Objectifs

Objectif global : étudier l'impact global des propriétés d'hydrophobicité de la surface sur l'agrégation des peptides.

Objectifs spécifiques :

1. Comprendre l'impact de la composition de la surface sur l'agrégation d'IAPP.
2. Caractériser l'interaction IAPP-surface sur des surfaces recouvertes de polymères de différents niveaux d'hydrophobicité.
3. Évaluer l'effet inhibiteur du polyphénol corilagine sur l'agrégation induite par les surfaces de polymères.

CHAPITRE 2

IAPP Surface-Induced Aggregation and Corilagin's Inhibitory Effect

Shabeena Jegamohan^{a,b,c,†}, Maziar Jafari^{a,c,†}, Frédérique Bérubé^{a,b}, Steve Bourgault^{a,b*}, Roger Gaudreault^{a,c,*}

^aDepartment of Chemistry, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada

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

^cQuebec Centre for Advanced Materials (QCAM), Montreal, Canada.

†These authors contributed equally to this work

Article publié dans Physical Chemistry Chemical Physics (PCCP : 2026, DOI <https://doi.org/10.1039/D5CP04100G>)

Contributions des auteurs

Shabeena Jegamohan : Conception des expériences, expérimentation : monomérisation IAPP AFM, CD et ThT, spin coating, préparation des surfaces de polymères, essai du corilagin sur les surfaces et en solution, angle de contact, essai du corilagin sur analyse, traitement des résultats, recherche bibliographiques, analyse des résultats, conception des figures et rédaction.

Maziar Jafari : Conception des expériences, expérimentation PiFM (Figures 1, 3,4, 5 et 7) et grattage AFM (Figure 1 et 8), analyse des résultats, conception des figures et rédaction.

Frédérique Bérubé : Synthèse du peptide IAPP et expérimentation au TEM (Figure 2).

Steve Bourgault : Supervision, conception des expériences, analyse des résultats, révision et correction.

Roger Gaudreault : Supervision, conception des expériences, analyse des résultats, révision et correction.

2.1 Résumé

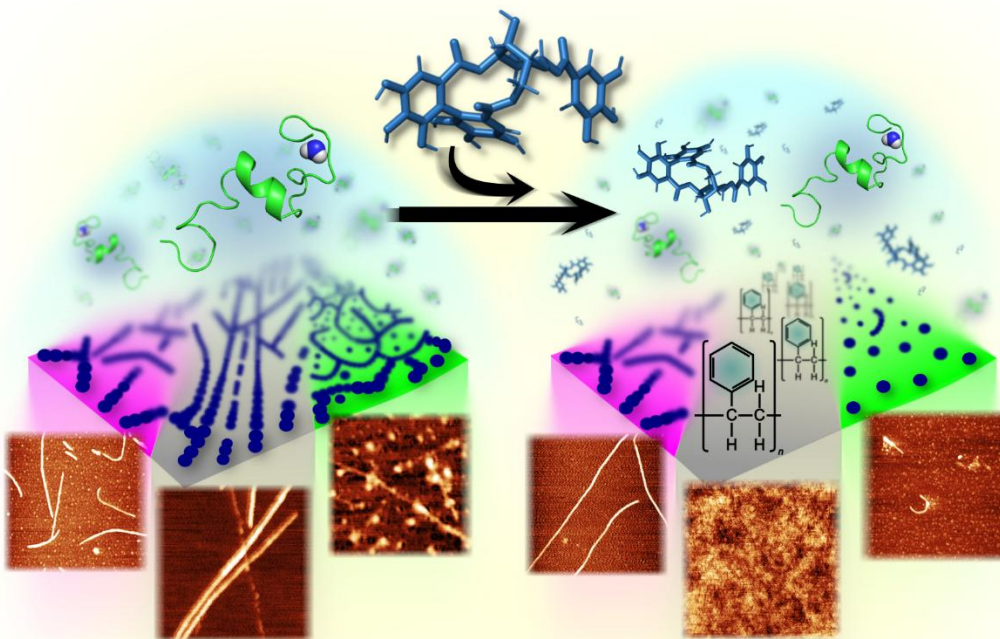
Les protéines et peptides s'autoassemblent spontanément en diverses entités supramoléculaires structurées, assurant des fonctions physiologiques essentielles. En contexte pathologique et biopharmaceutique, ces assemblages protéiques peuvent former des oligomères ou protofibrilles cytotoxiques. La plupart des études se concentrent sur les processus d'agrégation et d'inhibition en solution homogène. Cependant, les interactions locales avec les surfaces sont largement responsables des changements structuraux des protéines conduisant à l'agrégation. À ce jour, la recherche sur l'agrégation protéique induite par les surfaces reste insuffisante pour comprendre les mécanismes sous-jacents. Cette étude présente une méthodologie systématique permettant de produire exclusivement des fibrilles d'amyloïde du polypeptide de l'amyline (IAPP) induite par des surfaces de mica recouvertes de polymères comme le polyéthylène glycol (PEG), polyhydroxyéthylméthacrylate (pHEMA) et de polystyrène (PS). L'adsorption de l'IAPP a conduit à la formation de protofibrilles, de fibrilles ou de particules sphériques à l'échelle nanométrique, selon la nature de la surface polymérique. Les polyphénols sont connus pour modifier les structures et inhiber l'agrégation protéique, prévenant ainsi la cytotoxicité oligomérique. Cette étude vise aussi l'effet inhibiteur de la corilagine sur l'agrégation induite par les surfaces. Dans l'ensemble, la corilagine a montré des effets inhibiteurs variables sur les structures d'IAPP induites par les surfaces selon le type de surface.

Mots clés : Agrégation protéique, Fibrilles amyloïdes, surface, polymères, polyphénols, corilagine

2.2 Abstract

Proteins and peptides spontaneously assemble into various structured supramolecular entities that perform vital physiological functions. In pathology and biopharmaceutics, protein assemblies can form cytotoxic oligomers or protofibrils. Most studies focus on aggregation and inhibition processes in bulk solutions. However, local surface interactions are largely responsible for protein structural changes leading to aggregation. To date, research on surface-induced protein aggregation remains insufficient to comprehend underlying mechanisms. This work shows a systematic process to produce islet amyloid polypeptide (IAPP) exclusively surface-induced fibrils on Mica, polyethylene glycol (PEG), poly-hydroxyethyl methacrylate (pHEMA) and polystyrene (PS) polymeric-coated substrates. IAPP adsorbed and generated protofibrils, fibrils or spherical nanoscale particles, contingent upon the type of polymeric-coated surfaces. Polyphenols are known to alter structures and inhibit protein aggregation, preventing oligomeric cytotoxicity. This study further explores the effect of corilagin on surface-induced aggregation. Overall, corilagin exhibited differing inhibitory effects on the surface-induced IAPP structures, depending on the type of surfaces.

Keywords: protein aggregation, amyloid fibrils, surface, polymers, polyphenols, corilagin



Graphical Abstract

Introduction

The preservation of the native and soluble tridimensional structure of peptides and proteins is essential for their physiological activities. However, numerous diseases are associated with the misfolding and aggregation of proteins, often in the form of insoluble amyloid fibrils, including Alzheimer's disease (K.A. Burke et al. 2013, J.-H. Wen et al. 2023), diabetes mellitus type 2 (DM2) (M. Roden et al. 2019) and systemic amyloidosis (F.Chiti et al. 2017, C.Soto et al. 2018). Moreover, protein aggregation and associated loss-of-function constitute a major challenge for the biopharmaceutical industry, where protein-based biological drugs such as monoclonal antibodies and subunit vaccines (H.Tiernan et al. 2020) require high stability during the formulation process, transport and storage (N.B. Pham et al. 2020). For example, peptide drugs, such as insulin, are prone to aggregation during the formulation and transportation due to some factors such as pH, temperature and agitation (N.Majid et al. 2023). This undesirable aggregation compromises the therapeutic efficiency and the biosafety of biological drugs as well as the large-scale production within the biopharmaceutical industry. Thus, it is critical to investigate the mechanisms of protein aggregation to prevent, or inhibit, unaccounted cascading effects in both pathophysiological and biopharmaceutical contexts. Nonetheless, protein aggregation and the identification of amyloid formation inhibitors have been predominantly studied in bulk solutions, although it is well known that surfaces play a critical role in modulating organized self-assembly and amorphous aggregation. In fact, under physiological and biopharmaceutical contexts, proteins interact with different surfaces such as lipid membranes and polymers (L.Shen et al. 2012), which can act as nucleation sites for aggregation (M. Bokvist et al. 2004, M.Sebastiano et al. 2023).

Thus, insights into surface-induced protein aggregation are essential for supporting the identification of therapeutic strategies against amyloid disorders as well as to increase the stability of biopharmaceutical formulations.

Over the past decades, studies have reported the impact of surfaces on protein aggregation (J.Choi et al. 2018, K.L. Zapadka et al. 2017). These studies underscore the importance of considering surface effects when studying protein aggregation and identifying potential inhibitors. Proteins can adsorb onto a surface facilitated by hydrophobic (L.Nault et al. 2013, H.Nygren et al. 1995) and/or electrostatic interactions (A. Huotari et al. 2013, M.Rabe et al. 2011). This binding event may disturb the native protein structure to induce misfolding and eventual aggregation. Notably, surface properties such as hydrophobicity, hydrophilicity, porosity and roughness are known to affect the adsorption, diffusion as well as the conformation of the adsorbed proteins. Model surfaces such as hydrophobic polymer films (L.Shen et al. 2012), and supported lipid bilayers (M. Bokvist et al. 2004) have been shown to promote protein aggregation at concentrations lower than the critical aggregation concentration (CAC) determined in bulk solutions. For example, it was observed that the peptide therapeutic drug insulin and the disease-associated polypeptides A β (E.Y. Chi et al. 2010, B.Moore et al. 2011, C.E.Giacomelli et al. 2003, T.Kowalewski et al. 1999) and α -synuclein (M. Rabe et al. 2013) aggregate upon their contact with materials surfaces, including metals (stainless steel, titanium and titanium alloys) and various plastics (polypropylene, polytetrafluoroethylene, polyvinylchloride, polyamide, cellulose butyrate and silicone elastomer) (L.Nault et al. 2013, V.Feingold et al. 1984, W.D.Lougheed et al. 1980, L.Nault et al. 2013, M.V.Sefton et al. 1984). Although the discovery of aggregation inhibitors is an important area of research in the field of protein misfolding diseases, the importance of surface effects has been overtly neglected (X.Li et al. 2024, G.F.Martins et al. 2023, C.Yan et al. 2025). Protein interactions with different types of surfaces modify the conformational dynamics of the polypeptide chain, thereby changing inhibition mechanisms. Besides, among small molecule inhibitors of amyloid formation, polyphenols have shown persistent capacity to inhibit, or interfere, with the amyloid formation of several amyloidogenic polypeptides associated with disease states (J.Khalifa et al. 2025), although their inhibitory effect has been exclusively studied in bulk solutions.

Given the critical role of surfaces in modulating protein aggregation, this study aims at elucidating the impact of the surface properties on the aggregation inhibitory characteristics of polyphenols, by using corilagin as a polyphenol model (J.Khalifa et al. 2025). Moreover, the islet amyloid polypeptide (IAPP), a peptide hormone whose aggregation is associated with DM2, was used as the amyloidogenic polypeptide. Our results show that the physicochemical properties of polymer-coated surfaces, such as polyethylene glycol (PEG), poly-hydroxyethyl methacrylate (pHEMA) and polystyrene (PS), significantly modulate IAPP aggregation and affect the inhibitory efficacy of corilagin. These molecules are not necessarily biologically relevant, however they representatively show surface physicochemical effects, which emulate the industrial biomanufacturing context.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Synthesis and Monomerization of IAPP

IAPP was synthesized on solid support using Fmoc chemistry and a coupling reagent 2-(6-chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium hexafluorophosphate (HCTU), as previously described (E.Godin et al. 2019), using a Rink amide-type resin as the solid support. During synthesis, pseudoproline dipeptides were incorporated at selected positions to reduce aggregation of the growing peptide chain on resin. A mixture of trifluoroacetic acid (TFA), ethanedithiol, phenol and water (92%/2,5%/3%/2,5%) for 3 hours is used to cleave the peptide from the resin. Then, the peptide was precipitated using diethyl ether then redissolved in nanopure water prior to lyophilization. After cleavage from solid support, crude peptide was subjected to purification by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) using a preparative Luna C18 column with a linear gradient of acetonitrile in H₂O/TFA (0,06%, v/v). Fractions were analyzed by electrospray ionization time-of-flight (ESI-TOF) to confirm the expected mass. The oxidation of the cysteine residues at positions 2 and 7 was carried out in dimethyl sulfoxide (DMSO) at room temperature under mild agitation and allowed to proceed overnight to promote disulfide bond formation. Cyclized peptides were diluted in 0,06 % TFA water then purified via reverse-phase HPLC, and fractions > 95% purity were collected and lyophilized for further use.

Before experimental use, IAPP was first monomerized by dissolving the peptide in hexafluoroisopropanol at the concentration of 1 mg/mL, the solution was sonicated for 30 min and lyophilized. IAPP was dissolved in filtered Milli-Q water to usable final concentrations (100 µM, 10 µM, and 1 µM).

2.3.2 Preparation of Polymer-Coated Surface

Each polymer was dissolved into suitable solvents: PEG (polyethylene glycol) $M_w = 20\,000$ g/mol was dissolved into filtered (0.1 μm) water (1 wt %), pHEMA (poly 2-hydroxyethyl methacrylate) $M_w = 300\,000$ g/mol into dimethylformamide (1 wt %) and PS (polystyrene) $M_w = 50\,000$ g/mol into toluene (0.5 wt %) (L. Shen et al. 2012). Each polymer solution was deposited onto muscovite surface (here referred as Mica), a hydrated phyllosilicate mineral of aluminum and potassium with formula $\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH},\text{F})_2$, a diameter of 1.2 cm diameter with a surface area of 1.13 cm^2 , and spin-coated (Laurell Technologies Corporation, Lansdale, PA, USA) to 3 000 rpm for 60 s. The polymer-coated surface was left to dry for 24 h at room temperature (RT).

2.3.3 Surface Induced Aggregation

Corilagin ($M_w = 634.45$ g/mol) was purchased from Sigma-Aldrich and solubilized in filtered Milli-Q water (0.1 μm) to prepare a stock solution of 1 mM which was subsequently diluted and added to monomerized IAPP at 1 μM and 10 μM in filtered Milli-Q pure water at a ratio of 1:40 (IAPP:corilagin respectively). 35 μL of the prepared solution was deposited onto polymer-coated mica placed inside 3 cm petri dish. To ensure controlled incubation conditions, a sponge and double-sided tape were used to adjust the height of the mica within the petri dish. A moat around the mica minimized evaporation during the 72 h incubation at RT. After the incubation period, the sample was gently rinsed twice with filtered Milli-Q water. Excess water was absorbed by Whatman filter paper.

2.3.4 Bulk Aggregation

As a comparative condition, bulk solution of IAPP were prepared simultaneously with the surface induced aggregation assays. Monomerized IAPP (1 μM , 10 μM and 100 μM) were dissolved in filtered Milli-Q water in the presence of corilagin at the same molar ratios mentioned above. The solutions (600 μL) were incubated for 72 h at RT in 1.5 mL glass vials, specifically chosen to ensure an aggregation condition by minimizing surface contact, in comparison to conventional polymer-based plastic tubes.

2.3.5 Atomic Force Microscopy

After allowing the prepared samples to dry for 24 h, topography images were obtained by AFM microscopy using a Bruker Multimode 8 AFM in ScanAsyst mode with a silicon tip (2 - 12 nm tip radius, 0.4 N/m force constant) on a silicon nitride (Si_3N_4) cantilever. Fibrils and corilagin surface images were treated by Gwyddion software.

2.3.6 Photo-induced Force Microscopy

Bare Mica, Mica coated with PEG, pHEMA, and PS were examined by Photo-induced Force Microscopy (PiFM) to validate homogeneity and uniform polymer coverage. Averaged mid-infrared spectra enabled chemical identification of the polymer surfaces. IAPP fibril assembly on each surface at either 1 μM or 10 μM IAPP aqueous salt-free solutions were mapped at the amide II resonant mode, to selectively filter amyloid fibrils from other chemical surface features, such as other forms of protein assembly or polymer aggregates. Fibril formation inhibitory effects of the polyphenol corilagin were studied at the surface level on Mica, Mica-PEG and Mica-PS at 1 μM and 10 μM IAPP loading co-incubated with corilagin at a 1:40 ratio (i.e., 40 μM and 400 μM , respectively), using PiFM to selectively screen for fibrils. To better understand the inhibitory effects, these surfaces were spectroscopically and topographically examined using the PiFM after exposure to 40 μM and 400 μM corilagin solutions in the absence of IAPP, noting surface-dependent topographical features and semi-quantitative spectral intensity trends in comparison to the bare surfaces. All measurements were conducted in sideband mode with PtIr coated cantilevered probes (Nanosensors) with a tip radius of curvature of ~ 20 nm loaded on the VistaScope (MolecularVista) AFM-PiFM head (M. Jafari et al. 2023). The dither piezo was set at 1 nm and the tip-sample distance was at 85% setpoint. Spectra were acquired at 5% laser power for a baselined profile of the quantum cascade laser (QCL) source spanning the 770 - 1910 cm^{-1} mid-infrared range of the electromagnetic spectrum, as in previous work (M. Jafari et al. 2024). PiFM intensity mapping was conducted at 20 % laser power for greater signal-to-noise image contrast. All scans were collected at 1 line/s with an image size of 256 x 256 pixels².

2.3.7 Circular Dichroism Spectroscopy

IAPP solutions (100 μM , 10 μM and 1 μM) prepared in glass vials were used to monitor the secondary structure of the peptide immediately after solubilization and after 72 h incubation under quiescent conditions. Samples were placed in a quartz cell with 2 mm pathlength for more concentrated solutions (100 μM and 10 μM) and 1 cm pathlength for 1 μM solutions. Measurements were conducted using a J-815 CD spectropolarimeter (JASCO). The far UV-CD spectra ranging from 190 - 260 nm were recorded at 25°C.

2.3.8 Thioflavin T (ThT) Fluorescence

Monomerized IAPP solutions (100 μM , 10 μM and 1 μM) were incubated in filtered Milli-Q water at room temperature under quiescent conditions. After 72 h, ThT (40 μM) was added and fluorescence intensity was measured. Fluorescence emission was monitored from 465 to 565 nm emission at Room Temperature with excitation at 440 nm.

2.3.9 Transmission Electron Microscopy

Prepared samples of IAPP solution (100 μM , 10 μM and 1 μM) were deposited onto glow-discharged carbon-coated grids. Negative staining was performed using 1.5 % uranyl formate and examined using FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin microscope at 120 kV detected with an 4k CCD Camera System Model 895.

2.3.10 Goniometer

The surface hydrophobicity of the polymers was measured using a contact angle goniometer (OSSILA). A droplet of pure Milli-Q water was deposited on the polymer-coated mica surface using a micro-syringe at RT. Images of the droplet shape were captured with the camera, and the precise contact angle was measured manually using Ossila contact angle software.

2.3.11 Statistical Tests

Fibril widths and heights measured from IAPP on Mica, Mica-PEG, Mica-pHEMA, and Mica-PS were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) tests to assess potential differences. From high-resolution AFM or PiFM images, n line traces measured fibril widths and heights on Mica ($n = 265$; $n = 202$), Mica-PEG ($n = 268$; $n = 164$), Mica-pHEMA ($n = 259$; $n = 155$), and Mica-PS ($n = 271$; $n = 167$), respectively. Simulated datasets were generated assuming normal distributions for each group using the calculated means and standard deviations from a population of individual fibril measurements. Tukey's honest significant difference (HSD) post hoc test was performed to determine pairwise differences between the dimensions of fibrils grown on each surface.

2.4 Results and Discussion

2.4.1 Selection and Preparation of Surfaces

A range of model surfaces with varying degrees of hydrophilicity and /or hydrophobicity were selected and prepared by coating the 1.13 cm² Mica surface with PEG, pHEMA and PS using the spin coating technique described in the methods section. These surfaces were topographically and physicochemically characterized to gain in-depth insights of the surface morphology, chemical distribution, film thickness, and hydrophilicity (Figure 2.1). With AFM, it was found that Mica, Mica-PEG, and Mica-pHEMA had the smoothest surfaces with RMS roughness less or equal to noise (0.15 nm, 0.12 nm, and 0.22 nm, respectively) (Figure 2.1.A). Mica-PS had slightly more variable height asperities with a measured RMS roughness of 0.94 nm.

PiFM mid-infrared spatially resolved spectra were recorded to chemically identify the polymer coverage (Figure 2.1.B). Bare Mica provided the control substrate spectrum, prominently displaying the siloxane (Si-O) stretching mode in the 975 - 1100 cm⁻¹ window, which was also visible on all coated surfaces (F.Friedrich et al.2007). On Mica-PEG, a unique peak was observed at ~1150 cm⁻¹ assigned to the $\delta(-CH_2-)$ deformation, in addition to a generalized increase of the spectrum intensity from 1200 cm⁻¹ onward from various ether (C-O-C) modes (M.Rozenberg et al. 1998). Other notable peaks, such as the $\nu(-C-C-)$ and $\nu(C-OH)$ at ~1030 and ~1068 cm⁻¹,

respectively, were enclosed within the substrate siloxane signal and were not readily observable. The Mica-pHEMA surface had a considerably strong carbonyl ester signal at $\sim 1700 - 1750 \text{ cm}^{-1}$ and weakly broad peaks from $\sim 1150 - 1600 \text{ cm}^{-1}$, among the CH_2 twisting/rocking and the $\delta(\text{CH}_2)$ deformations (T.S. Perova et al.1997). On the Mica-PS surface, three peaks at 1460 cm^{-1} , 1505 cm^{-1} , and 1602 cm^{-1} identified, corresponding to $\nu_{11} + \nu_{10A}$, $\nu_4 + \nu_{17A}$, and ν_{9B} , IR-active benzene ring-modes of polystyrene (C.Y.Liang et al.1958). On each sample, PiFM intensity maps were imaged by targeting a functional group signal specific to either Mica, PEG, pHEMA or PS. All samples showed identical, confluent and uniform signals, deducing that the surfaces were homogenously coated (Figure 2.1. A) (M.Jafari al. 2025)

AFM tip-scratching the surface of each coating enabled film-thickness quantification (Figure 2.1.C). Scratching the Mica surface did not produce a step-height, instead caused line-shaped aberrations of the surface given the absence of a coating agent. Scratching Mica-pHEMA and Mica-PS revealed thicknesses of $19.2 \pm 0.4 \text{ nm}$ and $55.0 \pm 1.1 \text{ nm}$ respectively. Interestingly, scratching the Mica-PEG sample caused a regular and uniform increase in step-height. The PEG surface subject to local tip-protrusions caused a conformational shift of the polymer, switching it from its most stable interaction with Mica $\nu(\text{C-O-C})_{\text{gauche}}$ to an alternate less favorable form $\nu(\text{C-O-C})_{\text{anti}}$ (R.Gaudreault al. 2006). The resulting repulsion was the cause of the unexpected and regular increase in step-height observed after scratching. Because of the mechanical reactivity and thinness of the PEG film, AFM tip-scratching could not provide an exact film thickness measurement. However, based on the mechanical reactivity of the PEG layer and the absence of a reliable step-height after scratching, AFM observations suggest that the PEG film on mica is thinner than the PS and pHEMA coatings.

Finally, water contact-angle (WCA) measurements supported the coating of each polymer surface by wettability tests (Figure 2.1.D). A static water contact angle $\theta < 90^\circ$ is considered hydrophilic, while hydrophobic surfaces yield $\theta \geq 90^\circ$ (V.Khatri et al. 2023, K.-Y. Law et al.2014). Control Mica was hydrophilic with $\theta = 26.7^\circ$. When coated with PEG, hydrophilicity increased to $\theta = 8.8^\circ$ and on the amphiphilic pHEMA coated Mica, θ reached 54.7° . The surface transitioned to hydrophobic when Mica was coated with PS ($\theta = 93.7^\circ$).

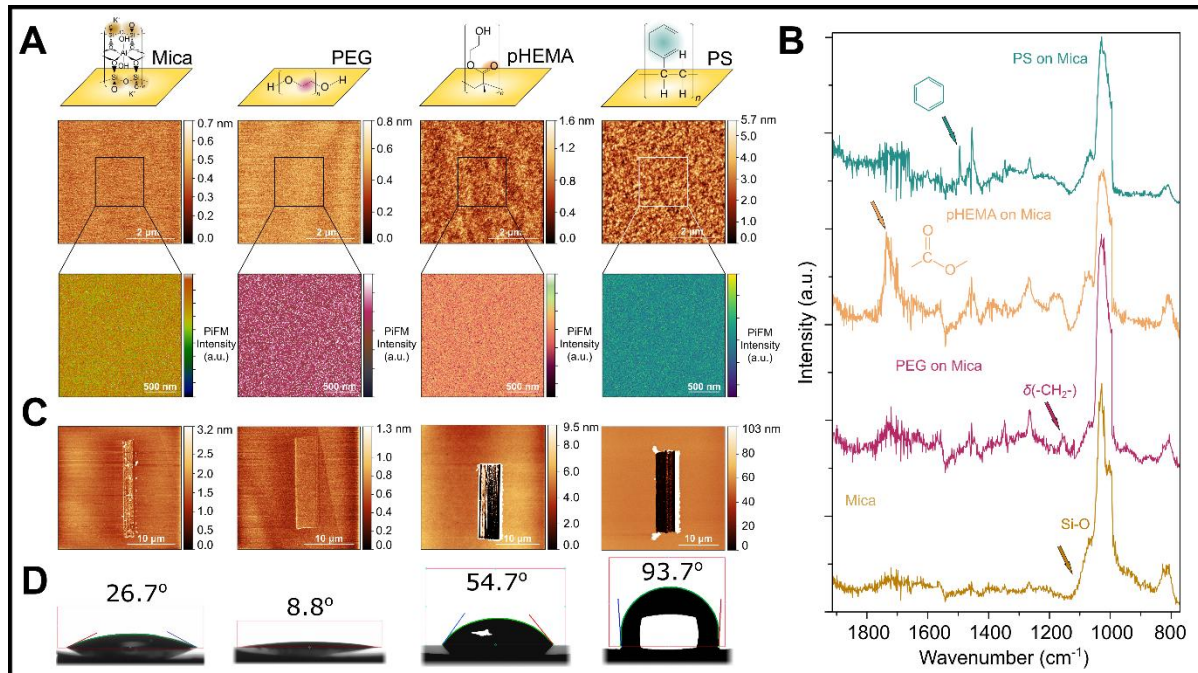


Figure 2.1 Topography and PiFM mapping of Mica, Mica-PEG, Mica-pHEMA and Mica-PS surfaces.

A sketch in inset shows the bond-line molecular structures of each surface highlighting the probed functional group by PiFM (A). PiFM mid-infrared spectra chemically sensed the different polymers on the surface. Arrows on the spectra point to the bands unique for each surface coating, chosen for the PiFM chemical mapping (B). AFM tip-scratch tests on each surface were done to measure the coating thickness (C). Contact angle measurements demonstrated the polymer effects on the hydrophilicity/hydrophobicity change of the Mica surface (D).

2.4.2 Surface-induced aggregation of IAPP

Before investigating surface-induced aggregation of IAPP, the range of IAPP concentration which would preclude IAPP aggregation in the bulk solution was determined. Thus, IAPP was incubated for 72 h in pure water at final concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M in glass vials with a volume minimizing surface contact. As anticipated, IAPP incubated at 100 μ M transitioned from a random coil conformation to a β -sheet-rich secondary structure, which is associated with an increase of ThT fluorescence, a dye whose fluorescence quantum yield increases upon binding to cross- β -sheet quaternary motif (M. Sebastiano et al. 2017) (Figure 2.2.A, B). The ThT fluorescence signal maxima at 1 μ M and 10 μ M IAPP are lower and slightly offset by that of 100 μ M. The local interaction sites between thioflavin and the protein binding sites are more

hydrophobic as fibrils form. At higher concentrations IAPP fibrillates and this increasingly hydrophobic environment causes a hypsochromic ThT fluorescence shift. (Singh et al. 2009). TEM observations showed that abundant fibril networks formed in the IAPP solution incubated at 100 μM (Figure 2.2.C). In contrast, at concentrations of 1 μM and 10 μM , the peptide remained in a random coil conformation after 72 h incubation, which was associated with the absence of fibrils on TEM grids, while ThT fluorescence intensities were conserved near control values (Figure 2.2.B, C). To assess the experimental context, we investigated the protein-to-surface ratio during incubation in bulk and on mica surfaces. 600 μL of 1 μM IAPP in a glass vial with a surface area of 3.46 cm^2 resulted in 6.78 mg/m^2 . Meanwhile, 35 μL of 1 μM IAPP on a 1.13 cm^2 Mica surface area is approximately equivalent to 1.21 mg/m^2 . The calculated dimensionless number considering the ratio of protein to available surface in bulk solution and on Mica surface ($6.778 \text{ mg}/\text{m}^2 / 1.2081 \text{ mg}/\text{m}^2$) suggested a 5.61-fold greater monomer to surface area ratio, respectively. Impressively however, a 72 h incubation at 1 μM and 10 μM IAPP did not facilitate fibrillation in bulk solutions, while fibrils were readily assembled on the surface of Mica. We thus devised a systematic and reproducible method to exclusively grow surface-induced IAPP fibrils.

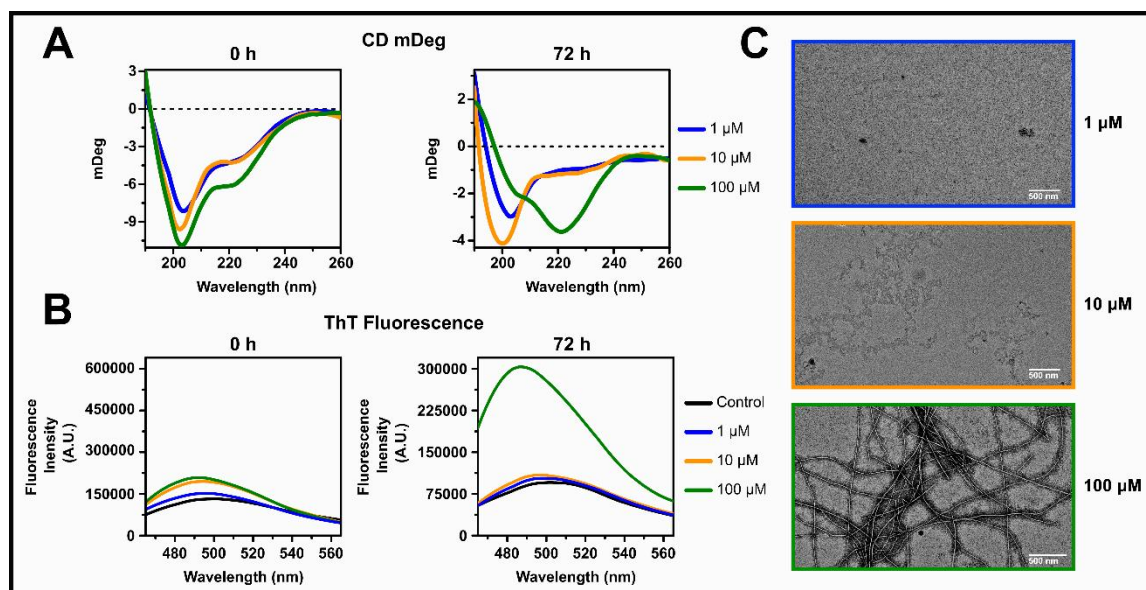


Figure 2.2 Bulk in-solution fibril assembly CD and ThT assays at 0 h and at 72 h incubation.

IAPP fibrillation occurs neither at 1 μM nor at 10 μM (A-B) in salt-free aqueous IAPP solutions. TEM images of 72 h IAPP incubated extraction-washes from bulk solution corroborated the absence of fibrils at 1 μM and 10 μM (C). However, at a sufficiently high concentration of 100 μM , β -sheet secondary structures were apparent at ~ 220 nm on the CD spectra after 72 h incubation and a marked increase in ThT fluorescence was validated by the presence of fibrils in bulk solution.

At a concentration of 1 μM IAPP, fibrils were observed on all surfaces. However, their morphologies showed substantial differences (Figure 2.3.A). The PiFM mid-infrared spectra of the IAPP fibrils contained the amide I and amide II peaks (Figure 2.3.C). The amide II band was used to screen for amyloid fibrils in all PiFM measurements hereafter. On Mica, fibril metrology measured consistent dimensions averaging at 19.8 ± 4.8 nm (width) and 2.46 ± 0.77 nm (height), while their lengths spanned up to several micrometers (Figure 2.3.A and Figure 2.6). Compared to the fibrils grown on bare Mica, topography images on PEG showed that they were surrounded by aggregated features. These ubiquitous aggregates presented peptide signals on the PiFM spectra and caused a decrease in the image contrast between the fibrils and the PEG surface. The fibril dimensions were of the same order as those seen on the Mica surface measuring 23.9 ± 5.8 nm (width) and 4.76 ± 1.53 nm (height) and were also in order of micrometer lengths. On the other hand, the fibrils assembled on pHEMA were even more surrounded by aggregated features, but these features were not proteinaceous, thus the image contrast between the fibrils and the pHEMA substrate remained as crisp as on Mica. On pHEMA, the fibrils appeared more curled than linear compared to those on Mica and PEG. Interestingly, because pHEMA and IAPP

fibrils had sufficiently segregated unique signatures (i.e. the carbonyl and the amide II bands, respectively), it was possible to precisely differentiate between 3 chemical entities concurrently on the same topography frame: IAPP fibrils, pHEMA polymer and Mica surface (Figure 2.7). Surprisingly, IAPP fibrils grown on pHEMA caused ruptures and distortions of the coated surface. As a result, IAPP was found entangled and wrapped around by pHEMA, to the point of even exposing the Mica substrate in some locations. Instead of using topography images, fibrils were measured having 34.1 ± 6.9 nm widths using PiFM images specific to the amide II signals, which were thicker than those measured on Mica and PEG. Average fibril heights were measured at 3.32 ± 0.71 nm. On PS, IAPP fibrils were long, more linear, and their dimensions were consistent with previous surfaces, measuring 27.0 ± 5.0 nm (width) and 3.38 ± 0.75 nm (height). This surface also presented partially formed fibril fragments.

Surface incubation with 10 μ M IAPP returned ubiquitous amyloid fibrils found stacked in multilayer format on Mica, Mica-PEG, and Mica-PS (Figure 2.3.B). The same experiments repeated in bulk solution at 10 μ M IAPP maintained that the monomer concentration was still below necessary to form fibrils in solution (Figure 2.2). Screening for the amide II band sharply overlaid the fibrous amyloid structures with the PiFM intensity maps. The thickness of the amyloid fibril carpet was measured by AFM tip-scratching. A thickness of 61.9 ± 1.2 nm was measured, signifying a ~ 25 layers of IAPP fibrils (Figure 2.8). The Mica-pHEMA surface exhibited an outlier behavior, as the IAPP fibrils were not individually separable. The topography showed a continuously entangled structure. However, the PiFM amide II screening was able to identify fibril assemblies within these agglomerations, mixed of both pHEMA and IAPP. As observed at lower concentrations, IAPP tended to disrupt the surface and mixed itself within the polymer. For this reason, we opted to exclude the Mica-pHEMA surface from further experiments in this work. It was obvious and noteworthy that the PiFM spectra showed a quantitative gradual increase in protein band intensities as the quantity of fibrils deposited was successively increased (Figure 2.3.C).

2.4.3 Surface Effects on Fibril Morphology

Detailed metrological analyses pointed towards differing fibril morphologies depending on the surfaces. Using AFM, individual fibril widths and heights were closely examined and statistically compared between Mica, Mica-PEG, Mica-pHEMA, and Mica-PS surfaces (Figure 2.6). Fibril widths were significantly different from one-another on each surface, ordered according to: Mica < Mica-PEG < Mica-pHEMA < Mica-PS. The more hydrophobic surfaces of pHEMA and PS

effected thicker and more mature fibril growth, compared to the hydrophilic surfaces of Mica and PEG, which agrees with previous literature reports (H.Kong et al.2022 and B.Yang et al.2018). On the other hand, fibril heights also showed differences between Mica and Mica-PEG, whereas Mica-pHEMA \approx Mica-PS produced fibrils of similar heights. This observation supports that the favorable surface hydrophobic fibril growth effects are attenuated as a function of distance from the surface. Both widths and heights support that the hydrophobic surfaces better promote mature fibril assemblies than hydrophilic surfaces. Noteworthy, these results demonstrated that we successfully achieved a systematic method to produce authentic on-surface induced amyloid fibrils, on inorganic and polymeric films of variable physicochemical properties. In the subsequent sections, we examined the suppressing effects of a known polyphenol on these surface-induced fibrils.

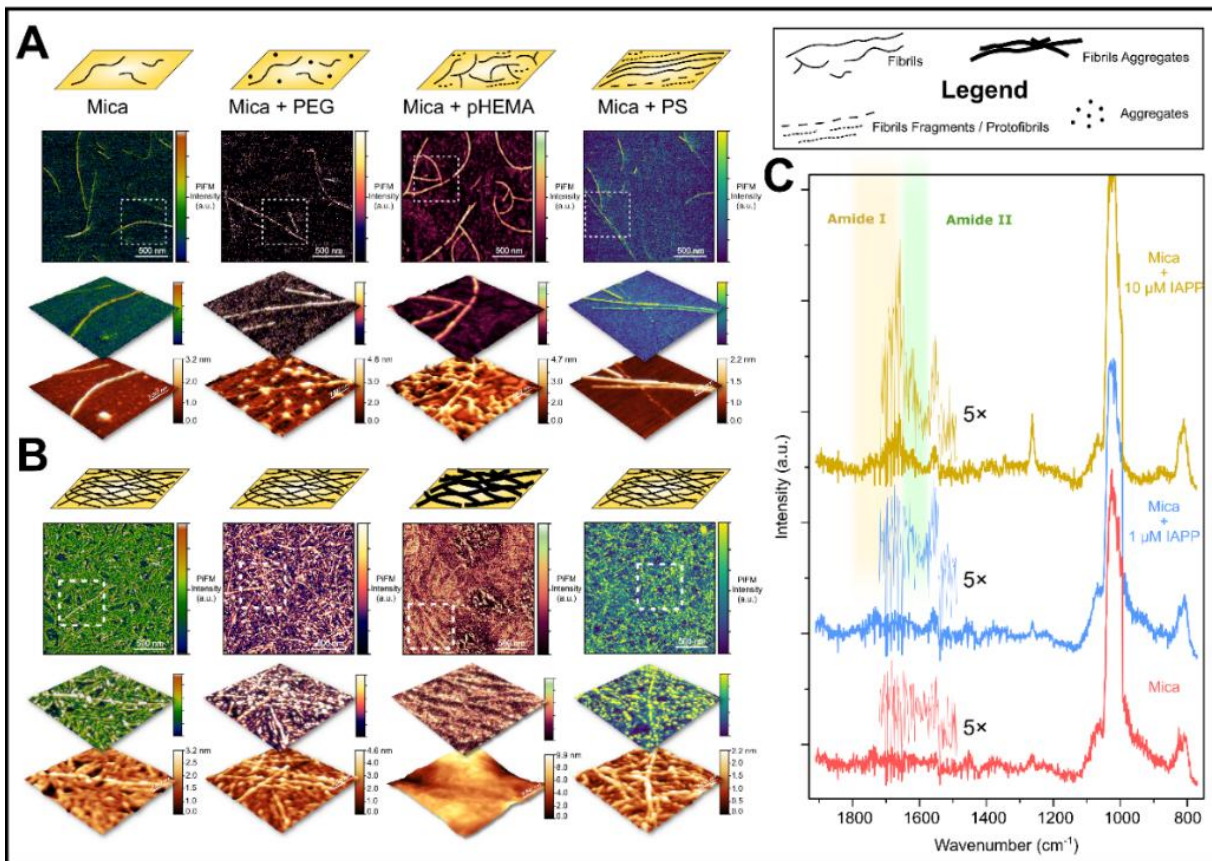


Figure 2.3 PiFM chemical mapping images at the amide II band of surface-induced fibril formations from 1 μM (A) and 10 μM (B).

IAPP salt-free aqueous solutions on Mica, Mica-PEG, Mica-pHEMA, and Mica-PS. Magnified areas are boxed in dashes and are represented in perspective view of overlaid topography and PiFM. Insets present a generalized depiction of each surface content of protein aggregate and fibril morphology. Except for the 10 μM IAPP on pHEMA, all surfaces showed individual fibril formation. PiFM mid-infrared spectra captured from Mica at different IAPP loadings illustrated an increasing trend of the amide I and amide II band intensification, proportional to the loading concentrations (C).

2.4.4 Effect of Corilagin on Surface-induced IAPP Fibrillogenesis

Corilagin ($C_{27}H_{24}O_{18}$) is a hydrolysable gallotannin with a molecular weight of 634.45 g/mol. Its structure consists of a central glucose ring with three galloyl moieties and nine phenolic OHs. Although corilagin has been recently studied in bulk solution as a protein aggregation inhibitor of IAPP (J.Khalifa et al.2025), its surface-level inhibitory properties have not been investigated so far. In this work, we surface-incubated IAPP with corilagin at a 1:40 ratio to verify the inhibitory effects. Surprisingly, corilagin's surface-grown fibril assembling effects were unequivocal on each surface (Figure 2.4).

In contrast to the findings of a bulk inhibition study (J.Khalifa et al.2025), corilagin exhibited minimal fibril prevention properties on the surface of Mica, irrespective of the dilution or concentration of monomer used. Mature fibrils were observed on the Mica surface after incubation with 1 μ M IAPP monomer (Figure 2.4.A), and a thick deposition of 38.8 ± 0.8 nm (\sim 16 layers) was measured on the Mica surface incubated with 10 μ M IAPP and 400 μ M corilagin (Figure 2.4.B and Figure 2.8). On Mica-PEG, some areas contained protofibrillar aggregates at lower concentrations of IAPP (1 μ M) and corilagin (40 μ M), whereas at higher concentrations of IAPP (10 μ M) and corilagin (400 μ M), fibril structures vanished. Conversely, prevalent aggregates were observed as high-intensity dots in the PiFM mapping images. On Mica-PS surfaces, corilagin prevented IAPP fibril assembly at low (1 μ M IAPP:40 μ M corilagin) and high (10 μ M IAPP: 400 μ M corilagin) peptide concentrations (Figure 2.4.B).

These results were conducive to claim that corilagin's fibril formation prevention capability significantly differs between bulk-solution and in on-surface contexts. It was previously found that corilagin drastically hindered fibril assembling by targeting secondary nucleation, which is a process in protein aggregation where new amyloid fibrils form on existing ones, acting as a catalyst for autocatalytic amplification, in bulk-solution (J.Khalifa et al.2025). Nevertheless, this explanation is not transposable to surficial conditions because corilagin does not exert a systematic fibril inhibition trend. Rather, a surface-specific or surface-dependent model is better fit to explain the inhibition process and discrepancies. Thus, we propose that the extent of the interfacial interaction between corilagin and the substrate surface determines the extent of the fibril aggregation inhibition.

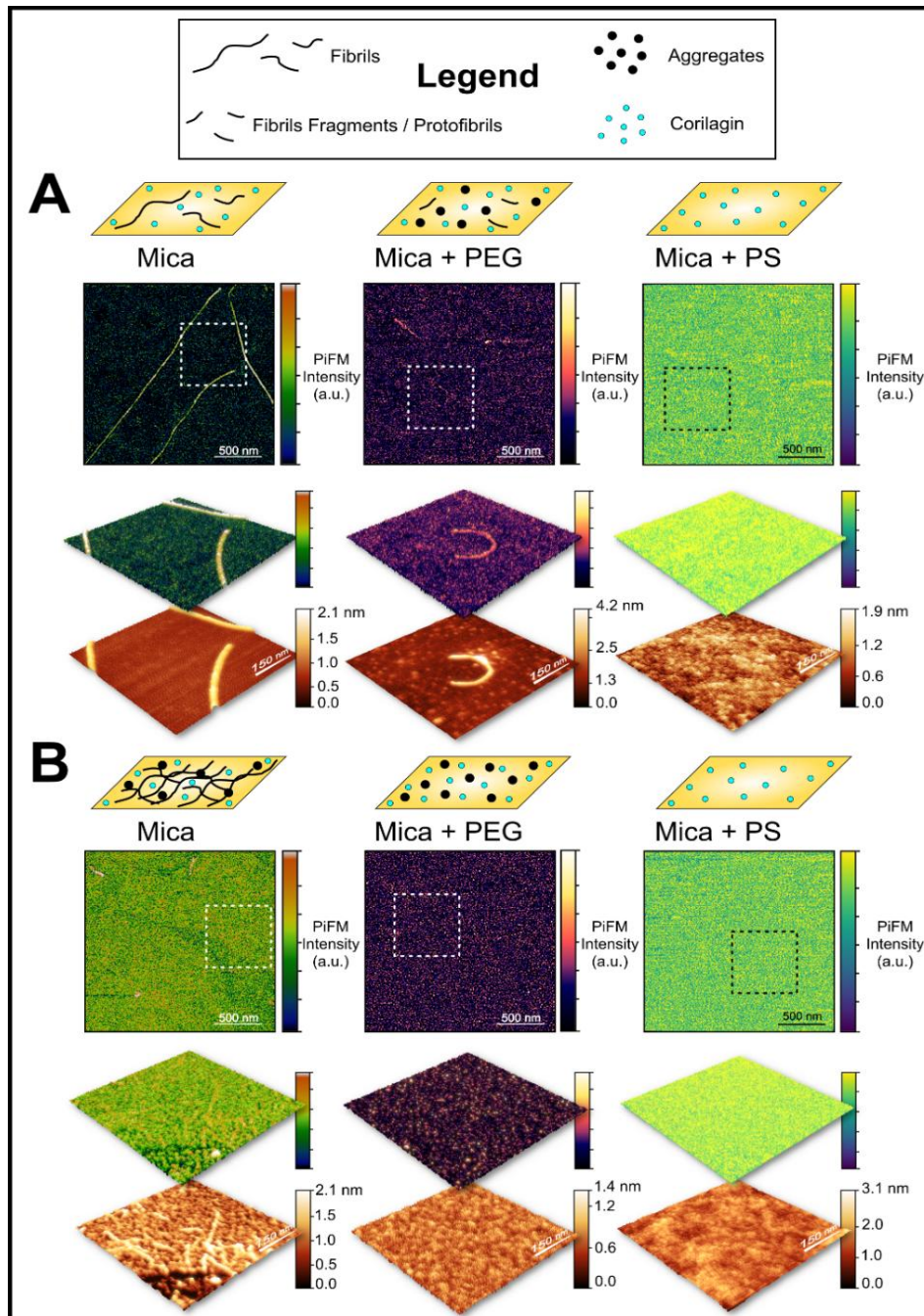


Figure 2.4 The inhibition effect of the polyphenol corilagin on IAPP surface-induced fibril assembly investigated by PiFM.

PiFM mapping showed the amide II band at 1 μM IAPP + 40 μM corilagin (**A**) and 10 μM IAPP + 400 μM corilagin (**B**) loadings on bare Mica, Mica-PEG, and Mica-PS. Areas of interest, shown as dashed boxes, were magnified to overlay perspective views of topography and PiFM for clear observation of the inhibitor's effect. In inset, representative sketches of the surface chemical content and featured morphologies are drawn.

2.4.5 Surface-Adsorption and Inhibition Mode of Action of Corilagin

Next, we expand on the interfacial affinity between corilagin and Mica, Mica-PEG or Mica-PS. Corilagin's surface-dependent inhibitory properties for IAPP fibril assembly prompted the possibility of a distinct substrate-corilagin surface interaction. Tunability of these key interactions on each coated substrate could plausibly explain the variability observed in the extent of fibril inhibition on each substrate (Figure 2.4). Mica, Mica-PEG, and Mica-PS were subjected to corilagin incubation at 40 μM and 400 μM , in the absence of IAPP (Figure 2.5). Optical characterization carried out by AFM pointed to unique topographical features on each substrate. On the Mica surface, sparse, irregular and polydisperse sized aggregates were noted (Figure 2.5.A). On the Mica-PEG surface, an apparently fluffy and light structured network was discovered interconnected as loops of a chain (Figure 2.5.B). On the Mica-PS surface, regular, monodisperse sized and uniform spherical nano-sized particles were systematically observed (Figure 2.5.C). Interestingly, these features were repeatable at both lower and higher concentrations of corilagin incubated (40 μM and 400 μM , respectively). On Mica and Mica-PEG, the features were more abundant at higher incubation concentrations. On Mica-PS, these nanospheres were also more abundant, but had shrunk in apparent diameters.

There are many hypotheses that can describe corilagin's mode of IAPP protein inhibition. For instance, corilagin can directly interact with the peptide through π - π stacking or π -alkyl, hydrogen bonding through its nine phenolic OHs, as well as van der Waals interactions, as we previously described (J.Khalifa et al. 2025). Within the context of the Mica-PEG system, an alternative hypothesis posits that corilagin initially interacts with the PEG surface, leading to a significant conformational transformation of the PEG upon adsorption onto Mica surfaces. This process leads to a reduction in PEG's entropy, resulting in a decrease in the number of PEG conformations available. Consequently, the diminished entropy of PEG-coated Mica could facilitate the interaction with corilagin. Gaudreault et al. 2005, showed that poly (ethylene oxide) (PEO) (>100 kDa molecular weight) having identical structure $-\text{[CH}_2\text{CH}_2\text{O]}_n-$ of PEG (<100 kDa), associates with corilagin only in the presence of salts, due to entropy effect. Here, we hypothesize that PEG-surface induces corilagin adsorption due to loss of entropy upon adsorption.

Topographical features recorded on each surface depicted a greater occupied surface-area at higher concentrations, as intuitively anticipated (Table 2.1). Noteworthy, the variations in surface occupancy were not as systematic on each substrate (Table 2.1 and Figure 2.9). On bare Mica, Mica-PEG, and Mica-PS the average surface-area coverage differences upon 40 μM vs 400 μM corilagin incubation were respectively 3.3 %, 5.2 %, and 19.6 %. PiFM was a turning point of this study as it chemically corroborated the identity of these surficial topographical features through mid-infrared spectroscopy, as being the organic molecule corilagin (Figure 2.5). The giveaway signals were the localized carbonyl ester bands at $\sim 1600 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ and the various broadband ether modes at $\sim 1200 - 1550 \text{ cm}^{-1}$. These signals were strictly absent and/or weaker on the bare control surfaces. In addition, the peaks inherent to corilagin were successively intensified when comparing the bare, 40 μM , and 400 μM incubated surfaces, confirming that they originated from the latter. On a side note, substrate peaks of PEG and PS were convoluted within the measured mid-infrared spectra, marking that PiFM was still sensing the underlying substrate molecules even after corilagin incubation. It should be stated that areas apparently free from corilagin aggregation on Mica-PEG and Mica-PS were also coated by the latter, but at molecular levels below the resolution of the AFM. Hence, PiFM recorded corilagin signals everywhere across the substrates.

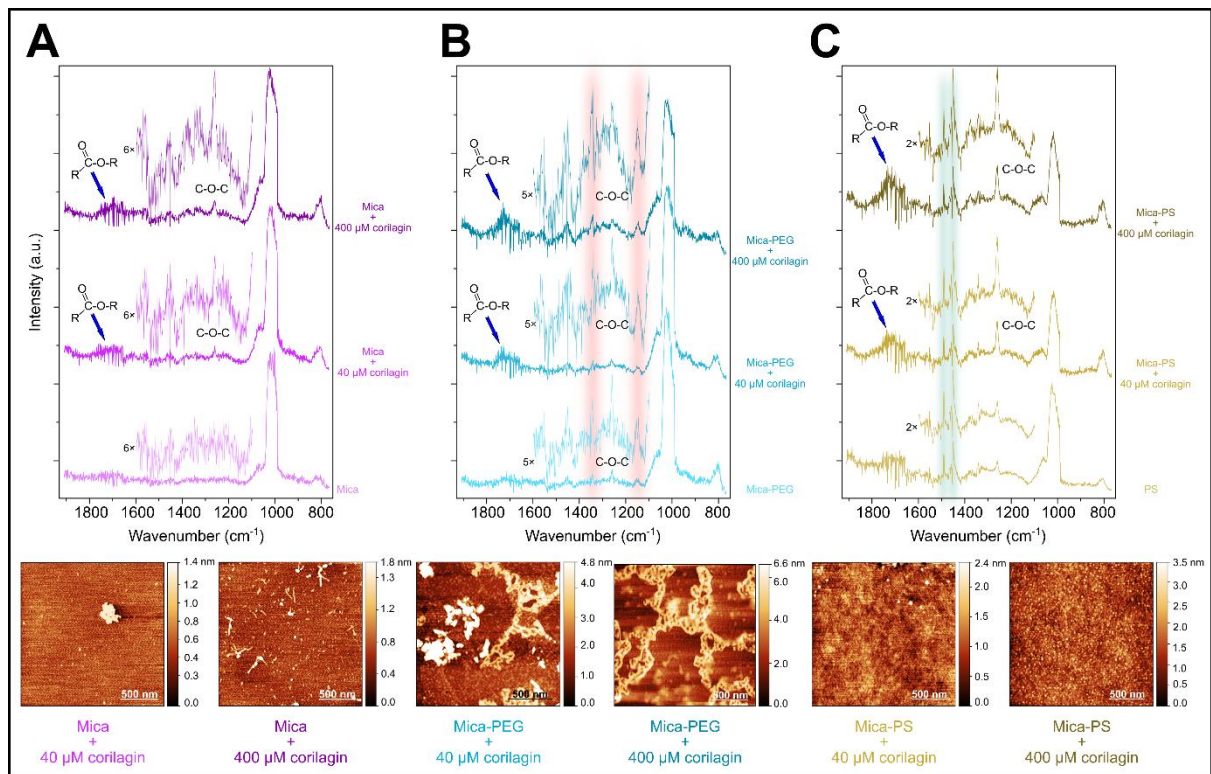


Figure 2.5 Surfaces were examined by PiFM mid-infrared spectroscopy after having added 40 μM and 400 μM of corilagin, in the absence of IAPP monomers.

Mica (**A**), Mica-PEG (**B**), and Mica-PS (**C**) surfaces were examined by PiFM mid-infrared spectroscopy after having added 40 μM and 400 μM of corilagin, in the absence of IAPP monomers. The peaks corresponding to PEG and PS, highlighted in red (**B**) and green (**C**) respectively, were retained even after the addition of 40 μM and 400 μM corilagin. Sparse and isolated topographical features were observed on Mica after addition of corilagin (**A**). On Mica-PEG, prominent chained, elongated and loosely aggregated structures could be noted after the addition of corilagin (**B**). On Mica-PS, corilagin assembled into compact nanospherical particles dispersed across the surface (**C**). The hydrophilicity (PEG)/hydrophobicity (PS) of the surface impacted corilagin's binding affinity and self-aggregating properties.

2.4.6 Correlating Surface Coverage and Fibril Inhibition

The nanometer scale surface coverage calculated by AFM correlated with the degree of IAPP fibril inhibition for Mica, Mica-PEG, and Mica-PS at higher polyphenol concentration (400 μM) (Figure 2.5 and Figure 2.9). Because corilagin occupied much of the surface, IAPP monomers were constrained on a cumbersome surface preventing assembly and proliferation. But at lower corilagin concentration (40 μM), the case of Mica-PEG was an intermediate inhibitor between bare Mica and Mica-PS, since protofibrils were found on the surface (Figure 2.4.A). On the surface of Mica-PEG, corilagin assemblies were observed occupying the largest areas at both low (40 μM) and high (400 μM) concentrations, respectively 22.4% and 27.6% (Figure 2.9). In contrast, no sign of fibril formation was spotted on the Mica-PS, with an apparent surface coverage of only 1.2%, a coverage substantially less than on Mica-PEG at lower corilagin incubation concentrations. On the bare Mica surface, corilagin's inhibitory effects were negligible, which agreed with the low coverage area at low and high concentrations (2.4 % and 5.7 %, respectively).

In summary, corilagin added to Mica-PS surface entirely inhibited fibril assembly, regardless of the concentration. As opposed to corilagin added to bare Mica surface, which had negligible inhibitory effects. A hybrid effect was recorded on Mica-PEG, where low concentrations of corilagin had an incomplete inhibition effect of IAPP fibril formation and high concentrations of corilagin completely inhibited fibril aggregates.

Following our interpretations of corilagin / surface interactions, corilagin's mode of action in inhibiting IAPP surface-induced fibril assembly became clearer. The corilagin nanostructural assemblies reflected the molecular level assembly several orders of magnitude below observable with AFM. Essentially, on bare Mica corilagin molecules did not effectively blanket the surface, whilst on Mica-PS corilagin spread and covered the surface before saturating sufficiently and aggregating as evenly dispersed AFM visible spherical nanoparticles. On Mica-PEG, an intermediate molecular chain-like coverage would extend into a robust network.

2.5 Conclusion

This study elucidated the influence of polyphenol on the surface-aggregation inhibitory properties, employing IAPP as a model amyloidogenic polypeptide. The IAPP/corilagin inhibitory system was inspired from our recent work in the context of bulk-induced aggregation mechanism. However, the herein study revealed that the mode-of-inhibition was not transposable from bulk- to surface-induced aggregation. For example, a 72 h incubation at 1 μ M and 10 μ M IAPP did not form aggregates in bulk solutions, while fibrils were readily formed on the surface of Mica. Notably, IAPP incubated at 100 μ M (above CAC) transitioned from a random coil conformation to a β -sheet-rich secondary structure, whereas at low IAPP concentrations (1 μ M and 10 μ M) aggregation does not occur in pure water. Then, we demonstrated that IAPP adsorbed and generated authentic surface-induced protofibrils, fibrils or spherical nanoscale particles, depending on the type of polymeric-coated surfaces. The surfaces represented variable degrees of hydrophilicity and hydrophobicity: (PEG (hydrophilic), pHEMA (amphiphilic), and PS (hydrophobic)). Our results disclosed that the physicochemical properties of polymer-coated surfaces, such as PEG, pHEMA and PS, significantly modulate IAPP aggregation and alter the inhibitory efficacy of corilagin. Using the PiFM nanometer localized imaging specificity, we proved that our engineered surfaces are uniform and homogeneous, and we individually observed and differentiated IAPP fibrils from monomers and surface polymer molecules. Furthermore, we established that surface physicochemical properties directly impact fibril morphology. When examining corilagin's surface-induced assembly on each surface-type separately, without IAPP, we noted that the PEG-surface induced corilagin adsorption was likely due to loss of entropy upon adsorption, while less adsorption was detected on bare Mica. Although there are limitations to this work, such as the unrelatable physiological of the surfaces used, the findings here are a critical demonstration for industrial biomanufacturing processes. Our work considers the impact on hydrophilic and hydrophobic surfaces in biological systems and industrial biomanufacturing processes by proposing pathways to modulate protein integrity and maintain intended functionalities.

2.6 Supporting information

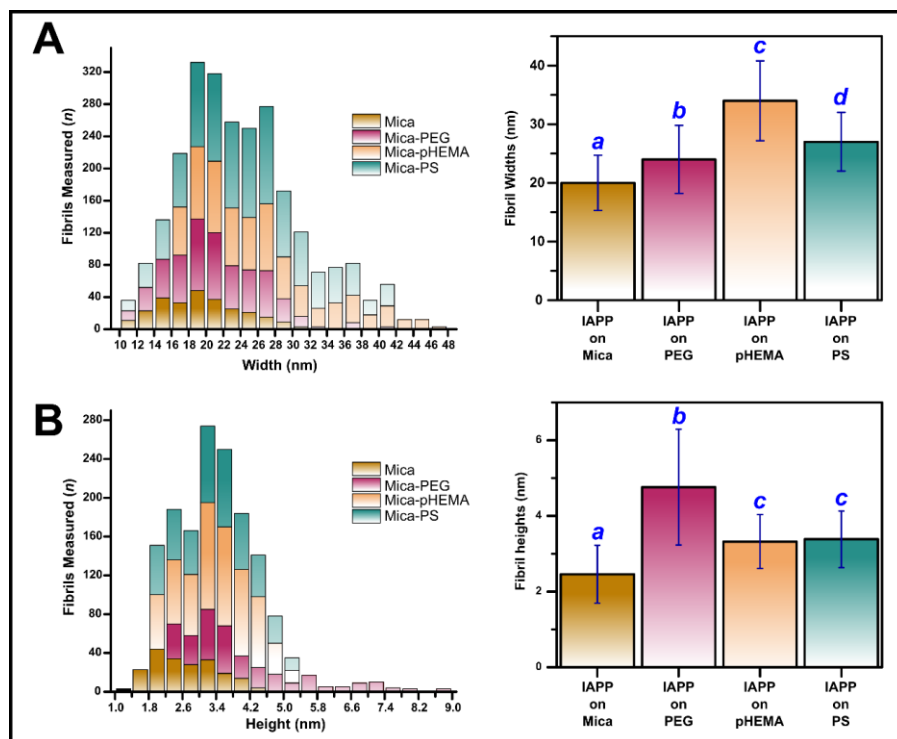


Figure 2.6 Individual surface-induced self-assembled 1 μ M IAPP fibrils on surface.

Mica, Mica-PEG, Mica-pHEMA, and Mica-PS AFM/PiFM images were used to measure average widths of 19.8 ± 4.8 nm ($n = 265$), 23.9 ± 5.8 nm ($n = 268$), 34.1 ± 6.9 nm ($n = 259$), and 27.0 ± 5.0 nm ($n = 271$) (A), and heights of 2.46 ± 0.77 nm ($n = 202$), 4.76 ± 1.53 nm ($n = 164$), 3.32 ± 0.71 nm ($n = 155$), and 3.38 ± 0.75 nm ($n = 167$) (B). The width and height ANOVA tests yielded F -statistics of 262.25 and 191.40, respectively, with p -values less than 0.001, indicating a statistical difference in fibril widths and heights among the groups. The analysis revealed statistically significant differences in fibril widths among all groups ($p < 0.05$ for all pairwise comparisons), indicating that each treatment group differed significantly from the others. Pairwise fibril height statistical comparisons indicated that all groups, except for IAPP on pHEMA and IAPP on PS, were statistically dissimilar ($p < 0.05$). Groups are denoted as *a*, *b*, *c*, and *d*. Statistically equivalent groups are labeled with the same letter.

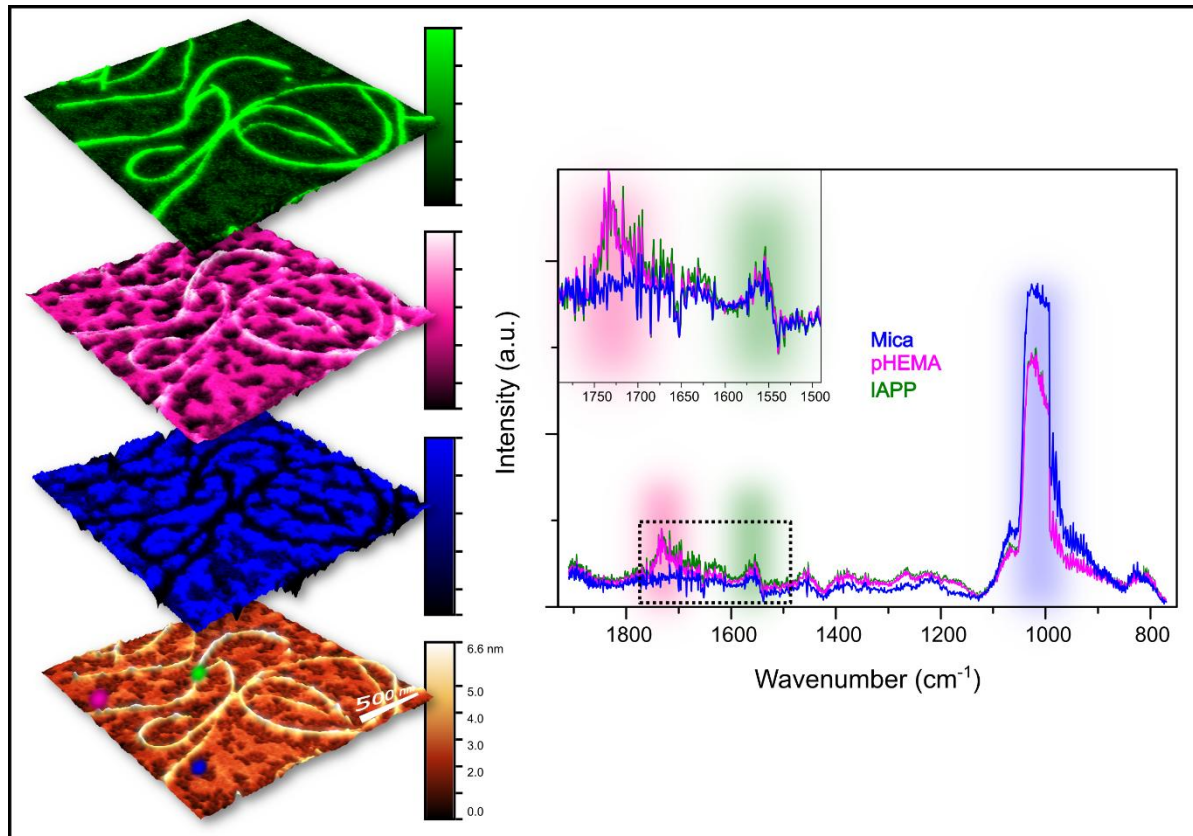


Figure 2.7 Chemical Segregation of IAPP, pHEMA and mica by PiFM from a single topography scan.

With PiFM, we were able to segregate three chemical entities from a single topography scan. Although the topography image showed various morphological features, PiFM isolated and corresponded the features to either IAPP (green), pHEMA (pink) or MICA (blue). The difficulty with pHEMA was caused by an apparent disruption and wrapping of the polymer around the IAPP fibrils, thus making the study on this surface subject to unpredictable variabilities. Because we found that IAPP fibril formation was entangling with and between the pHEMA coating, we opted to discard this surface from further experiments in this study.

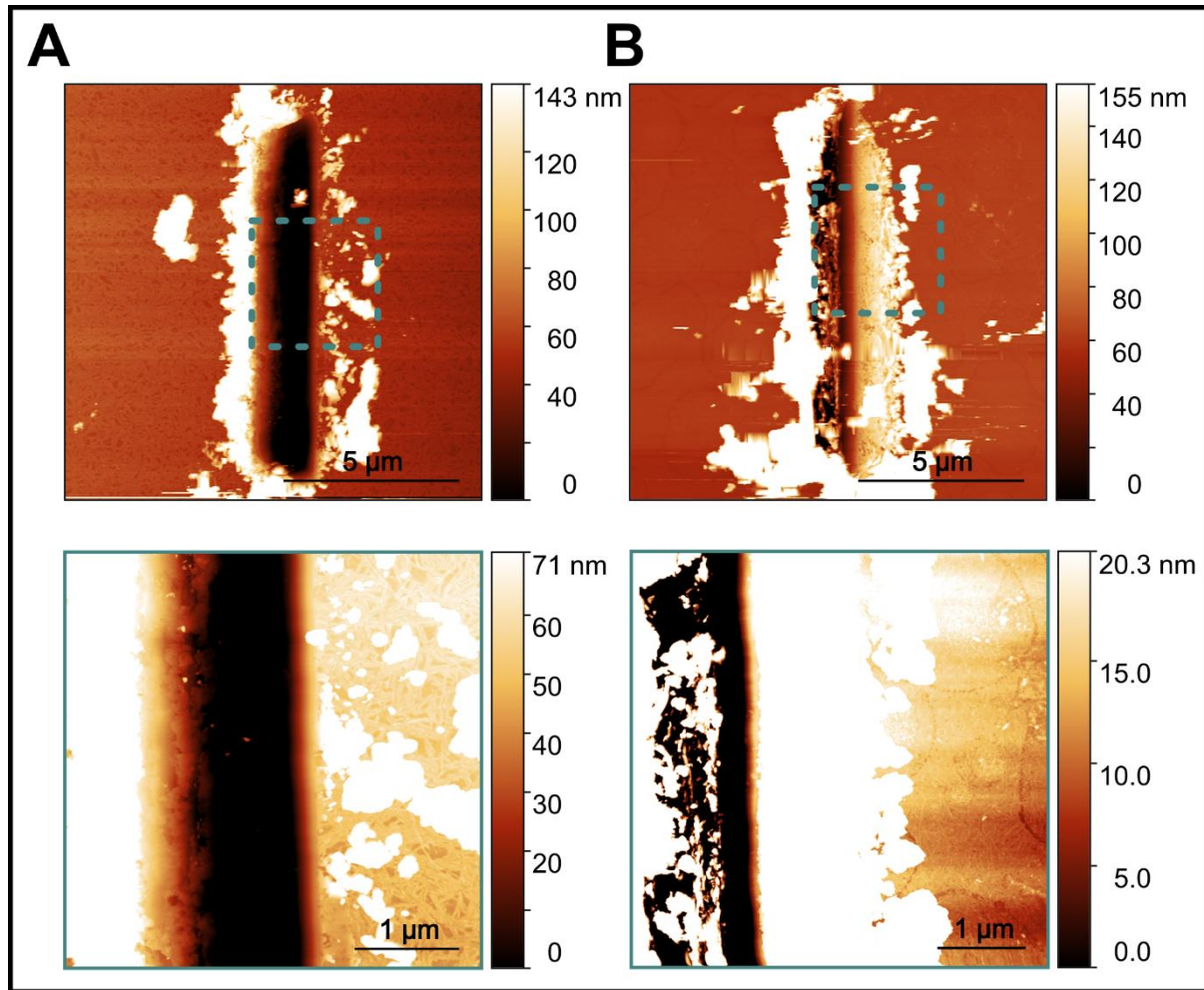


Figure 2.8 AFM tip-scratch measurements of multilayered IAPP fibrils on mica with and without corilagin.

AFM tip-scratch tests were done on the 10 μM IAPP loaded samples on bare Mica surface without (**A**) and with (**B**) the inclusion of 400 μM polyphenol corilagin during the 72 h incubation. In either condition, a thick fibril deposition of (61.9 ± 1.2 nm and 38.8 ± 0.8 nm, respectively) multi-layered surface-assembled IAPP was measured. This test showed that corilagin was unable to significantly interfere with the surface induced assembly of IAPP amyloid fibrils on the bare Mica surface.

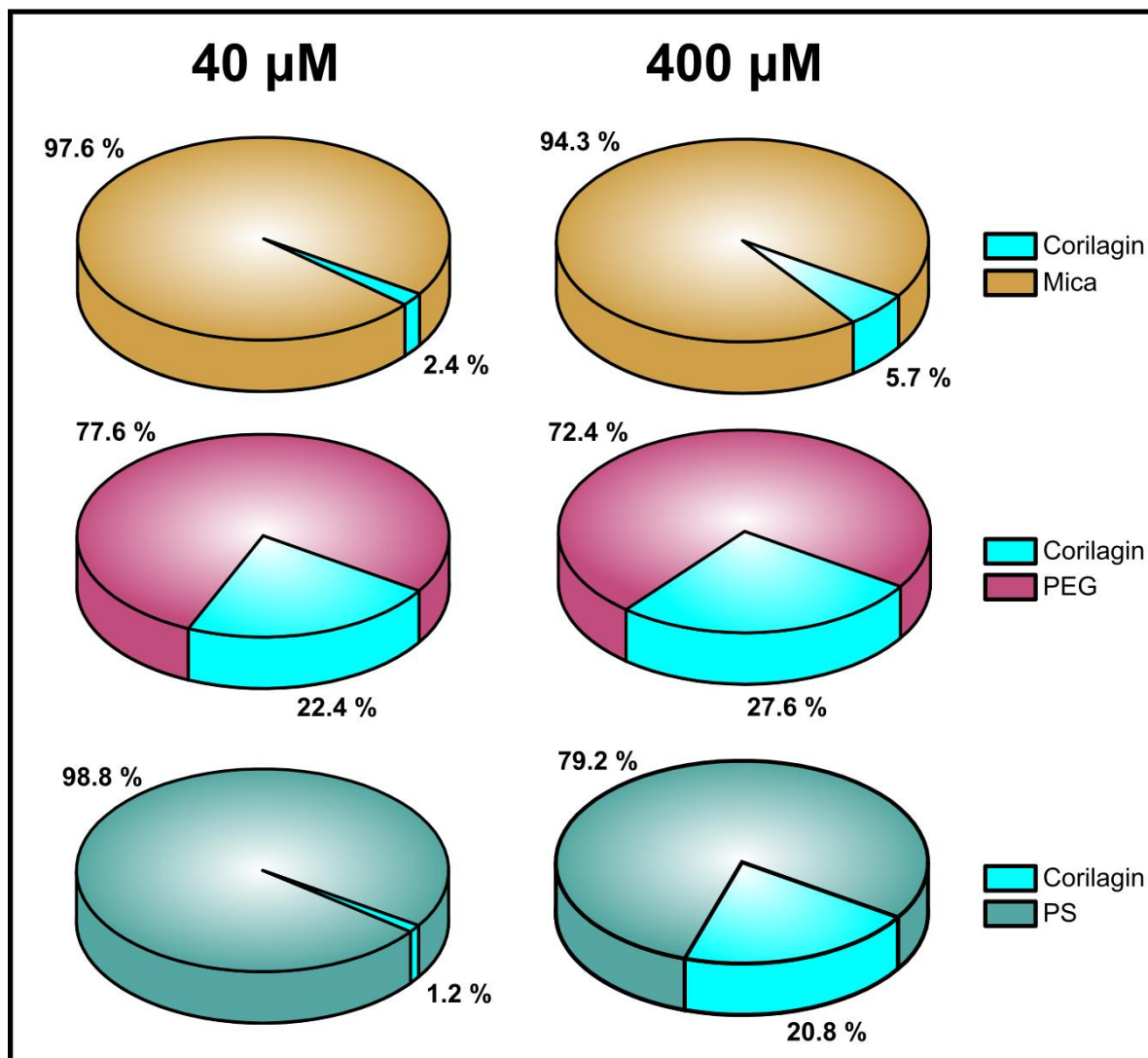


Figure 2.9 AFM based quantification of corilagin surface coverage on surfaces

AFM image statistics were used to calculate the surface coverage of 40 μM and 400 μM corilagin on Mica, Mica-PEG and Mica-PS after incubation, in the absence of IAPP monomers. Mica and Mica-PEG surfaces showed substantially less variations (3.3% and 5.2%, respectively) than Mica-PS surface (19.6%) accounting for the inhibitory effects on IAPP surface induced fibril assemblies.

Corilagin added				
Type of surfaces	Theoretical estimates		Calculated surface Area	
	40 μ M	400 μ M	40 μ M	400 μ M
Mica	7.5×10^{18} Molecules/m ² 1.2 mg/m ²	7.5×10^{19} Molecules/m ² 12.1 mg/m ²	2.4 % \pm 0.36	5.7 % \pm 1.38
PEG			22.4 % \pm 0.74	27.6 % \pm 1.06
PS			1.2 % \pm 0.49	20.8 % \pm 6.16

Tableau 2.1 Comparison of surface content by theoretical and calculated quantification of corilagin.

CHAPITRE 3 : DISCUSSION

3.1 Sélection et la préparation de surface

Le mica de surface $1,13 \text{ cm}^2$ a été choisi comme support solide pour sa surface lisse, ainsi que pour ses propriétés hydrophiles. Ce choix de support permet d'avoir un substrat chimiquement neutre et morphologiquement homogène, limitant l'influence du support sur les résultats observés. Afin de moduler le niveau d'hydrophobicité de la surface, trois polymères ont été déposés sur ce mica : PEG, pHEMA et PS suivis d'une enduction centrifuge (spin coating). Ces polymères ont été choisis pour la diversité de leurs propriétés chimiques permettant d'étudier un large spectre d'interactions surface-molécule, permettant une étude systématique de l'effet de la surface sur l'adsorption et l'organisation des films polymériques. PEG et pHEMA ont été choisis pour leur propriétés hydrophiles mais avec des profils chimiques distincts permettant d'évaluer l'impact de la chimie de surface sur le dépôt et l'organisation des films. PS a été sélectionné comme exemple de surface plus hydrophobe offrant un contraste suffisant pour comparer l'effet de l'hydrophobicité sur la morphologie des films polymériques. La caractérisation de ces surfaces a été effectuée par des techniques telles que AFM et PiFM, montrant que les couches de polymères présentaient une morphologie similaire d'un échantillon à l'autre. Ces observations indiquent que le procédé de dépôt par spin coating permet d'obtenir de manière fiable des films comparables sur le mica. Cette réplicabilité est essentielle pour analyser le fait que les différences observées par la suite sont principalement liées à la chimie de surface.

La figure 2.1.A met en évidence l'analyse topographique par AFM de mica seul, mica recouvert de PEG, pHEMA et PS présente des surfaces lisses avec des rugosités RMS respectivement de 0,15 nm, 0,12 nm et 0,22 nm, des valeurs comparables au bruit instrumental. Ces valeurs montrent que le dépôt des polymères n'altère pas significativement la topographie du mica, permettant d'écarter toute influence majeure de la rugosité dans l'analyse des résultats ultérieurs. La surface mica-PS présente une hauteur légèrement variable avec une rugosité RMS de 0,94 nm, expliquant la nature plus hydrophobe du PS. Cette valeur de la rugosité peut être associée à la rigidité des chaînes de PS et à leurs faibles interactions avec le support de mica. La composition chimique et la distribution spatiale des revêtements ont été étudiées par PiFM en infrarouge (Figure 2.1.B). Le mica seul sert de référence et présente un signal dominant associé au mode d'élongation siloxane (Si-O) dans la région $975\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$, (F.Friedrich et al.2007) également observable sur toutes les surfaces recouvertes. Sur la surface mica-PEG, un pic est observable autour de 1150 cm^{-1} attribué à la déformation δ ($-\text{CH}_2$) accompagné d'une augmentation de

l'intensité spectrale au-delà de 1200 cm^{-1} liée aux différents modes éther (C-O-C) (M.Rozenberg et al.1998). Les modes $\nu(\text{-C-C-})$ et $\nu(\text{-C-OH-})$ attendus respectivement (M.Rozenberg et al.1998) vers ~ 1030 et $\sim 1068\text{ cm}^{-1}$ sont masqués par le signal intense du (Si-O). Ce chevauchement spectral met en évidence la limite de la technique PiFM. Pour le mica-pHEMA, sur le spectre PiFM on peut observer le signal carbonyle ester entre 1700 et 1750 cm^{-1} , qui constitue la signature chimique caractéristique du polymère pHEMA. La présence nette de cette bande confirme que la fonctionnalisation chimique est conservée après le dépôt, indiquant une bonne stabilité du film polymérique. Pour le mica-PS, sur le spectre PiFM on peut observer trois pics définis à 1460 cm^{-1} , 1505 cm^{-1} et 1602 cm^{-1} attribués aux modes vibrationnels IR-actifs du noyau benzénique du PS (C.Y.Liang et al.1958). La cartographie d'intensité de PiFM (Figure 2.1.A) en ciblant des groupes fonctionnels spécifiques à chaque matériau montrent des signaux continus et uniformes, démontrant une couverture homogène de la couche de polymère sur le support mica. L'homogénéité observée constitue un point clé pour l'analyse des résultats car elle assure que les interactions détectées sont représentatives de la totalité de la surface plutôt que de régions ponctuelles. La Figure 2.1.C montre l'épaisseur des films du polymères mesurée par le grattage AFM, le mica seul ne révèle aucune augmentation de la hauteur mais seulement des traces linéaires liées à l'absence de couches déposées. En revanche, pour les surfaces mica-pHEMA et mica-PS, une épaisseur du film de $19,2 \pm 0,4\text{ nm}$ et $55,0 \pm 1,1\text{ nm}$ est observée respectivement. Cette différence d'épaisseur reflète les propriétés intrinsèques des polymères telles que la longueur des chaînes et leur affinité avec le substrat. Cependant sur le mica-PEG, une augmentation régulière et uniforme de la hauteur de la surface est observée plutôt qu'une diminution attendue. Ceci suggère par la réorganisation conformationnelle des chaînes de PEG sous l'effet des protrusions locales de la pointe AFM, plus spécifiquement l'interaction du PEG avec le mica passe d'une conformation favorable $\nu(\text{C-O-C})_{\text{gauche}}$ vers une conformation moins stable $\nu(\text{C-O-C})_{\text{anti}}$ (Gaudreault et al. 2006), induisant une répulsion responsable de l'augmentation de hauteur observée. En raison de cette faible épaisseur du film, une mesure précise de l'épaisseur du PEG n'est pas possible mais on peut conclure que le film de PEG est plus mince que ceux de pHEMA et PS. Enfin, les mesures d'angle de contact (Figure 2.1. D) confirment le niveau d'hydrophobicité de chaque polymère étudié, si l'angle de contact est $\theta < 90^\circ$ (V. Khatri et al. 2023, K.Y.Law et al. 2014) alors la surface est considérée étant hydrophile et si $\theta > 90^\circ$ (V. Khatri et al. 2023, K.Y.Law et al. 2014) alors la surface est hydrophobe. Ainsi, le mica avec un angle de contact de $26,7^\circ$, PEG ayant $8,8^\circ$, pHEMA ayant $54,7^\circ$ et PS avec un angle de contact $93,7^\circ$ montrant le caractère hydrophobe de ce dernier.

3.2 L'agrégation de l'IAPP induite par la surface

L'identification des conditions expérimentales dans lesquelles le peptide reste non agrégé en solution est essentielle avant l'étude de l'agrégation du peptide induite par la surface. Des expériences en conditions de solution ont été réalisées à l'aide des techniques telles que le dichroïsme circulaire (CD) (Figure 2.2.A) et la fluorescence de la thioflavine T (ThT) (Figure 2.2.B) afin de caractériser l'état conformationnel d'IAPP en solution. Le choix de l'IAPP s'explique pour son rôle physiologique dans le diabète de type 2 et de sa capacité bien établie à former des fibrilles *in vitro*. Le CD permet de caractériser la structure secondaire du peptide en solution et de distinguer une conformation désordonnée d'un état riche en feuillets β , associé à la formation d'agrégats amyloïdes. La ThT est une fluorescence dont le rendement quantique augmente lors de la liaison des feuillets β (Sebastiao M. et al.2017).

La figure 2.2 montre les expériences réalisées de l'IAPP en solution d'eau nanopure pour des concentrations de 1 μM , 10 μM et 100 μM . L'eau nanopure a été choisie afin d'éliminer toute influence d'ions, de tampons ou d'autres facteurs modifiant l'agrégation du peptide. Les concentrations utilisées (1 μM et 10 μM) correspondent à des conditions sous-critiques d'agrégation en solution, permettant d'étudier l'effet spécifique des surfaces sur l'agrégation sans qu'une auto-agrégation spontanée ne se produise. La concentration de 100 μM a été utilisé pour démontrer qu'en solution, l'IAPP peut former des fibrilles amyloïdes à des concentrations élevées. Pour les concentrations de 1 μM et 10 μM , l'IAPP conserve une conformation majoritairement désordonnée (random coils) après 72h d'incubation sans formation de fibrilles. Tandis qu'à une concentration de 100 μM d'IAPP, la transition vers une structure secondaire riche en feuillets β est observée, accompagnée d'une augmentation significative de la fluorescence ThT (Figure 2.2.B) et d'un réseau fibrillaires visibles en TEM (Figure 2.2.C). Ces observations montrent que l'agrégation de l'IAPP est fortement dépendante de la concentration locale, mettant en évidence l'existence de la concentration critique au-delà de laquelle les interactions peptidiques favorisent la formation de fibrilles amyloïdes. Ces résultats confirment que dans les conditions expérimentales étudiées en solution, les concentrations 1 μM et 10 μM constituent des concentrations sous-critiques pour l'agrégation spontanée d'IAPP. Cependant, lorsque l'IAPP est incubé à ces mêmes concentrations en présence de surfaces solides, l'observation que l'assemblage fibrillaire se produit exclusivement sur les surfaces de mica, malgré un rapport protéine/surface nettement plus faible sur les surfaces de mica que dans les incubations en

solution (6.778 mg/m² contre 1.2081 mg/m² respectivement), met en évidence le rôle crucial de la surface dans la modulation de la cinétique d'agrégation. Cette différence accentue que la surface agit comme un site de nucléation, augmentant localement la concentration effective d'IAPP et orientant les interactions peptidiques vers la formation de feuillet β . En outre, elle suggère que les interactions surface-peptide sont suffisamment fortes pour stabiliser des conformations partiellement ordonnées qui servent de noyaux précurseurs pour la formation des fibrilles. Ceci met en évidence l'impact de la surface dans la pathologie amyloïde et justifie l'étude de différents types de surfaces pour comprendre l'effet de l'hydrophobicité. En effet l'adsorption protéique sur des surfaces solides peut induire une agrégation même lorsque la protéine est présente à des concentrations sous-critiques en solution. Cela suggère que pour le stockage général des protéines, il est préférable d'utiliser la fiole à base de verre afin de limiter l'adsorption et réduire le risque d'agrégation de surface lors du stockage. Il est préférable d'éviter d'utiliser des contenants à base d'hydrophile comme le PEG ou polytétrafluoroéthylène qui peuvent favoriser une adsorption des protéines et induire localement une augmentation de concentration propice à l'agrégation.

3.3 L'effet de surface sur la morphologie des fibrilles

À la suite de la démonstration que l'agrégation de l'IAPP est plus efficace en surface qu'en solution, une étude sur la morphologie fibrillaire a été réalisée. Cette analyse comparative permet non seulement de confirmer le rôle de la surface comme site de nucléation mais aussi d'évaluer l'influence de la surface sur la structure et la stabilité des fibrilles amyloïdes.

Sur la figure 2.3, l'analyse topographique et la cartographie chimique de PiFM permettent de corréler la structure morphologique des fibrilles à leurs bandes chimiques amyloïdes. À une concentration de 1 μ M, des fibrilles sont observées sur l'ensemble des surfaces étudiées mais leurs morphologies varient en fonction de la nature chimique de la surface. Sur le mica seul, les fibrilles ont une croissance directionnelle, sont longues et linéaires. En effet, les fibrilles ont une dimension moyenne de $19,8 \pm 4,8$ nm de largeur et $2,46 \pm 0,77$ nm d'hauteur tandis que leurs longueurs pouvaient atteindre plusieurs μ m. (Figure 2.3.A et Figure 2.6). Le mica favorise une adsorption réversible des monomères d'IAPP favorisant une nucléation contrôlée. Cette morphologie linéaire suggère que le mica, favorise une adsorption réversible des monomères

d'IAPP permettant un alignement directionnel des fibrilles et une nucléation contrôlée. Également, la présence de fibrilles est confirmée par le spectre d'infrarouge (IR) de PiFM, où la présence des bandes amide I et amide II, confirme la nature amyloïde (Figure 2.3.C). Sur la surface recouverte du polymère PEG, les fibrilles présentent des dimensions similaires à celles observées sur le mica, soit $23,9 \pm 5,8$ nm de largeur et $4,76 \pm 1,53$ nm d'hauteur et les longueurs de l'ordre de grandeur de micromètre, mais les images topographiques montrent que les fibrilles sont entourées de nombreuses structures agrégées confirmant la nature amyloïde (Figure 2.3.C) sur le spectre d'IR de PiFM. Cette observation indique que le PEG favorise une accumulation locale d'IAPP à proximité des fibrilles, entraînant une densité plus élevée et une diminution du contraste topographique entre fibrilles et surface, ce qui suggère une interaction modérée entre le polymère et le peptide. Ensuite, la surface de pHEMA est visiblement distincte car les fibrilles sont plus courbées ($34,1 \pm 6,9$ nm de largeur et $3,32 \pm 0,71$ nm d'hauteur), contrairement à celles de mica et PEG. Les fibrilles présentes sur le pHEMA sont également entourées d'agrégats mais qui ne sont pas des entités protéiques. De plus, le polymère pHEMA et les fibrilles d'IAPP ont leur propre bande caractéristique dans l'IR comme le carbonyle et amide II respectivement. La possibilité de distinguer ces bandes séparées permet de mettre en évidence que l'interaction entre fibrilles et la surface polymérique peut induire des déformations locales du polymère, ce qui influence la morphologie des fibrilles. La séparation des signatures spectrales (bandes carbonyle et amide II respectivement) des fibrilles de pHEMA et d'IAPP a permis de différencier trois entités chimiques sur la même image topographique : les fibrilles d'IAPP, pHEMA et la surface de mica (figure 2.7). Cette analyse met en évidence que la croissance des fibrilles peut provoquer une perturbation mécanique et chimique des surfaces polymériques allant jusqu'à exposer localement le mica sous-jacent montrant que la surface participe activement à la structuration des agrégats. Ainsi, les fibrilles apparaissent enchevêtrées et enveloppées par le polymère pHEMA. Dans ce contexte, l'image topographique (Figure 2.3.B) seule est limitée pour l'interprétation morphologique, soulignant l'importance de combiner AFM et PiFM pour une analyse précise. Également à une concentration de $10 \mu\text{M}$, les fibrilles ne sont plus individualisables, bien que PiFM permette d'identifier la présence d'assemblage amyloïdes via la bande amide II mais la forte perturbation du film pHEMA ne permet pas de visualiser la morphologie sur la topographie, ainsi pour cette raison cette surface a été exclue de la suite de l'expérience. Puis, sur le PS, une surface hydrophobe, les fibrilles sont plus longues et linéaires avec des dimensions de $27,0 \pm 5,0$ nm de largeur et $3,38 \pm 0,75$ nm d'hauteur. Sur le PS, des fragments fibrillaires partiellement formés suggèrent que la cinétique d'assemblage des fibrilles est différente en raison d'une forte interaction entre les résidus hydrophobes d'IAPP et la surface du PS hautement hydrophobe.

Cette interaction pourrait stabiliser la coexistence de fibrilles mature et des fragments fibrillaires. À une concentration d'IAPP à 10 μM , l'agrégation induite par la surface devient plus prononcée. Des réseaux amyloïdes multicouches sont observés sur le mica, PEG et PS, tandis que les mêmes expériences réalisées avec des mêmes conditions ont été réalisés en solution confirment l'absence d'agrégation. Ces observations indiquent que la chimie et l'hydrophobicité de la surface modulent la densité, la longueur et l'empilement des fibrilles soulignant le rôle actif de la surface dans la structuration des agrégats amyloïdes.

Des analyses ont mis en évidence des différences marquées de morphologie des fibrilles en fonction de la nature de la surface. La mesure de l'épaisseur de ces tapis fibrillaires par grattage AFM soit $61,9 \pm 1,2$ nm (Figure 2.8) indique un empilement de nombreuses couches, ce qui suggère que la première couche de fibrilles formée à la surface agit comme un nouveau substrat favorisant la formation de réseaux fibrillaire, renforçant l'effet de surface au cours de la croissance fibrillaire (Figure 2.6). La longueur des fibrilles suit un ordre croissant mica < mica-PEG < mica-pHEMA < mica-PS, ce qui explique que les surfaces plus hydrophobes comme pHEMA et PS favorisent des fibrilles plus épaisses et matures probablement en raison d'interactions hydrophobes plus fortes qui stabilisent les feuilletts β (H.Kong et al.2022, B.Yang et al. 2018). Dans les expériences suivantes, l'effet inhibiteur d'un polyphénol a été caractérisé sur ces fibrilles amyloïdes induites par la surface. Cette approche permettra d'évaluer les interactions de la surface-IAPP-polyphénol afin de comprendre le rôle inhibiteur du polyphénol sur l'agrégation amyloïde.

3.4 L'effet de corilagine sur la fibrillogénèse de l'IAPP induite par la surface

La corilagine ($\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_{18}$) est un gallotannin hydrolysable de masse molaire 634,45 g/mol dont la structure repose sur un noyau glucidique central estérifié par trois unités galloyles et neuf fonctions phénoliques hydroxyles. Ces caractéristiques chimiques confèrent à la molécule un fort potentiel d'interactions non covalentes notamment par liaisons hydrogène et interactions π - π , connues pour inhiber l'agrégation amyloïde en solution en ciblant principalement la nucléation secondaire (Khalifa et al. 2025). Cependant, l'activité inhibitrice de la corilagine sur l'agrégation induite par la surface n'a jamais été investiguée jusqu'à présent. Le choix de corilagine s'explique par son profil favorable aux interactions avec IAPP et sa capacité démontrée à moduler l'assemblage fibrillaire en solution, ce qui permet d'étudier si ces mécanismes sont conservés ou modulés par la présence de surfaces polymériques de nature différente.

Sur la figure 2.4, l'IAPP a été incubée à la surface de mica recouverte de polymères en présence de la corilagine avec un ratio molaire de 1:40 (IAPP:corilagine) afin d'étudier l'efficacité inhibitrice de ce polyphénol dans des conditions d'agrégation induite par la surface. Ce ratio a été choisi sur la base d'études précédentes montrant que ce rapport permet une inhibition mesurable de la nucléation sans saturer le peptide en polyphénol ce qui assure que l'effet observé est lié aux interactions spécifiques peptide-corilagine plutôt qu'à un excès non physiologique du composé (Khalifa et al. 2025). Cette approche permet de comparer directement l'effet inhibiteur dans le contexte de l'agrégation en solution et l'agrégation induite par la surface, mettant en évidence le rôle synergique ou antagoniste de la surface sur l'efficacité du polyphénol. Des résultats obtenus (Figure 2.4) révèlent que l'effet de la corilagine a une forte dépendance vis-à-vis de la nature physicochimique de la surface, soulignant que les propriétés de la surface peuvent moduler l'adsorption du peptide. Ces résultats diffèrent des résultats obtenus en solution. Sur le mica, surface hydrophile et chargée, la corilagine n'empêche pas la formation de fibrilles amyloïdes, indépendamment de la concentration en monomères d'IAPP. À une concentration de 1 μM (IAPP) et 40 μM (corilagine), les fibrilles matures peuvent être observées (Figure 2.4.A) et à une concentration de 10 μM (IAPP) et 400 μM (corilagine) des fibrilles d'épaisseur de $38,8 \pm 0,8$ nm soit environ 16 couches sont visibles sur PiFM (Figure 2.4.B et Figure 2.8).

Cette inefficacité d'inhibition peut s'expliquer par la forte affinité du peptide pour la surface hydrophile du mica qui favorise une adsorption stable et un alignement directionnel des monomères empêchant la corilagine de perturber la nucléation primaire ou secondaire. Sur la surface de mica-PEG, à la concentration de 1 μM d'IAPP (Figure 2.4.A), on voit la présence d'agrégats protofibrillaires, indiquant que la corilagine perturbe partiellement la maturation fibrillaire. Elle semble interférer avec les feuilletts β retardant la transition vers des fibrilles matures mais sans empêcher complètement l'agrégation. Cette observation suggère une compétition dynamique entre l'adsorption peptide-surface et interactions peptide-corilagine. Tandis qu'à la concentration de 10 μM d'IAPP (Figure 2.4.B) il y a une absence de fibrilles combinée à la présence de signaux intenses observés sous l'image topographique de PiFM indiquant une accumulation de structures agrégées non fibrillaires. Cela montre que la corilagine peut réorienter l'assemblage des monomères vers des structures désordonnées en perturbant la fibrillation sur le PEG. Sur la surface hydrophobe Mica-PS, la corilagine a une efficacité inhibitrice marquée empêchant la formation des fibrilles d'IAPP à faibles (1 μM IAPP : 40 μM corilagine) et fortes (10 μM IAPP : 400 μM corilagine) (Figure 2.4.A, B). Cette inhibition pourrait résulter soit d'une compétition entre la corilagine et l'IAPP pour les sites d'interaction à la surface, soit d'une

modification de la surface limitant la stabilisation des noyaux amyloïdes. Ces résultats prouvent que l'effet inhibiteur de la corilagine diffère du milieu environnemental de la solution (Khalifa et al. 2025) versus sur la surface. En solution, la corilagine inhibe efficacement l'assemblage fibrillaire de l'IAPP en ciblant la nucléation secondaire (Khalifa et al. 2025) tandis que sur la surface, l'efficacité de la corilagine dépend de la nature physicochimique du substrat. Cette observation souligne l'importance de considérer l'interface peptide-surface lors de la conception d'inhibiteurs anti-amyloïdes.

3.5 Le mode d'action de la corilagine : adsorption de surface et inhibition

Pour une compréhension des effets inhibiteurs de la corilagine sur la formation des fibrilles à la surface, une étude sur l'affinité interfaciale entre la corilagine et le mica, le mica-PEG et le mica-PS a été réalisée (Figure 2.5). Cette approche permet d'étudier la cinétique et la morphologie directement impactées par la surface. Des expériences d'incubation de la corilagine seule, réalisées à 40 μM et 400 μM , ont révélé des comportements différents selon la surface. Sur la topographie de l'AFM (Figure 2.5), on voit que la morphologie de la corilagine diffère selon la surface. Sur le mica seul, la présence de structures irrégulières et fortement polydispersées suggère une adsorption faible et peu organisée de la corilagine (Figure 2.5.A) Tandis que sur la surface mica-PEG, il y a la présence d'un réseau, filamenteux et structuré en boucles interconnectées, indiquant une interaction plus étendue entre la molécule et le revêtement polymère (Figure 2.5.B). Ceci suggère que la corilagine se lie préférentiellement au PEG plutôt qu'à l'IAPP, ainsi la capacité de la corilagine à inhiber l'agrégation de l'IAPP sur PEG dépend de la modulation de la surface polymérique plutôt que d'une interaction directe peptide-inhibiteur. Sur le mica-PS, on voit des nanoparticules sphériques de taille homogène et distribuées de manière uniforme (Figure 2.5.C). Cette morphologie du peptide explique une affinité interfaciale forte de la corilagine avec les surfaces hydrophobes, favorisant un recouvrement efficace et une occupation des sites, empêchant l'adsorption des monomères d'IAPP, ce qui explique l'inhibition de la formation des fibrilles. Ces résultats peuvent expliquer le rôle de la corilagine dans l'inhibition de l'agrégation de l'IAPP. Des interactions directes avec le peptide, incluant des interactions π - π , des interactions π -alkyle, des liaisons hydrogène impliquant les neuf groupements phénoliques et des forces de Van der Waals (Khalifa et al. 2025) ont été proposées en solution.

Cependant, nos résultats obtenus en surface montrent que sur la surface, les interactions corilagine-surface dominent et contrôlent l'efficacité inhibitrice. Dans le cas du mica-PEG, la corilagine interagit plus avec la surface PEG qu'avec IAPP. Ceci suggère qu'il y a une diminution de l'entropie locale du PEG, limitant les conformations disponibles et modulant l'adsorption du peptide. Par conséquent, la diminution de l'entropie du mica recouvert de PEG pourrait faciliter l'interaction avec la corilagine. L'hypothèse que la surface du PEG induit l'adsorption de la corilagine par perte d'entropie lors de cette adsorption peut être mise en place à la suite des travaux de Gaudreault et al. 2005, sur le PEO possédant une structure identique à celle du PEG ($[-CH_2CH_2O]_n-$), à l'exception de la masse moléculaire, qui s'associe avec la corilagine seulement en présence du sel dû à un effet entropique. Cette observation met en évidence que la topologie des surfaces polymériques est un facteur déterminant dans le contrôle de l'activité inhibitrice de la corilagine.

L'analyse quantitative de l'occupation de surface confirme que l'augmentation de la concentration de corilagine conduit à une augmentation de la surface couverte. Le tableau 2.1 montre que les caractéristiques topographiques enregistrées sur chaque surface révèlent une surface occupée plus importante aux concentrations plus élevées. Sur le mica, mica-PEG et mica-PS, les différences moyennes de couverture de surface après incubation de $40 \mu\text{M}$ par rapport à $400 \mu\text{M}$ de corilagine sont respectivement de 3,3%, 5,2% et 19,6%. Cette forte variation observée sur mica-PS traduit son affinité interfaciale supérieure et explique la dominance de l'inhibition sur les surfaces hydrophobes.

L'analyse PiFM a permis de confirmer chimiquement par spectroscopie IR, l'identité de ces caractéristiques topographiques de surface : il s'agissait de la molécule corilagine (Figure 2.5). Les signaux caractéristiques étaient les bandes localisées des esters carbonyles $\sim 1600-1800 \text{ cm}^{-1}$ et les différents modes éther à large bande $\sim 1200-1550 \text{ cm}^{-1}$, confirmant que les entités observées correspondent à des assemblages de la corilagine. L'ensemble de ces résultats démontrent que la corilagine présente une affinité interfaciale fortement dépendante de la surface, ce qui explique son efficacité à inhiber l'agrégation de l'IAPP. Ceci démontre le mode d'action d'inhibition de la corilagine liée par des interactions corilagine-surface plutôt que par des interactions corilagine-IAPP. Ainsi, le modèle étudié suggère que l'inhibition observée résulte principalement d'interactions corilagine-surface plutôt d'une interaction directe corilagine-IAPP, ceci met en évidence l'importance de la surface sur l'agrégation de l'IAPP.

3.6 Corrélation entre la couverture de surface et l'inhibition des fibrilles

Les mesures quantitatives de la couverture surfacique obtenues par AFM montrent une corrélation directe avec le degré d'inhibition de la fibrillation de l'IAPP sur les différentes surfaces de polymères étudiées, en particulier à forte concentration de polyphénol (400 μM). (Figure 2.5 et Figure 2.9). L'occupation surfacique par la corilagine sur la surface constitue un paramètre déterminant dans la modulation de l'agrégation interfaciale de l'IAPP. Une surface recouverte modifie l'adsorption initiale des monomères d'IAPP et leur capacité à diffuser latéralement. Lorsque la corilagine occupe une place importante sur la surface, l'adsorption et la mobilité latérale des monomères d'IAPP sont fortement contraintes, rendant la formation des fibrilles défavorable. Ce mécanisme observé montre une inhibition principalement interfaciale, où la réduction de la mobilité empêche leur réorganisation structurale en feuillets β .

À faible concentration de corilagine (40 μM), on observe des protofibrilles (Figure 2.4.A) sur mica-PEG, indiquant une inhibition partielle par la corilagine qui est cohérente avec la couverture surfacique incomplète. Cette observation met en évidence que la présence de protofibrilles montre que les étapes précoces de nucléation ne sont pas totalement inhibées mais que la transition vers des fibrilles matures est perturbée. La surface mica-PEG présente les plus grandes fractions de surface occupées par la corilagine atteignant environ 22.4% à 40 μM et 27.6% à 400 μM (Figure 2.9). En revanche, aucune formation de fibrilles n'a été observée sur le mica-PS, même à faible concentration de corilagine, bien que la couverture de surface apparente mesurée par AFM ne soit que de 1.2% nettement inférieure à celle observée sur le mica-PEG aux faibles concentrations d'incubation de corilagine. Ceci suggère que la nature des interactions corilagine-surface et l'organisation moléculaire de la corilagine à l'interface jouent un rôle déterminant dans l'effet inhibitrice de la corilagine. Cette observation indique que l'efficacité inhibitrice de la corilagine ne dépend pas uniquement de la fraction de surface couverte, mais aussi de la manière dont la molécule de corilagine s'organise et interagit avec la surface. Sur la surface de PS, les interactions hydrophobes favorisent une adsorption plus stable de la corilagine, en bloquant les sites de nucléation de l'IAPP. Sur la surface de mica seul, les effets inhibiteurs de la corilagine sont négligeables, ce qui concorde avec la faible surface couverte aux faibles et fortes concentrations (2,4% et 5.7 % respectivement).

Ces valeurs montrent que l'adsorption limitée de la corilagine est insuffisante pour perturber significativement l'adsorption et la formation de fibrilles de l'IAPP. Ainsi, sur le mica, l'IAPP a un accès direct à la surface, favorisant la nucléation et la croissance fibrillaire indépendamment de la présence de la corilagine.

L'ensemble des résultats montre que sur mica-PS, la corilagine inhibe complètement la formation de fibrilles de l'IAPP indépendamment de la concentration. Sur le mica seul, l'inhibition est absente. Sur le mica-PEG, on observe une inhibition partielle à faible concentration et complète à forte concentration de corilagine. Cette analyse met en évidence que la surface contrôle l'accessibilité, l'organisation et l'activité inhibitrice de la corilagine.

3.7 Perspectives et limitations de l'étude

Les résultats obtenus ouvrent plusieurs perspectives visant à élargir et généraliser les observations réalisées sur le système modèle IAPP-coriagine. Une première extension consisterait à explorer un plus large éventail de surfaces présentant des propriétés physicochimiques variées, telles que le verre, les oxydes métalliques ou les substrats carbonés (graphite), ce qui permettrait d'établir des corrélations entre l'hydrophobicité et la capacité de nucléation des agrégats amyloïdes. Une telle approche contribuerait à définir des principes plus généraux gouvernant les processus d'assemblage en surface.

Par ailleurs, les expériences ont été conduites dans des conditions physicochimiques constantes, notamment en termes de pH et de température, or ces paramètres modulent l'agrégation de l'IAPP. Leur variation pourrait modifier significativement l'adsorption, l'organisation conformationnelle du peptide et l'agrégation observée.

Également, une autre approche consisterait à utiliser un autre peptide amyloïdogène comme A β qui a été montré dans les études antérieures (Shen et al. 2012) à s'agréger lorsqu'il interagit avec des surfaces, tandis que son comportement en solution est moins favorable à l'auto-assemblage spontané. L'utilisation de ce peptide dans le même protocole expérimental permettrait de distinguer l'effet propre de la surface sur l'agrégation indépendamment de la propension intrinsèque du peptide à former des structures amyloïdes en solution. De la même manière, l'étude d'autres polyphénols aux propriétés inhibitrices comme EGCG, 1,3,6-Tri-O-galloyl- α -D-glucose (α -TGG) ou (β -TGG) permettrait de déterminer si l'effet inhibiteur observé pour la corilagine

dépend de sa nature chimique ou s'il s'agit d'un phénomène plus général lié à l'interaction polyphénol-surface-peptide. Ces composés ont déjà été étudiés pour leur capacité à inhiber l'agrégation amyloïde en solution.

CONCLUSION

Ce projet a permis de mettre en lumière la compréhension des mécanismes d'agrégation amyloïde induite par les surfaces tout en mettant en évidence le rôle des propriétés physico-chimiques des surfaces de polymères dans la modulation de la formation des fibrilles de l'IAPP et son inhibition par le polyphénol corilagine.

Jusqu'à présent, les travaux consacrés à l'agrégation de l'IAPP ont été réalisés en solution, en étudiant les mécanismes de la nucléation et la formation des feuillets β et l'effet inhibiteur des polyphénols. Ces approches ont permis de comprendre le mécanisme clé de l'agrégation mais reposent sur l'hypothèse que la tendance du peptide à s'agréger est indépendante de son environnement surfacique. Mon mémoire démontre que cette hypothèse en solution est loin des conditions physiologiques et insuffisante pour comprendre en profondeur le mécanisme d'agrégation ainsi que les facteurs influençant ce processus. En prenant en considération l'effet de la surface dans le cadre de mon projet, le constat de l'impact majeur de la surface sur l'agrégation de l'IAPP a pu être étudié. En effet, la surface agit comme un site de nucléation du peptide favorisant ainsi l'adsorption locale, la nucléation et la stabilisation des feuillets β , même à des concentrations très faibles. Cette différence fondamentale souligne que les surfaces jouent un rôle actif dans le mécanisme d'agrégation de l'IAPP. Ces comparaisons mettent en avant l'agrégation de l'IAPP induite par la surface soulignant l'importance de prendre en considération le contact de la surface avec le peptide dans le cas des études liées à l'agrégation.

L'analyse comparative de surfaces polymériques aux propriétés hydrophiles et hydrophobes a révélé que la nature chimique de la surface influence la cinétique et la morphologie des agrégats formés, mais aussi l'efficacité inhibitrice de la corilagine. Les surfaces hydrophiles (mica et PEG) favorisent une adsorption plus réversible des monomères d'IAPP tandis que les surfaces hydrophobes (pHEMA et PS) stabilisent des interactions plus fortes avec le peptide conduisant à des fibrilles plus épaisses et plus matures. De plus, l'étude de l'effet inhibiteur de la corilagine révèle une différence majeure entre les observations en solution et celles induits par la surface. Les études antérieures en solution ont démontré que la corilagine est efficace dans son rôle d'inhibiteur de la formation des fibrilles de l'IAPP en ciblant principalement la nucléation secondaire, tandis que dans ce travail les résultats obtenus démontrent que l'efficacité de la corilagine en surface dépend de son affinité avec la surface. L'inhibition repose donc sur des interactions corilagine-surface plutôt que sur des interactions corilagine-IAPP. Ces résultats

mettent en évidence les limites des modèles d'études en solution et soulignent la nécessité de prendre en considération l'effet des surfaces pour une meilleure compréhension du mécanisme d'agrégation. Ceci ouvre de nouvelles perspectives pour la conception de stratégies d'inhibition amyloïde tenant compte de l'effet de la surface.

Les principales contributions de cette étude sont :

1. Différence entre agrégation en solution et agrégation induite par la surface. L'agrégation de l'IAPP à faible concentration en surface et son absence d'agrégation en solution met en avant que la surface joue un rôle catalytique dans l'agrégation en favorisant l'adsorption et la concentration locale des monomères d'IAPP. Les surfaces polymériques ont permis de mettre en avant l'importance du type de la surface dans l'agrégation d'IAPP.
2. La nature physicochimique de chacune des surfaces influence la morphologie et la formation des agrégats d'IAPP.
3. L'activité inhibitrice de la corilagine dépend fortement des propriétés de la surface. L'adsorption sur la surface et l'interaction avec l'IAPP peut moduler l'effet inhibitrice du polyphénol corilagine.

RÉFÉRENCES

- A. Huotari, W. Xu, J. Mönkäre, M. Kovalainen, K.-H. Herzig, V.-P. Lehto and K. Järvinen. 2013. Effect of surface chemistry of porous silicon microparticles on glucagon-like peptide-1 (GLP-1) loading, release and biological activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 454, 67–73.
- 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.
- Abelein, A., Jarvand, J., Barth, A., Gräslund, A. and Danielsson, J. 2016. Ionic strength modulation of the free energy landscape of A β 40 peptide fibril formation. *Journal of the American Chemical Society*, 138, 6893–6902.
- Agrawal, N. J., Kumar, S., Wang, X., Helk, B., Singh, S. K. and Trout, B. L. 2011. Aggregation in protein-based biotherapeutics: computational studies and tools to identify aggregation-prone regions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(12), 5081–5095.
- Akter, R., Cao, P., Noor, H., Ridgway, Z., Tu, L.-H., Wang, H., Wong, A. G., Zhang, X., Abedini, A. and Schmidt, A. M. 2016. Islet amyloid polypeptide: structure, function, and pathophysiology. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 2798269.
- Alam, T., Chen, L., Ogawa, A., Leffert, J. D., Unger, R. H. and Luskey, K. L. 1992. Coordinate regulation of amylin and insulin expression in response to hypoglycemia and fasting. *Diabetes*, 41, 508–514.
- Andrade, S., Loureiro, J. A. and Pereira, M. C. 2021. The role of amyloid β -biomembrane interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease: insights from liposomes as membrane models. *ChemPhysChem*, 22(15), 1547–1565.
- Arosio, P. et al. 2015. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17, 7606.
- Asthana, S., Mallick, B., Alexandrescu, A. T. and Jha, S. 2018. IAPP in type II diabetes: basic research on structure, molecular interactions, and disease mechanisms suggests potential intervention strategies. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1860, 1765–1782.
- Axell, E., Hu, J., Lindberg, M., Dear, A. J., Ortigosa-Pascual, L., Andrzejewska, E. A., Šneiderienė, G., Thacker, D., Knowles, T. P. J. and Sparr, E. 2024. The role of shear forces in primary and secondary nucleation of amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(25).
- B. Yang, D. J. Adams, M. Marlow and M. Zelzer. 2018. Surface-mediated supramolecular self-assembly of protein, peptide, and nucleoside derivatives: from surface design to the underlying mechanism and tailored functions. *Langmuir*, 34, 15109–15125.
- Beerten, J., Schymkowitz, J. and Rousseau, F. 2012. Aggregation-prone regions and gatekeeping residues in protein sequences. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12(22), 2470–2478.

- Bieschke, J., Russ, J., Friedrich, R. P., Ehrnhoefer, D. E., Wobst, H., Neugebauer, K. and Wanker, E. E. 2010. EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17), 7710–7715.
- Bokvist, M., Lindström, F., Watts, A., Gröbner, G. Two types of Alzheimer's β -amyloid (1–40) peptide membrane interactions: aggregation preventing transmembrane anchoring versus accelerated surface fibril formation. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 335: 1039–1049.
- Bolognesi, B. and Tartaglia, G. G. 2013. Physicochemical principles of protein aggregation. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 117, 53–72.
- Bower, R. L. and Hay, D. L. 2016. Amylin structure–function relationships and receptor pharmacology: implications for amylin mimetic drug development. *British Journal of Pharmacology*, 173(12), 1883–1898.
- Brain, S. D., Wimalawansa, S., MacIntyre, I. and Williams, T. J. 1990. The demonstration of vasodilator activity of pancreatic amylin amide in the rabbit. *The American Journal of Pathology*, 136, 487–490.
- Breydo, L., Redington, J. M. and Uversky, V. N. 2017. Effects of intrinsic and extrinsic factors on aggregation of physiologically important intrinsically disordered proteins. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 329, 145–185.
- Bucciantini, M., Giannoni, E. and Chiti, F. et al. 2002. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, 416, 507–511.
- Burke KA, Yates EA and Legleiter J (2013) Biophysical insights into how surfaces, including lipid membranes, modulate protein aggregation related to neurodegeneration. *Frontiers in Neurology* 4.
- C. E. Giacomelli and W. Norde. 2003. Influence of hydrophobic Teflon particles on the structure of amyloid β -peptide. *Biomacromolecules*, 4, 1719–1726.
- C. Soto and S. Pritzkow. 2018. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 21, 1332–1340.
- C. Y. Liang and S. Krimm. 1958. Infrared spectra of high polymers. VI. Polystyrene. *Journal of Polymer Science*, 27, 241–254.
- C. Yan, X. Zhu, B. Chen, H. Guan, K. Gu and H. Liu. 2025. Protein/peptide–polyphenol interactions: molecular mechanisms, functional synergy, and emerging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 163, 105194.
- Cabaleiro-Lago, C., Szczepankiewicz, O. and Linse, S. 2012. The effect of nanoparticles on amyloid aggregation depends on the protein stability and intrinsic aggregation rate. *Langmuir*, 28(3), 1852–1857.
- Capasso, L., De Masi, L., Sirignano, C., Maresca, V., Basile, A., Nebbioso, A., Rigano, D. and Bontempo, P. 2025. Epigallocatechin gallate (EGCG): pharmacological properties, biological activities and therapeutic potential. *Molecules*, 30(3), 654.

- Chakroun, N., Hilton, D., Ahmad, S. S., Platt, G. W. and Dalby, P. A. 2016. Mapping the aggregation kinetics of a therapeutic antibody fragment. *Molecular Pharmaceutics*, 13(2), 307–319.
- Chiti, F. and Dobson, C. M. 2017. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 27–68.
- Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G. and Dobson, C. M. 2003. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature*, 424, 805–808.
- Choi J, Yin T, Shinozaki K, Lam JW, Stevens JF, Becker LB and Kim J (2018) Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver: brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids. *Molecular and Cellular Biochemistry* 442: 187–201.
- Christopoulos, G., Perry, K. J., Morfis, M., Tilakaratne, N., Gao, Y., Fraser, N. J., Main, M. J., Foord, S. M. and Sexton, P. M. 1999. Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Molecular Pharmacology*, 56(1), 235–242.
- Colvin, V. L. and Kulinowski, K. M. 2007. Nanoparticles as catalysts for protein fibrillation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21), 8679–8680.
- Cornish, J., Callon, K. E., Lin, C. Q., Xiao, C. L., Mulvey, T. B., Coy, D. H., Cooper, G. J. and Reid, I. R. 1998. Dissociation of the effects of amylin on osteoblast proliferation and bone resorption. *American Journal of Physiology*, 274, E827–E833.
- Cremades, N., Cohen, S. I., Deas, E., Abramov, A. Y., Chen, A. Y., Orte, A., Sandal, M., Clarke, R. W., Dunne, P., Aprile, F. A., Bertocini, C. W., Wood, N. W., Knowles, T. P. J., Dobson, C. M. and Klenerman, D. 2012. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell*, 149(5), 1048–1059.
- De Baets, G., Schymkowitz, J. and Rousseau, F. 2014. Predicting aggregation-prone sequences in proteins. *Essays in Biochemistry*, 56, 41–52.
- De la Torre, B. G. and Albericio, F. 2024. The pharmaceutical industry in 2023: an analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules. *Molecules*, 29(3), 585.
- Deng, L. and Du, J. 2022. Borosilicate and boroaluminosilicate glasses. In *Atomistic Simulations of Glasses*, pp. 224.
- DuBay, K. F., Pawar, A. P., Chiti, F., Zurdo, J., Dobson, C. M. and Vendruscolo, M. 2004. Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogenic polypeptide chains. *Journal of Molecular Biology*, 341, 1317–1326.
- Eisenberg, D. S. and Sawaya, M. R. 2017. Structural studies of amyloid proteins at the molecular level. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 69–95.
- Erichsen, A., Larsen, D. and Beeren, S. R. 2021. Chaotropic and kosmotropic anions regulate the outcome of enzyme-mediated dynamic combinatorial libraries of cyclodextrins in two different ways. *Frontiers in Chemistry*, 9, 721942.

- Escobar, E. L. N., Griffin, V. P. and Dhar, P. 2024. Correlating surface activity with interface-induced aggregation in a high-concentration mAb solution. *Molecular Pharmaceutics*, 21(3), 1490–1500.
- F. Friedrich, S. Heissler, W. Faubel, R. Nüesch and P. G. Weidler. 2007. Cu(II)-intercalated muscovite: an infrared spectroscopic study. *Vibrational Spectroscopy*, 43, 427–434.
- Feingold V, Jenkins AB, Kraegen EW. Effect of contact material on vibration-induced insulin aggregation. *Diabetologia*. 1984;27:373–378.
- Fortier M, Cote-Cyr M, Nguyen V, Babych M, Nguyen PT, Gaudreault R and Bourgault S (2022a) Contribution of the 12-17 hydrophobic region of island amyloid polypeptide in self-assembly and cytotoxicity. *Frontiers in Molecular Biosciences* 9: 1017336.
- Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, Ostolaza H and Martin C (2020) Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences* 21.
- Galvagnion C (2017) The Role of Lipids Interacting with α -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease* 7(3): 433–450.
- Gaudreault R, Hervé V, van de Ven TGM, Mousseau N and Ramassamy C (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, van de Ven TGM and Whitehead MA (2005) Mechanisms of flocculation with poly(ethylene oxide) and novel cofactors. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 268: 131–146.
- Gaudreault R, van de Ven TGM and Whitehead MA (2006) A theoretical study of the interactions of water with gallic acid and a PEO/TGG complex. *Molecular Simulation* 32: 17–27.
- Giacomelli CE and Norde W (2003) Influence of hydrophobic Teflon particles on the structure of amyloid β -peptide. *Biomacromolecules* 4: 1719–1726.
- Green J, Goldsbury C, Mini T, Sunderji S, Frey P, Kistler J, Cooper G and Aebi U (2003) Full-length rat amylin forms fibrils following substitution of single residues from human amylin. *Journal of Molecular Biology* 326: 1147–1156.
- Gupta A, Singh AK, Kumar R, Ganguly R, Rana HK, Pandey PK, Sandhi G, Bishayee A and Pandey AK (2019) Corilagin in Cancer: A Critical Evaluation of Anticancer Activities and Molecular Mechanisms. *Molecules* 24(18): 3399.
- Hajiraissi R, Hanke M, Yang Y, Duderija B, Gonzalez Orive A, Grundmeier G and Keller A (2018) Adsorption and fibrillization of island amyloid polypeptide at self-assembled monolayers studied by QCM-D, AFM, and PM-IRRAS. *Langmuir* 34(11): 3517–3524.
- Han YL, Yin HH, Xiao C, Bernards MT, He Y and Guan YX (2023) Understanding the molecular mechanisms of polyphenol inhibition of amyloid β aggregation. *ACS Chemical Neuroscience* 14(22): 4051–4061.

- Hay DL, Garelja ML, Poyner DR and Walker CS (2018) Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25. *British Journal of Pharmacology* 175(1): 3–17.
- Hull RL, Westermark GT, Westermark P and Kahn SE (2004) Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89: 3629–3643.
- Jafari M, Abrego-Martinez JC, Claverie J and Siaj M (2025) Chemical and structural characterization of electrochemically reduced diazonium salt grafted nanofilms via photoinduced force microscopy. *Langmuir* 41: 11923–11934.
- Jafari M, Nowak DB, Huang S, Abrego JC, Yu T, Du Z, Hammouti B, Jeffali F, Touzani R, Ma D and Siaj M (2023) Photo-induced force microscopy applied to electronic devices and biosensors. *Materials Today: Proceedings* 72: 3904–3910.
- Jafari M, Salek S, Goubert G, Byers JC and Siaj M (2024) Photo-induced force microscopy-based spectroscopy and chemical mapping of grafted electrochemically reduced aryl diazonium salts. *Journal of Physical Chemistry C* 128: 21720–21729.
- Jeong HR and An SS (2015) Causative factors for formation of toxic island amyloid polypeptide oligomer in type 2 diabetes mellitus. *Clinical Interventions in Aging* 10: 1873–1879.
- Kang B, Tang H, Zhao Z and Song S (2020) Hofmeister series: insights of ion specificity from amphiphilic assembly and interface property. *ACS Omega* 5: 6229–6239.
- Katoch J, Kim SN, Kuang Z, Farmer BL, Naik RR, Tatulian SA and Ishigami M (2012) *Nano Letters* 12(5): 2342–2346.
- Khalifa J, Sulaimon R, Côté-Cyr M, Nguyen PT, Peslherbe G, Bourgault S and Gaudreault R (2025) Polyphenolic gallotannins 1,3,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose and corilagin attenuate IAPP amyloid formation and cytotoxicity by primarily targeting secondary nucleation. *Biochemistry* 64: 3570–3584.
- Kim Y and Je Y (2017) Flavonoid intake and mortality from cardiovascular disease and all causes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Clinical Nutrition ESPEN* 20: 68–77.
- King TE, Humphrey JR, Laughton CA and Hirst JD (2024) Optimizing excipient properties to prevent aggregation in biopharmaceutical formulations. *Journal of Chemical Information and Modeling* 64(1): 265–275.
- Kiriyama Y and Nochi H (2018) Role and cytotoxicity of amylin and protection of pancreatic islet β -cells from amylin cytotoxicity. *Cells* 7(8): 95.
- Klement K, Wieligmann K, Meinhardt J, Hortschansky P, Richter W and Fändrich M (2007) Effect of different salt ions on the propensity of aggregation and on the structure of Alzheimer's A β (1–40) amyloid fibrils. *Journal of Molecular Biology* 373: 1321–1333.
- Kong H, Liu B, Yang G, Chen Y and Wei G (2022) Tailoring Peptide Self-Assembly and Formation of 2D Nanoribbons on Mica and HOPG Surface. *Materials* 15(1): 310.

- Kotler SA, Walsh P, Brender JR and Ramamoorthy A (2014) Differences between amyloid- β aggregation in solution and on the membrane: insights into mechanistic details of Alzheimer's disease. *Chemical Society Reviews* 43: 6692–6700.
- Kowalewski T, Holtzman DM. In situ atomic force microscopy study of Alzheimer's β -amyloid peptide on different substrates: new insights into mechanism of β -sheet formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1999;96:3688–3693.
- Law KY (2014) Definitions for hydrophilicity, hydrophobicity, and superhydrophobicity: Getting the basics right. *Journal of Physical Chemistry Letters* 5: 686–688.
- Lutz TA (2022) Creating the amylin story. *Appetite* 172: 105965.
- Lv, Z., Du, X., Chen, Z., Liu, F., Zhang, R., Ma, L., Ye, S., Jiang, P., Wang, Z., Cao, H., Li, C. In vitro aggregation ability of five commercially available A β 42 peptide. *Current Alzheimer Research*, 2021, 18(9): 701–710.
- Madine, J., Jack, E., Stockley, P. G., Radford, S. E., Serpell, L. C., Middleton, D. A. Structural insights into the polymorphism of amyloid-like fibrils formed by region 20–29 of amylin revealed by solid-state NMR and X-ray fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130: 14990–15001.
- Mahler, H.-C., Friess, W., Grauschopf, U., Kiese, S. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, 98(9): 2909–2934.
- Majid, N., Khan, R. H. Protein aggregation: consequences, mechanism, characterization and inhibitory strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 242: 125123.
- Marek, P. J., Patsalo, V., Green, D. F., Raleigh, D. P. Ionic strength effects on amyloid formation by amylin are a complicated interplay among Debye screening, ion selectivity, and Hofmeister effects. *Biochemistry*, 2012, 51(43): 8478–8490.
- Martins GF, Nascimento C and Galamba N (2023) Mechanistic Insights into Polyphenols' Aggregation Inhibition of α -Synuclein and Related Peptides. *ACS Chemical Neuroscience* 14: 1905–1920.
- Martins, A. C., Oshiro, M. Y., Schiavon, B. N., de Jesus, G. A., de la Torre, B. G., Albericio, F. Monoclonal antibodies and proteins: the biologic drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2024. *Biomedicines*, 2025, 13(8): 1962.
- Matsuura, Y., Takehira, M., Joti, Y., et al. Thermodynamics of protein denaturation at temperatures over 100 °C: CutA1 mutant proteins substituted with hydrophobic and charged residues. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15545.
- Meisl, G., Yang, X., Dobson, C. M., Linse, S., Knowles, T. P. J. Modulation of electrostatic interactions to reveal a reaction network unifying the aggregation behaviour of the A β 42 peptide and its variants. *Chemical Science*, 2017, 8: 4352–4362.
- Montane, J., Klimek-Abercrombie, A., Potter, K., Westwell-Roper, C., Verchere, C. B. Metabolic stress, IAPP and islet amyloid. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2012, 14: 68–77.

- Moores, B., Drolle, E., Attwood, S. J., Simons, J., Leonenko, Z. Effect of surfaces on amyloid fibril formation. *Plos one*, 2011, 6: e25954.
- Mulder, H., Ahrén, B., Sundler, F. Islet amyloid polypeptide and insulin gene expression are regulated in parallel by glucose in vivo in rats. *American Journal of Physiology*, 1996, 271: E1008–E1014.
- Mulheran, P., Kubiak, K. Protein adsorption mechanisms on solid surfaces: lysozyme-on-mica. *Molecular Simulation*, 2009, 35(7): 561–566.
- Nakanishi, K., Sakiyama, T., Imamura, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(3): 233–244.
- Nandi, S., Mondal, P., Chowdhury, R., Saha, A., Ghosh, S., Bhattacharyya, K. Amyloid β peptides inside a reconstituted cell-like liposomal system: aggregation, fluorescence and solvation dynamics. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2016, 18: 30444–30451.
- Nanga, R. P. R., Brender, J. R., Xu, J., Hartman, K., Subramanian, V., Ramamoorthy, A. Three-dimensional structure and orientation of rat islet amyloid polypeptide protein in a membrane environment. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131: 8252–8261.
- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C., et al. The Arctic APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nature Neuroscience*, 2001, 4: 887–893.
- Nygren H (1995) Logarithmic growth in surface adsorption. *Advances in Colloid and Interface Science* 62: 137–159.
- Obici, L., Perfetti, V., Palladini, G., Moratti, R., Merlini, G. Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*.
- Oliva, A., Fariña, J. B., Llabrés, M. Validation of a size-exclusion chromatography method for monoclonal antibody aggregates. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1022: 206–212.
- Ono, K., Watanabe-Nakayama, T. Aggregation and structure of amyloid β -protein. *Neurochemistry International*, 2021, 151: 105208.
- Pawar, A. P., DuBay, K. F., Zurdo, J., Chiti, F., Vendruscolo, M., Dobson, C. M. Prediction of aggregation-prone and aggregation-susceptible regions in proteins. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 350: 379–392.
- Pedersen, J. S., Dikov, D., Otzen, D. E. N- and C-terminal hydrophobic patches are involved in fibrillation of glucagon. *Biochemistry*, 2006, 45: 14503–14512.
- Perova TS, Vij JK, Xu H. Fourier transform infrared study of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA). *Colloid and Polymer Science*. 1997;275:323–332.
- Perron, N. R., Brumaghim, J. L. A review of antioxidant mechanisms of polyphenols related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2009, 53: 75–100.

- Pham, N. B., Meng, W. S. Protein aggregation and immunogenicity of biotherapeutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, 585: 119523.
- Portillo, A. M., Krasnoslobodtsev, A. V., Lyubchenko, Y. L. Effect of electrostatics on aggregation of prion protein Sup35 peptide. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2012, 24: 164205.
- Poti, F., Santi, D., Spaggiari, G., Zimandti, F., Zanotti, I. Polyphenol health effects on cardiovascular and neurodegenerative disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20: 351.
- Qian, F., Sun, J., Cao, D., Tuo, Y., Jiang, S., Mu, G. Experimental and modelling study of denaturation of milk protein by heat treatment. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2017.
- Rabe, M., Soragni, A., Reynolds, N. P., Verdes, D., Liverani, E., Riek, R., Seeger, S. On-surface aggregation of α -synuclein at nanomolar concentrations results in two distinct growth mechanisms. *ACS Chemical Neuroscience*, 2013, 4: 408–417.
- Rabe, M., Verdes, D., Seeger, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011, 162: 87–106.
- Rahban, M., Ahmad, F., Piatyszek, M. A., et al. Stabilization challenges and aggregation in protein-based therapeutics. *RSC Advances*, 2023, 13: 35947–35963.
- Rahman, I., Biswas, S. K., Kirkham, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 2006, 72: 1439–1452.
- Rahman, M. S., Hossain, K. S., Das, S., et al. Role of insulin in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22.
- Raman, B., Chatani, E., Kihara, M., et al. Critical balance of electrostatic and hydrophobic interactions in amyloid fibril growth. *Biochemistry*, 2005, 44: 1288–1299.
- Rasouli, H., Farzaei, M. H., Khodarahmi, R. Polyphenols and their benefits. *International Journal of Food Properties*, 2017, 20(sup2): 1700–1741.
- Roden, M., Shulman, G. I. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature*, 2019, 576: 51–60.
- Rozenberg, M., Loewenschuss, A., Marcus, Y. IR spectra and hydration of short-chain poly(ethylene glycols). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1998, 54: 1819–1826.
- Sabaté, R., Gallardo, M., Estelrich, J. Temperature dependence of nucleation in amyloid fibrillogenesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, 35: 9–13.
- Saha, A., Mondal, G., Biswas, A., et al. Amyloid β peptides in liposomal systems. *Chemical Communications*, 2013, 49: 6119–6121.
- Sakagashira, S., Hiddinga, H. J., Tateishi, K., et al. S20G mutant amylin exhibits increased amyloidogenicity. *American Journal of Pathology*, 2000, 157: 2101–2109.

- Santos, J., Iglesias, V., Santos-Suárez, J., et al. pH-dependent aggregation in intrinsically disordered proteins. *Cells*, 2020, 9: 145.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., et al. Dietary polyphenols and disease prevention. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005, 45: 287–306.
- Sebastião M, Babych M, Quittot N, Kumar K, Arnold AA, Marcotte I, Bourgault S. Development of a novel fluorescence assay for studying lipid bilayer perturbation induced by amyloidogenic peptides using cell plasma membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2023;1865(3):184118.
- Sebastião M, Quittot N, Bourgault S. Thioflavin T fluorescence to analyse amyloid formation kinetics: measurement frequency as a factor explaining irreproducibility. *Analytical Biochemistry*. 2017;532:83–86.
- Sefton, M. V., Antonacci, G. M. Adsorption isotherms of insulin onto various materials. *Diabetes*, 1984, 33: 674–680.
- Sgarbossa A. Natural biomolecules and protein aggregation: emerging strategies against amyloidogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13:17121–17137.
- Shen L, Adachi T, Vanden Bout D, Zhu XY. A mobile precursor determines amyloid- β peptide fibril formation at interfaces. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(34):14172–14178.
- Shezad K, Zhang K, Hussain M, Dong H, He C, Gong X, Xie X, Zhu J, Shen L. Surface roughness modulates diffusion and fibrillation of amyloid- β peptide. *Langmuir*. 2016;32(32):8238–8244.
- Simpson LW, Szando GL, Boukari H, Good TA, Leach JB. Collagen hydrogel confinement of amyloid- β (A β) accelerates aggregation and reduces cytotoxic effects. *Acta Biomaterialia*. 2020;112:164–173.
- Singh PK, et al. Ultrafast torsional dynamics of protein binding dye thioflavin-T in nanoconfined water pool. *Journal of Physical Chemistry B*. 2009;113(25):8532–8538.
- So CR, Hayamizu Y, Yazici H, Gresswell C, Khatayevich D, Tamerler C, Sarikaya M. Controlling self-assembly of engineered peptides on graphite by rational mutation. *ACS Nano*. 2012;6(2):1648–1656.
- Sule SV, Cheung JK, Antochshuk V, Bhalla AS, Narasimhan C, Blaisdell S, Shameem M, Tessier PM. Solution pH that minimizes self-association of three monoclonal antibodies is strongly dependent on ionic strength. *Molecular Pharmaceutics*. 2012;9(4):744–751.
- Tartaglia GG, Pawar AP, Campioni S, Dobson CM, Chiti F, Vendruscolo M. Prediction of aggregation-prone regions in structured proteins. *Journal of Molecular Biology*. 2008;380(2):425–436.
- Terakawa MS, Yagi H, Adachi M, Lee YH, Goto Y. Small liposomes accelerate fibrillation of amyloid β (1–40). *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(2):815–826.

- Tiernan H, Byrne B and Kazarian SG (2020) ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 241: 118636.
- Trainor K, Broom A, Meiering EM. Exploring the relationships between protein sequence, structure and solubility. *Current Opinion in Structural Biology*. 2017;42:136–146.
- Uemura A, Kimura S, Imanishi Y. Investigation on peptide–liposome interactions by fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1983;729:28–34.
- V. Khatri et al. Bionanocomposites with enhanced physical properties from curli amyloid assemblies and cellulose nanofibrils. *Biomacromolecules*. 2023;24:5290–5302.
- Wang Q, Shah N, Zhao J, et al. Structural, morphological, and kinetic studies of β -amyloid peptide aggregation on self-assembled monolayers. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011;13:15200–15210.
- Wang W, Roberts CJ. Protein aggregation—mechanisms, detection, and control. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;550(1–2):251–268.
- Wen JH, He XH, Feng ZS, Li DY, Tang JX and Liu HF (2023) Cellular protein aggregates: formation, biological effects, and ways of elimination. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 8593.
- Westermarck P, Wernstedt C, Wilander E, et al. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1987;84:3881–3885.
- Westermarck, P., Engström, U., Johnson, K. H., Westermarck, G. T., Sandholm, B. Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *PNAS*, 1990, 87: 5036–5040.
- Williams TL, Serpell LC. Membrane and surface interactions of Alzheimer's A β peptide. *FEBS Journal*. 2011;278(20):3905–3917.
- X. Li et al. The inhibition effect of epigallocatechin-3-gallate on the co-aggregation of amyloid- β and human islet amyloid polypeptide. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25.
- Zapadka KL, Becher FJ, Gomes Dos Santos AL, Jackson SE. Factors affecting the physical stability of peptide therapeutics. *Interface Focus*. 2017;7:20170030.
- Zibae S, Makin OS, Goedert M, Serpell LC. A simple algorithm locates β -strands in amyloid fibril cores. *Protein Science*. 2007;16(5):906–918.