



Études spectroscopiques de la structure, de l'auto-association et de la topologie membranaire du peptide amyloïde α -synucléine 71-82

Thèse

Benjamin Martial

Doctorat en chimie
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

**Études spectroscopiques de la structure, de l'auto-
association et de la topologie membranaire du
peptide amyloïde α -synucléine 71-82**

Thèse

Benjamin Martial

Sous la direction de :

Michèle Auger, directrice de recherche
Normand Voyer, codirecteur de recherche

Résumé

Les maladies neurodégénératives telles que l'Alzheimer ou le Parkinson (MP) font partie d'une famille de maladies appelées « amyloïdoses » caractérisées par une agrégation protéique pathologique en fibrilles amyloïdes. Dans le cas de la MP, la protéine responsable est l' α -synucléine (AS). L'AS est majoritairement exprimée dans les neurones dopaminergiques, et cause leur mort dans une situation pathologique, provoquant alors l'apparition de symptômes tels qu'une raideur des membres et des tremblements. Les interactions entre l'AS et les membranes neuronales ont été identifiées comme un très probable élément déclencheur d'agrégation. Cette protéine de 140 acides aminés comporte une région critique vis-à-vis de l'agrégation : la séquence 71-82. Cette séquence est responsable de l'agrégation de l'AS : une substitution dans cette séquence ou sa suppression ralentit ou inhibe l'agrégation. Malgré l'avancée des connaissances, des incertitudes persistent sur le processus de fibrillisation et sur l'influence des membranes cellulaires.

Notre objectif est de mieux comprendre les interactions entre l'AS et les membranes des neurones dopaminergiques impliquées dans la MP. Nous avons choisi d'étudier le peptide AS₇₁₋₈₂ et d'examiner les aspects dynamiques et structuraux de ses interactions avec des membranes modèles mimant les membranes neuronales. Trois techniques spectroscopiques ont été utilisées : la spectroscopie infrarouge (IR), le dichroïsme circulaire vibrationnel (VCD), et la résonance magnétique nucléaire de l'état solide du ³¹P et du ¹³C (RMN-ÉS). L'IR a permis de caractériser la structure secondaire de l'AS₇₁₋₈₂ en solution et en présence de membranes. Majoritairement non structuré en solution, l'AS₇₁₋₈₂ adopte une structure en feuillets- β lors d'interactions avec des membranes anioniques. Alors que l'AS₇₁₋₈₂ ne semble pas perturber les membranes, la transition de phase gel à fluide des lipides engendre un réarrangement structural du peptide pour des mélanges de lipides zwitterioniques et anioniques. Le VCD nous a permis d'identifier deux formes de fibrilles amyloïdes, caractérisées par une hélicité gauche ou droite. Ce polymorphisme dépend de la concentration en peptide et du rapport molaire peptide:lipide. Le VCD a également permis de caractériser la cinétique d'agrégation. Finalement, la séquence RMN-ÉS PROCSA (*Phosphorus recoupling of chemical shift anisotropy*) a révélé l'impact de l'AS₇₁₋₈₂ à la fois sur la forme des membranes modèles et la mobilité des têtes polaires des phospholipides,

tandis que la séquence DQF-DRAWS (*double-quantum filtered dipolar recoupling in a windowless sequence*) a permis de caractériser la structure des fibrilles d'AS₇₁₋₈₂ comme étant parfaitement *in-register*.

Comparé à sa protéine parent, l'AS₇₁₋₈₂ présente des caractéristiques structurales similaires, que ce soit en solution ou lors d'interactions avec des membranes neuronales modèles. L'AS₇₁₋₈₂ apparaît ainsi comme un bon modèle pour tenter de comprendre les différents aspects structuraux et dynamiques de l'AS. Mieux comprendre les différentes structures de ce peptide pourrait à terme mener à la synthèse d'inhibiteurs d'agrégation, de rupteurs (*breakers*) de fibres amyloïdes, voire de sondes de diagnostic.

Abstract

Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's or Parkinson's disease (PD) are part of a family of diseases called "amyloidosis" characterized by pathological protein aggregation into amyloid fibrils. In the case of PD, the protein responsible is α -synuclein (AS). AS is mainly expressed in dopaminergic neurons, and causes their death in a pathological situation, then causing the appearance of symptoms such as limb stiffness and tremors. Interactions between AS and neuronal membranes have been identified as a very likely trigger for aggregation. This 140-amino-acid-long protein has a region critical to aggregation: the 71-82 sequence. This sequence is responsible for the aggregation of AS: a substitution in this sequence or its deletion slows or inhibits aggregation. Despite the advance of knowledge, uncertainties persist on the process of fibrillation and the influence of membranes.

Our goal is to better understand the interactions between AS and dopaminergic neurons membranes involved in PD. We chose to study the AS₇₁₋₈₂ peptide and examine the dynamic and structural aspects of its interactions with model membranes mimicking neuronal membranes. Three spectroscopic techniques were used: Infrared spectroscopy (IR), Vibrational Circular Dichroism (VCD), as well as ³¹P and ¹³C solid-state Nuclear Magnetic Resonance (ssNMR). IR allowed the characterization of AS₇₁₋₈₂ secondary structure in solution and in the presence of membranes. Majorly disordered in solution, AS₇₁₋₈₂ adopts a β -sheet structure upon interactions with anionic membranes. Whereas AS₇₁₋₈₂ does not seem to disrupt membranes, the gel-to-fluid phase transition of lipids results in a structural rearrangement of the peptide for zwitterionic and anionic lipid mixtures. VCD allowed us to identify two amyloid fibril polymorphs, characterized by left or right helicity. This polymorphism depends on the peptide concentration and the peptide:lipid molar ratio. VCD has also enabled the characterization of the aggregation kinetics. Finally, the ssNMR PROCSA (Phosphorus Recoupling of Chemical Shift Anisotropy) pulse sequence revealed the impact of AS₇₁₋₈₂ on both the shape of the model membranes and the mobility of polar headgroups of phospholipids, while the DQF-DRAWS pulse sequence (double-quantum filtered dipolar recoupling in a windowless sequence) allowed us to characterize AS₇₁₋₈₂ as adopting a perfectly in-register β -sheet structure in its fibrillar form.

Compared to its parent protein, AS₇₁₋₈₂ has similar structural characteristics, either in solution or upon interactions with model neuronal membranes. AS₇₁₋₈₂ thus appears to be a good model to understand the structure and dynamics of AS. A better understanding of the different structures that this peptide can adopt could eventually lead to the synthesis of aggregation inhibitors, amyloid fiber breakers, or even diagnostic probes.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract	iv
Table des matières	vi
Liste des figures	x
Liste des tableaux.....	xvii
Liste des équations.....	xviii
Liste des abréviations et acronymes	xix
Remerciements.....	xxiii
Avant-propos	xxvii
Introduction.....	1
La maladie de Parkinson - Historique et statistiques	1
Physiologie de la MP	3
Prévention et traitements de la maladie	4
Médicaments	4
Chirurgie	5
Recherche actuelle : Biomarqueurs et inhibiteurs	5
Les essais cliniques : une dernière étape difficile à franchir	6
Références.....	8
Chapitre 1 : L'α-synucléine, une protéine amyloïde.....	13
1.1 Les protéines amyloïdes.....	13
1.2 α-synucléine : pathologie et physiologie	14
1.2.1 Pathologie	14
1.2.2 Structure primaire de l'AS.....	16
1.2.3 Processus de fibrillisation	17
1.2.4 Interactions membranaires.....	17
1.3 Membranes biologiques.....	19
1.3.1 Composition des membranes neuronales.....	19
1.3.2 Dynamique membranaire.....	22
1.3.3 Membranes modèles	24
1.4 Origine, précédents, et objectifs du projet	28
1.5 Références.....	29
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	36
2.1 Spectroscopie infrarouge	36
2.1.1 Théorie	36
2.1.2 Spectroscopie infrarouge des protéines	39

2.1.3 Spectroscopie infrarouge des phospholipides	40
2.1.4 Réflexion totale atténuée (ATR)	45
2.1.5 Considérations expérimentales	46
2.2 Dichroïsme circulaire vibrationnel	47
2.2.1 Théorie, appareil et signal	47
2.2.2 Applications	51
2.3 RMN de l'état solide	53
2.3.1 Concepts fondamentaux	54
2.3.2 Spins nucléaires en RMN de l'état solide	59
2.3.3 RMN des membranes modèles – ^{31}P	63
2.3.4 Étude RMN de l'AS ₇₁₋₈₂ – ^{13}C	70
2.4 Synthèse peptidique	76
2.5 Microscopie électronique en transmission ⁸⁶	79
2.6 Références	81
Chapitre 3 : Understanding amyloid fibril formation using protein fragments: structural investigations via vibrational spectroscopy and solid-state NMR	86
3.1 Résumé	86
3.2 Abstract	86
3.3 Introduction	87
3.4 Morphology and challenges to overcome	90
3.4.1 Morphology	90
3.4.2 Polymorphism	90
3.5 Vibrational techniques	91
3.5.1 Raman spectroscopy	92
3.5.2 IR and VCD: Amide I band	95
3.5.3 Infrared spectroscopy-IR	96
3.5.4 IR perspectives	100
3.5.5 Vibrational circular dichroism - VCD	100
3.6 Solid-state nuclear magnetic resonance – ssNMR	105
3.6.1 Future developments in ssNMR	110
3.7 Concluding remarks	111
3.8 References	112
Chapitre 4 : Structures de l'AS ₇₁₋₈₂ en solution	120
4.1 AS ₇₁₋₈₂ dans un tampon deutéré	120
4.1.1 Effet de la concentration de l'AS ₇₁₋₈₂	120
4.1.2 Effets de la température et du temps	123
4.1.3 Effet de la force ionique	127

4.1.4 Structure des oligomères.....	128
4.2 Conclusions.....	130
4.3 Références.....	131
Chapitre 5 : Vibrational Circular Dichroism Reveals Supramolecular Chirality Inversion of α -Synuclein Peptide Assemblies upon Interactions with Anionic Membranes	134
5.1 Résumé.....	134
5.2 Abstract.....	135
5.3 Introduction.....	135
5.4 Results and Discussion	138
5.4.1 AS ₇₁₋₈₂ Structure in Solution and in the Presence of DMPG.....	138
5.4.2 Supramolecular Structures of AS ₇₁₋₈₂ in the Presence of DMPG	143
5.4.3 The Conditions of Fibrillar Structure Formation	146
5.4.4 Time Dependence of the Fibrillar Structures.....	149
5.4.5 Hypotheses for the Fibril Chirality Interconversion	152
5.5 Conclusions.....	154
5.6 Experimental Section	156
5.6.1 Materials	156
5.6.2 Peptide Synthesis	156
5.6.3 Sample Preparation	156
5.6.4 VCD Spectra Acquisition	157
5.6.5 Spectra Treatment	157
5.6.6 Transmission Electron Microscopy (TEM)	157
5.7 Associated Content	158
5.8 Acknowledgments	159
5.9 References.....	160
Chapitre 6 : The Structure of a Parkinson's Disease-Involved α -Synuclein Peptide is Modulated by Membrane Composition and Physical State	165
6.1 Résumé.....	165
6.2 Abstract.....	166
6.3 Introduction.....	166
6.4 Experimental Section	168
6.4.1 Materials	168
6.4.2 Peptide synthesis.....	169
6.4.3 Sample preparation	169
6.4.4 IR spectra acquisition.....	170
6.4.5 Spectra treatment	170
6.4.6 Solid-state NMR	171

6.4.7 Transmission electron microscopy (TEM)	172
6.5 Results and Discussion	173
6.5.1 In-register <i>versus</i> out-of-register β -sheet.....	173
6.5.2 The effect of AS ₇₁₋₈₂ on lipid membranes	178
6.5.3 The effect of lipid membranes on the structure of AS ₇₁₋₈₂	183
6.5.4 Structural rearrangements of AS ₇₁₋₈₂ β -sheets induced by the lipid phase transition and temperature	187
6.6 Conclusions.....	190
6.7 Author contributions	191
6.8 Acknowledgements.....	192
6.9 Supplementary information	193
6.10 References.....	196
Conclusion	202
Récapitulatif des résultats principaux	203
AS ₇₁₋₈₂ en solution	203
Étude de la chiralité supramoléculaire.....	204
Étude de la dynamique des membranes modèles.....	205
Perspectives	207
Références.....	209
Bibliographie	211
Introduction.....	211
Chapitre 1.....	215
Chapitre 2.....	220
Chapitre 3.....	224
Chapitre 4.....	231
Chapitre 5.....	234
Chapitre 6.....	238
Conclusion	242
Annexe A : Fichiers SIMPSON DQF-DRAWS	244

Liste des figures

Figure 1.1. Processus d'agrégation typique et les différentes espèces formées au cours des différentes étapes (monomères, oligomères, protofibrilles et fibrilles). Ce schéma montre que différentes espèces/processus peuvent constituer la forme toxique de la protéine. Adapté de Roberts <i>et al.</i> ⁴ (libre accès).....	14
Figure 1.2. (A) Illustration d'une coupe de la <i>substantia nigra</i> , réserve à neurones dopaminergiques chez une personne saine (haut) et une personne atteinte de la MP (bas). Figure reprise de Medline Plus ⁵ . (B) Illustration d'un neurone comportant des corps de Lewy, représentés par les agrégats orange présents dans le cytoplasme. Figure reprise de VeryWellHealth ⁶	14
Figure 1.3. Tomographie par émission monophotonique (gauche, rouge densité maximale, bleu densité minimale) et tomographie par émission de positrons (droite, blanc densité maximale, jaune densité minimale) chez une personne saine (haut), un patient atteint de la MP à un stade précoce d'avancement de la maladie (milieu), et un patient avec une MP à un stade avancé (bas). Modifié à partir de Wilson <i>et al.</i> ⁷ avec permission, Copyright © 2019 Elsevier.	15
Figure 1.4. En haut, régulation des réserves de microvésicules (a) Situation physiologique : régulation de la quantité de microvésicules se liant à la membrane synaptique, par le biais de complexes SNARE, lors du relargage de dopamine, (b, c) Sous des conditions altérant les propriétés d'AS, la compartimentation des vésicules peut être augmentée (b) ou diminuée (c), modifiant ainsi les cinétiques d'exocytose. Figure tirée de Auluck <i>et al.</i> ⁵⁸ avec permission, Copyright © 2010, Annual Reviews. En bas, illustration de la liaison membranaire d'AS en situation physiologique, sous forme d'hélice- α . Figure tirée de Fusco <i>et al.</i> ¹⁷ avec permission, Copyright © 2014, Springer Nature.....	18
Figure 1.5. Illustration d'une vésicule synaptique pleine (A), en coupe (B) et la composition en phospholipides de la membrane (C). Adapté de Takamori <i>et al.</i> ⁶⁸ avec permission, Copyright © 2006, Elsevier.	20
Figure 1.6. Illustration des aspects dynamiques d'une bicouche lipidique. Adapté de Yeagle ⁸¹ (voir copyright bouquin)	23
Figure 1.7. Représentation d'une vésicule multilamellaire formée par des phospholipides. Les têtes polaires des phospholipides sont représentées en blanc, et les chaînes acyle sont représentées en jaune. Le diamètre varie généralement entre 100 et 1000 nm. Modifié à partir de Bitounis <i>et al.</i> ⁸³ (libre accès).....	25
Figure 1.8. Illustration des phases lipidiques suivant la géométrie des phospholipides : micelle sphérique (A), cylindre (B), bicouche (C), cylindre inverse (D) et micelle inverse (E). Repris de Perutková <i>et al.</i> ⁸⁶ avec permission, Copyright © 2009, Elsevier.....	27
Figure 1.9. Structure chimique du DMPG.	28
Figure 2.1. Modes de vibration moléculaires en spectroscopie IR.	38
Figure 2.2. Bandes de vibration de la région CH (3000-2800 cm^{-1}) de DMPC:DMPG (1:1), avec, dans l'ordre, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ et $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, en fonction de la température (Δ représente le chauffage de la suspension de membranes modèles).....	41
Figure 2.3. Représentation de Newman du changement de conformation des CH_2 des chaînes acyle lors de la transition de phase, avec le passage d'une conformation <i>trans</i> à <i>gauche</i>	42
Figure 2.4. Courbe de thermotropisme d'une suspension de membranes modèles DMPC:DMPG (1:1). Cette courbe correspond au tracé de la position du maximum de la bande d'élargation	

symétrique $\nu_s(\text{CH}_2)$ en fonction de la température. T_m correspond à la température de transition de phase.	42
Figure 2.5. Courbe de thermotropisme d'une suspension de membranes modèles DPPC-d ₆₂ :DMPG (1:1). Cette courbe correspond au tracé de la position du maximum de la bande d'élongation symétrique $\nu_s(\text{CD}_2)$, donc associée à la DPPC-d ₆₂ en fonction de la température. T_m correspond à la température de transition de phase.....	43
Figure 2.6. (A) Bande des C=O ester de DMPC à différentes températures (Δ représente la tendance lors du chauffage de la suspension de membranes modèles) et (B) dérivée seconde de la bande C=O ester à 5° C pour illustrer les deux composantes C=O libre (~1740 cm ⁻¹) et C=O lié (~1730 cm ⁻¹).....	44
Figure 2.7. Courbe de thermotropisme d'une suspension de membranes modèles DMPC:DMPG (1:1). Cette courbe correspond au tracé de la position du maximum de la bande d'élongation $\nu(\text{C}=\text{O})$ en fonction de la température. T_m correspond à la température de transition de phase.	45
Figure 2.8. Illustration d'un montage ATR multi-réflexions, avec le parcours du faisceau infrarouge entre la source et le détecteur. Les ondulations présentes à l'interface cristal/échantillon représentent les ondes évanescentes.....	46
Figure 2.9. Illustration de l'appareillage VCD avec la partie optique et la partie traitement du signal. P.E.M. correspond à <i>photoelastic modulator</i> (modulateur photoélastique), L.P. et H.P. à <i>low-pass</i> et <i>high-pass filters</i> (filtres passe-bas et passe-haut), respectivement, f_m à la fréquence de modulation du P.E.M. et I_{DC} et I_{AC} correspondent aux signaux de modulation d'intensité et de modulation de polarisation, respectivement. Figure reprise de Buffeteau <i>et al.</i> ³² avec permission, Copyright © 2005, SAGE Publications.....	48
Figure 2.10. Illustration de l'absorption de la lumière IR polarisée circulairement gauche (L) et droite (R). Figure modifiée à partir de Nafie ³³ avec permission, Copyright © 1996, SAGE Publications.....	49
Figure 2.11. Illustration du fonctionnement d'un PEM. (A) $n_x > n_y$; retard de phase $\delta = \lambda/4 \equiv$ polarisation circulaire droite. (B) $n_x < n_y$; $\delta = -\lambda/4 \equiv$ polarisation circulaire gauche. Figure inspirée de Drake ³⁴ avec permission, Copyright © 1986, IOP Publishing.....	49
Figure 2.12. Spectres VCD (haut) et IR (bas) des deux énantiomères du (+)-camphre (-)-camphre. Tiré de He <i>et al.</i> ⁵⁰ , avec permission Copyright © 2011, © SAGE Publications.....	52
Figure 2.13. Spectres VCD (haut) et IR (bas) de l'hémoglobine, du lysozyme et de la concanaviline A obtenus à 50 mg/mL dans du D ₂ O. Figure reprise de Bruker.com ⁵¹	53
Figure 2.14. Niveaux d'énergie non dégénérés à gauche (absence de champ magnétique B_0), et dégénérés à droite (dans un champ magnétique externe B_0), pour un spin $I = 1/2$. Ici, ν correspond à la fréquence de la radiation électromagnétique nécessaire pour la transition d'énergie du niveau où $m = 1/2$ à $m = -1/2$	56
Figure 2.15. Illustration de la précession de Larmor pour deux noyaux, ¹³ C et ¹⁵ N, de rapports gyromagnétiques positif et négatif, respectivement.	57
Figure 2.16. Génération de l'aimantation nette M_0 par la surpopulation de spins au niveau d'énergie α	58
Figure 2.17. Ellipsoïde représentant la constante d'écran σ , et représentée mathématiquement par une matrice 3×3.	61

Figure 2.18. (A) Axes σ_{11} , σ_{22} et σ_{33} du tenseur d'ADC dans le système d'axes principaux (PAS) pour un atome de phosphore à la tête polaire des phospholipides. (B) Représentation spectrale des tenseurs d'ADC pour un phospholipide statique.	64
Figure 2.19. Illustration de la dépendance orientationnelle de population de phospholipides sur un spectre de poudre. Figure inspirée du cours de « Caractérisation des biomolécules » donnée par la Pre Michèle Auger (session Hiver 2016).....	66
Figure 2.20. Spectres statiques ^{31}P en fonction des mouvements moléculaires des phospholipides. Figure reprise du cours de « Caractérisation des biomolécules » donnée par la Pre Michèle Auger (session Hiver 2016).	66
Figure 2.21. Séquence d'impulsions écho de Hahn.....	67
Figure 2.22. Séquence d'impulsions bidimensionnelle PROCSA (<i>Phosphorus recoupling of the chemical shift anisotropy</i>). Figure adaptée de Warschawski <i>et al.</i> ⁷² avec permission, Copyright © 2018, Elsevier.	68
Figure 2.23. La période de recouplage t_1 comprend k cycles de $Cnn1$ (Figure 2.22). Chaque cycle complet de $Cnn1$ se fait sur n périodes de rotor ($n\tau_r$). La phase radiofréquence de chaque sous-cycle C_q est réglée comme égale à $2\pi q/n$, où q est un indice allant de 0 à $N - 1$. Dans chaque sous-cycle C_q , $a\tau_r$ et $b\tau_r$ indiquent la position et la durée de l'impulsion POST (séquence de phase « 0π » et d'impulsions $90_x 360_x 270_x$) qui corrige l'inhomogénéité du champ radiofréquence. Les valeurs entre parenthèses indiquent la longueur de pulse, et les valeurs en sous-script indiquent la phase, en radians. Figure adaptée de Chan <i>et al.</i> ⁷⁶ avec permission, Copyright © 2003, AIP Publishing.	69
Figure 2.24. Spectre PROCSA 2D de membrane modèle répliquant la composition lipidique d'une cellule de <i>E. coli</i> avec une composition de palmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), palmitoylphosphatidylglycérol (POPG) et tétraoctadecenoylcardiolipine (TOCL) dans un rapport POPE:POPG:TOCL 77:20:3. Figure reprise de Warchawski <i>et al.</i> ⁷² avec permission, Copyright © 2018, Elsevier.	70
Figure 2.25. Tranches 1D extraites du spectre 2D de la figure 2.23. Spectre de poudre de (A) PE, (B) CL et (C) PG. Figure adaptée à partir de Warchawski <i>et al.</i> ⁷² avec permission, Copyright © 2018, Elsevier.	70
Figure 2.26. Séquence d'impulsions DRAWS sur le canal ^{13}C . Dans la partie supérieure, le train d'impulsions R pour une période de rotor. Dans la partie inférieure, le supercycle RRRR est illustré, et correspond à quatre périodes de rotor représentées dans la partie supérieure, pour R, tandis que R correspond à l'inverse de R. Figure adaptée de Gregory <i>et al.</i> ⁷⁹ avec permission, Copyright © 1995, Elsevier.	72
Figure 2.27. Comparaison de courbes de déphasage DRAWS sans et avec relaxation, respectivement (A) et (B), et de courbes DQF-DRAWS de croissance sans et avec relaxation, respectivement (C) et (D). Les simulations sont conduites sur un modèle de 4 spins représentatifs de feuillets- β parallèles. Figure reprise de Caporini <i>et al.</i> ⁸⁰ avec permission, Copyright © 2010, American Chemical Society.	73
Figure 2.28. Séquence d'impulsions DQF-DRAWS. Figure modifiée à partir de Caporini <i>et al.</i> ⁸⁰ avec permission, Copyright © 2010, American Chemical Society.	74
Figure 2.29. Comparaison de spectres ^{13}C d'un peptide de la protéine M2 dans des membranes POPC:DOPA:Chol à un rapport peptide:lipide 1:33 obtenu par CP-MAS (haut) et DQ-DRAWS (bas) ($\nu_{\text{MAS}} = 5000$ Hz). Sur le spectre CP-MAS sont identifiés les bandes associées au rotor (+), aux	

lipides (#) et à la rotation à l'angle magique (*). Figure reprise de Long <i>et al.</i> ⁸¹ avec permission, Copyright © 2007, Elsevier.	75
Figure 2.30. Mécanisme de déprotection du groupement Fmoc d'un acide aminé couplé à la résine de Wang.	77
Figure 2.31. Mécanisme d'activation d'acide aminé.	77
Figure 2.32. Mécanisme de couplage.	78
Figure 2.33. Mécanisme de clivage.	78
Figure 2.34. Schéma en coupe d'un microscope électronique en transmission présentant les différentes composantes de celui-ci. Image provenant de Wikipedia.	80
Figure 3.1. Typical hierarchical description of the amyloid formation steps, from the single β -strand to the mature fibril (from secondary to quaternary structure). Molecular variations occurring at any level affect all the subsequent formation steps and thus are sources of fibril polymorphism. Figure based on a similar figure reported by Fitzpatrick <i>et al.</i> ²⁸	91
Figure 3.2. Typical IR spectra of parallel (upper spectrum) and antiparallel (lower spectrum) intermolecular β -sheets. The major component is at low wavenumbers (blue-shaded area) and the less intense one at higher wavenumbers (red asterisks). Figure based on a similar figure reported by Sarroukh <i>et al.</i> ⁵⁰	96
Figure 3.3. IR amide I bands (a) and corresponding VCD spectra (b) of HET _{S218-289} amyloid fibrils at pH 2.0 (red) and pH 6.0 (blue). Fibrils initially formed at pH 2.0 exhibited a left-handed twist, and when the pH was increased to 6.0, the chirality of the fibrils reversed, as proved by the inversion of the VCD signal. This example highlights the complementarity of VCD to IR, where spectra at both pHs look very alike. Reprinted with permission from Shanmugasundaram <i>et al.</i> ⁸⁶ . Copyright © 2015 American Chemical Society.	102
Figure 3.4. (A) Simplified correlation pulse sequence schemes, with indirect chemical shift evolution periods indicated by black arrows. (B) Intramolecular magnetization flows corresponding to the colormatching correlation pulse sequences presented in (A). 2D cross-sections of ¹⁵ N- (blue and red) and ¹³ C'-linked (orange and cyan) H α -detected spectra of (C) HET-S ₂₁₈₋₂₈₉ , (D) GB1, (E) AP205CP and the respective intra-residue C β -C α -H α correlations for AP205 (F). Reprinted with permission from Stanek <i>et al.</i> ⁹⁷ . Copyright © 2016 by John Wiley & Sons, Inc.	106
Figure 3.5. Lateral view (a) and cross-section (b) of TTR ₁₀₅₋₁₁₅ protofilament. β -Sheets are parallel and in-register along the fibril axis (a) and stacked in an antiparallel manner at the protofilament interface (b). Distances indicated in (b) were obtained via TEDOR measurements (black) and R ² TRW (red). Reprinted with permission from Debelouchina <i>et al.</i> ¹²⁶ . Copyright © 2013 American Chemical Society.	111
Figure 4.1. IR Spectres infrarouges en transmission de solutions de l'AS ₇₁₋₈₂ (10, 20 et 30 mM; tampon phosphate 20 mM, pD 7) à 35° C, normalisés en hauteur à 1643 cm ⁻¹	120
Figure 4.2. Vue latérale et de dessus d'une illustration de la structure d'une hélice PPII, hélice gauche aux angles dièdres $\phi = -75^\circ$ et $\psi = 146^\circ$. Figure modifiée à partir de Moradi <i>et al.</i> ¹⁰ avec permission, Copyright 2010 © AIP Publishing.	122
Figure 4.3. Spectre VCD d'une solution d'AS ₇₁₋₈₂ à 20 mM dans un tampon phosphate deutéré 20 mM (pD 7). Le spectre correspond à la somme de 20 acquisitions de 6000 scans (40h d'acquisition). Figure modifiée à partir de Martial <i>et al.</i> ¹¹ avec permission, Copyright © 2019, American Chemical Society.	122

Figure 4.4. Spectres infrarouges en transmission d'une solution d'AS ₇₁₋₈₂ à 30 mM en fonction de la température (entre 5 et 70° C).....	124
Figure 4.5. (A) Spectres de différence d'une solution AS ₇₁₋₈₂ 30 mM (tampon phosphate 20 mM, pD 7) obtenus sur une période de 16h. (B) Tracé de l'aire positive sous la courbe de la figure 4.5A (essentiellement, l'aire intégrée de la bande à 1626 cm ⁻¹), en fonction du temps.	126
Figure 4.6. Effet de la concentration en NaCl (0, 50 et 100 mM) sur une solution d'AS ₇₁₋₈₂ 10 mM à 35° C (tampon phosphate 20 mM, pD 7).....	127
Figure 4.7. Spectre d'une solution d'AS ₇₁₋₈₂ 10 mM (100 mM NaCl) à 35° C (tampon phosphate 20 mM, pD 7), et sa dérivée seconde, qui révèle 4 composantes à 1626, 1644, 1660 et 1683 cm ⁻¹	128
Figure 4.8. Structures oligomériques (dimères, trimères et tétramères) de l'AS ₇₁₋₈₂ calculées par REMD. Figure modifiée à partir de Park <i>et al.</i> ³³	130
Figure 5.1. IR (up) and VCD (down) spectra of AS ₇₁₋₈₂ in phosphate buffer at a 2.0% w/v concentration (red spectra) and AS ₇₁₋₈₂ :DMPG 1:10 (2.0% w/v) (blue spectra).....	140
Figure 5.2. Electron micrographs of AS ₇₁₋₈₂ fibrils formed in presence of DMPG membranes, at a peptide concentration of 0.25 % w/v (A and D), 0.8 % w/v (B and E) and 1.0 % w/v (C and F), at magnifications of 15k (B), 20k (A), 25k (C), 30k (D and E) and 40k (F) and a P:L ratio of 1:10.	142
Figure 5.3. Normalized VCD spectra at various AS ₇₁₋₈₂ concentrations (0.25%, 0.5%, 0.8%, 1.0%, 1.5% and 2.0%) for a constant P:L ratio of 1:10. The spectra correspond to the average of the first 6 hours of acquisition.....	144
Figure 5.4. Normalized VCD spectra at various P:L (1:20, 1:15, 1:11.5 and 1:10) for a constant AS ₇₁₋₈₂ concentration of 1.0% w/v. The spectra correspond to the average of the first 6 hours of acquisition.....	145
Figure 5.5. Plots of the normalized VCD couplet amplitude g ($g = (\Delta A_{1617} - \Delta A_{1629})/A$) of AS ₇₁₋₈₂ -DMPG aqueous solutions: (i) as a function of peptide concentration at a constant P:L ratio of 1:10 (upper panel) and (ii) as a function of P:L ratio (1:20, 1:15, 1:11.5 and 1:10), at a constant AS ₇₁₋₈₂ concentration of 1.0% w/v (lower panel). Each point corresponds to the signal averaged over the first 6 hours of acquisition. The red and green areas correspond to left- and right-twisted assemblies whose VCD intensities decrease and increase, respectively. The equations correspond to the logarithmic curve-fitting of the data points.	148
Figure 5.6. VCD spectra of AS ₇₁₋₈₂ -DMPG aqueous solution at a P:L ratio of 1:10 and a AS ₇₁₋₈₂ concentration of 0.8% w/v over a 15-hour time period.	150
Figure 5.7. VCD spectra of AS ₇₁₋₈₂ -DMPG aqueous solution at a P:L ratio of 1:15 and 1.0% AS ₇₁₋₈₂ w/v over a 16.5-hour time period.....	151
Figure 5.8. VCD spectra of AS ₇₁₋₈₂ in presence of DMPG membranes (P:L 1:10, 2.0% AS ₇₁₋₈₂ w/v) recorded as a function of time over a 90-hour time period.....	152
Figure S5.9. IR spectra of AS ₇₁₋₈₂ in presence of DMPG membranes at a P:L molar ratio of 1:10 for various AS ₇₁₋₈₂ concentrations (0.25, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 and 2.0% w/v) (upper panel), and at a constant AS ₇₁₋₈₂ concentration of 1.0% w/v for various P:L molar ratios (1:20, 1:15 and 1:10) (lower panel). The spectra were acquired prior to VCD acquisition. The dashed line indicates the red-shift observed as the AS ₇₁₋₈₂ concentration and P:L ratio decrease. The amide I' band of AS ₇₁₋₈₂ arises at 1621 cm ⁻¹ . The band near 1740 cm ⁻¹ is due to the C=O stretching band of DMPG. The variations of absorbance are simply and directly related to the peptide concentration and P:L ratios.....	158

Figure S5.10. VCD couplet amplitude g ($g = (\Delta A_{1617} - \Delta A_{1629})/A$) as a function of time of a 2.0% AS ₇₁₋₈₂ w/v solution at a P:L ratio of 1:10. The data can be modeled using an exponential function.	159
Figure 6.1. Amide I' bands and second derivatives at room temperature of AS ₇₁₋₈₂ :DMPC:DMPG (1:5:5) for (A) the unlabeled peptide, (B) 1- ¹³ C-Gly ₇₃ -AS ₇₁₋₈₂ and (C) isotopic dilution (5:1 AS ₇₁₋₈₂ :1- ¹³ C-Gly ₇₃ AS ₇₁₋₈₂).	175
Figure 6.2. (A) Structural models of a parallel alignment of in-register and out-of-register ($i + 1$) β -sheet protofibrils. Orange labels correspond to 1- ¹³ C-Gly residues. Inter-residue distances r were found in the literature ³⁴⁻³⁵ . (B) DQF-DRAWS experiments for 1- ¹³ C-Gly ₇₃ -AS ₇₁₋₈₂ demonstrate a 4.8-Å distance at this position (orange buildup curve), additional simulations for out-of-register distances are displayed (green and blue buildup curves for 5.5 and 6.5 Å, respectively). Data shown are the mean for four measurements. Simulations were run taking into account a three-spin "infinite loop" model, to account for the two homonuclear interactions a given spin goes under in an amyloid fibril ²⁰⁻²²	177
Figure 6.3. Thermotropism curves of the DMPC:DMPG (1:1) and AS ₇₁₋₈₂ :DMPC:DMPG at P:L of 1:5:5 and 1:10:10. (A) Position of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ band maximum as a function of temperature. (B) Position of the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band maximum as a function of temperature.	179
Figure 6.4. (A) PROCSA direct dimension sum spectra and (B) ³¹ P slices extracted from the 2D PROCSA spectra of DMPC:DMPG 1:1 and AS ₇₁₋₈₂ :DMPC:DMPG 1:5:5, at 37 °C ($\nu_{\text{MAS}} = 6$ kHz). Values of δ ³¹ P _{iso} and deviation were obtained with three separate experiments for the DMPC:DMPG mixture and the AS ₇₁₋₈₂ :DMPC:DMPG mixture. Slices were extracted at the isotropic chemical shifts from (A).	181
Figure 6.5. Thermotropism curves of DMPC(_d ₅₄):DMPG (A) and DPPC(_d ₆₂):DMPG (B) mixtures in presence and in absence of AS ₇₁₋₈₂ . T_m is similarly represented by a vertical dotted line in (A) and (B).	182
Figure 6.6. (A) Amide I' band of AS ₇₁₋₈₂ , at AS ₇₁₋₈₂ :DMPC:DMPG 1:5:5. (B) Plots of the amide I' band maximum position as a function of temperature for AS ₇₁₋₈₂ :DMPC:DMPG 1:5:5 and AS ₇₁₋₈₂ :DMPC:DMPG 1:10:10. spectra are normalized with respect to the amide I' band maximum $\nu(\text{Am I}')$	184
Figure 6.7. Thermotropism curves of the DPPC:DMPG (1:1) and AS ₇₁₋₈₂ :DPPC:DMPG at P:L of 1:5:5 and 1:10:10. (A) Position of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ band maximum as a function of temperature. (B) Position of the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band maximum as a function of temperature.	185
Figure 6.8. Plots of the amide I' band maximum position as a function of temperature for AS ₇₁₋₈₂ :DPPC:DMPG 1:5:5 and AS ₇₁₋₈₂ :DPPC:DMPG 1:10:10.	187
Figure 6.9. Secondary derivatives of the amide I' band of AS ₇₁₋₈₂ :DMPC:DMPG 1:5:5 displayed at Figure 6.6A. Secondary derivatives are presented (A) below T_m (5-24 °C) and (B) above T_m (25-70 °C). Spectra are normalized with respect to the component at 1616 cm^{-1}	187
Figure S6.10. Amide I band of 1- ¹³ C-Gly ₇₃ AS ₇₁₋₈₂ :DMPC:DMPG 1:5:5 and its second derivative after freeze-drying prior to the DQF-DRAWS experiments. The structure of 1- ¹³ C-Gly ₇₃ AS ₇₁₋₈₂ is not altered when compared to its in-solution structure, exception being made for the 1639 cm^{-1} component. The higher wavenumber than in solution (1634 cm^{-1}) is consistent with the assignment of this component to hydrated β -sheet amino acids and dehydration upon the freeze-drying process.	193

Figure S6.11. Amide I' band of AS ₇₁₋₈₂ :DMPS and AS ₇₁₋₈₂ :DMPG. The 1618-cm ⁻¹ component corresponds to β-sheet, and the absence of component above 1680 cm ⁻¹ indicates a parallel β-sheet. The 1658-cm ⁻¹ component corresponds to the glutamine sidechain vibration.	194
Figure S6.12. DQF-DRAWS pulse sequence as implemented. <i>R</i> represents a pulse supercycle, <i>R</i> is the same supercycle with inverted phases. The double quantum coherence is developed during the excitation period, and then converted in a measurable (single quantum) signal during the reconversion/mixing period. Build-up curves were obtained by incrementing <i>n</i> between 1 and 11, corresponding to mixing times from 0 to 15 ms. Phase-cycling was implemented to isolate the desired double quantum coherence signal from single quantum signal.	194
Figure S6.13. Electron micrographs of AS ₇₁₋₈₂ upon interaction with DMPC:DMPG MLVs (A) & (B), and with DPPC:DMPG MLVs (C) & (D). Yellow arrows point to AS ₇₁₋₈₂ fibrils and red arrows point to the lipid vesicles.	195
Figure S6.14. Two-dimensional ³¹ P- ³¹ P PROCSA spectra for DMPC:DMPG (left) and AS ₇₁₋₈₂ :DMPC:DMPG (1:5:5, right). Contour levels used for both spectra are the same: 10 positive and 10 negative contours, a 1.20 scaling factor and an intensity threshold of 17.0.	196
Figure S6.15. Plot of ν(Am I') of AS ₇₁₋₈₂ :DMPG 1:10 as a function of temperature.....	196
Figure 7.1. Récapitulatif des trois volets de l'étude : (A) Structure de l'AS ₇₁₋₈₂ en solution, et les paramètres influençant les proportions des conformations désordonnée/oligomères en feuillet-β antiparallèle. (B) Illustration des paramètres dictant la chiralité supramoléculaire des fibrilles d'AS ₇₁₋₈₂ . (C) Réarrangement structurel des protofibrilles de l'AS ₇₁₋₈₂ permis par la transition de phase des phospholipides composant les membranes (PC:PG).....	207

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Illustration d'un phospholipide modèle. R_1 et R_2 correspondent à des chaînes acyle. R_3 correspond à la tête polaire.	22
Tableau 2.1. Bandes de vibration des peptides et protéines. Adapté de Kong <i>et al.</i> ²²	39
Tableau 2.2. Structures secondaires et leur nombre d'ondes associé dans la région amide I. Adapté de Barth ¹³	40
Tableau 2.3. Valeurs de spin, d'abondance naturelle, du rapport gyromagnétique et de la fréquence de Larmor (à 9,4 T) pour les noyaux actifs en RMN les plus communément étudiés.	57
Table 5.1. Summary of the Fibrillary Structures Formed by AS ₇₁₋₈₂ in the Presence of DMPG Membranes at Different Concentrations and P:L Ratios.	155

Liste des équations

- (2.1) Formule de la force de l'oscillateur D_{01}^a
- (2.2) Condition sur le moment dipolaire électrique d'une liaison chimique
- (2.3) Formule de la fréquence d'un oscillateur harmonique
- (2.4) Formule de la masse réduite
- (2.5) Formule de l'angle critique
- (2.6) Formule de la force rotationnelle R^a_{oi}
- (2.7) Condition sur les vecteurs moments électrique et magnétique d'une liaison chimique
- (2.8) Formule du moment angulaire de spin
- (2.9) Formule de I_z , projection de \vec{I} sur l'axe Z
- (2.10) Relation entre moment magnétique et moment angulaire
- (2.11) Valeurs d'énergie E pouvant être prises par les vecteurs moments magnétiques μ_z
- (2.12) Formule de la fréquence de Larmor
- (2.13) Formule de distribution de Boltzmann
- (2.14) Formule de l'aimantation longitudinale M_z en fonction du temps
- (2.15) Formule de l'aimantation transversale M_{xy} en fonction du temps
- (2.16) Équation de Schrödinger indépendante du temps
- (2.17) Développement de l'Hamiltonien total du système
- (2.18) Formule du champ magnétique B ressenti par un noyau
- (2.19) Formule de la fréquence de résonance tenant compte de la constante d'écran
- (2.20) Matrice représentant le tenseur de rang 2 de la constante d'écran
- (2.21) Matrice du tenseur déplacement chimique dans le système d'axes principaux
- (2.22) Formule de l'Hamiltonien déplacement chimique
- (2.23) Développement de la composante ZZ du tenseur déplacement chimique
- (2.24) Formule de l'Hamiltonien du couplage dipolaire
- (2.25) Formule de la composante perpendiculaire du tenseur ADC
- (2.26) Formule de la composante parallèle du tenseur ADC
- (2.27) Équation de la valeur isotrope σ_{iso} du tenseur ADC
- (2.28) Formule de l'ADC d'un système à symétrie axiale
- (2.29) Formule de la fréquence réduite en fonction de l'orientation
- (2.30) Condition de Hartmann-Hahn (1)
- (2.31) Condition de Hartmann-Hahn (2)
- (2.32) Formule de la résolution d'un microscope
- (4.1) g factor calculation formula
- (6.1) Double-quantum transverse relaxation exponential decaying factor f
- (6.2) χ^2 formula for good fit calculation
- (6.3) σ^2 formula for good fit calculation

Liste des abréviations et acronymes

2D-IR	<i>Two-dimensional infrared</i>
3D zf-TEDOR	<i>Three-dimensional z-filtered transferred-echo double-resonance</i>
A	<i>Absorbance; absorbance</i>
AD	<i>Alzheimer's disease</i>
ADC	<i>Anisotropie de déplacement chimique</i>
AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
AS	<i>α-synuclein; α-synucléine</i>
AS ₇₁₋₈₂	<i>α-synuclein (71-82); α-synucléine (71-82)</i>
ATR-IR	<i>Infrarouge à réflexion totale atténuée; Attenuated total reflection infrared</i>
A β	<i>Amyloid-β</i>
CP	<i>Cross polarization; polarisation croisée</i>
CP-MAS	<i>Cross-polarization magic-angle spinning</i>
Cryo-EM	<i>Cryo-electron microscopy</i>
CSA	<i>Chemical shift anisotropy</i>
DARR	<i>Dipolar-assisted rotational resonance</i>
DFT	<i>Density functional theory</i>
DMPC	<i>1,2-dimyristoyl-<i>sn</i>-glycéro-3-phosphocholine</i>
DMPG	<i>1,2-dimyristoyl-<i>sn</i>-glycéro-3-phosphoglycérol</i>
DNP	<i>Dynamic nuclear polarization</i>
DPPE	<i>1,2-dipalmitoyl-<i>sn</i>-glycéro-3-phosphocholine</i>
DQF-DRAWS	<i>Double quantum-filtered dipolar recoupling in a windowless sequence</i>
DUVR	<i>Deep-UV resonance Raman</i>
Fmoc	<i>9-fluorénylméthylloxycarbonyl</i>
FT-IR	<i>Fourier-transform infrared; infrarouge à transformée de Fourier</i>
HBTU	<i>Hexafluorophosphate benzotriazole tetramethyl uronium</i>
HD	<i>Huntington's disease</i>
H.P.	<i>High-pass filter; filtre passe-haut</i>
HPLC	<i>High precision liquid chromatography; chromatographie liquide haute précision</i>
IAPP	<i>Islet amyloid polypeptide</i>
IR	<i>Infrared spectroscopy; spectroscopie infrarouge</i>
L.P.	<i>Low-pass filter; filtre passe-bas</i>
MAS	<i>Magic angle spinning; rotation à l'angle magique</i>
MCT	<i>Mercure-cadmium-tellurium</i>
MLV	<i>Multilamellar vesicle; vésicule multilamellaire</i>
MP	<i>Maladie de Parkinson</i>
NAC	<i>Non-β-amyloid component</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
PAS	<i>Principle axis system; Système d'axes principaux</i>
PC	<i>Phosphatidylcholine</i>
PD	<i>Parkinson's disease</i>
PE	<i>Phosphatidyléthanolamine</i>
PEM	<i>Photoelastic modulator; modulateur photoélastique</i>
PG	<i>Phosphatidylglycérol</i>
PI	<i>Phosphatidylinositol</i>
PITHIRDS	<i>Constant-time recoupling with π-pulses lasting one-third of the MAS rotation period</i>
PM-IRRAS	<i>Spectroscopie IR de réflexion-absorption par modulation de polarisation</i>
PolyQ	<i>Polyglutamine</i>

POPC	1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
POPG	1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphoglycérol
PPII	<i>Polyproline II helix</i> ; hélice polyproline II
PROCSA	<i>Phosphorus recoupling of the chemical shift anisotropy</i>
PrP	<i>Prion protein</i>
R ²	<i>Rotational resonance</i>
REDOR	<i>Rotational-echo double-resonance</i>
REMD	<i>Replica exchange molecular dynamics</i>
RMN-ÉS	Résonance magnétique nucléaire de l'état solide
RMS	<i>Root mean square</i>
ROA	<i>Raman optical activity</i>
RROA	<i>Resonance Raman optical activity</i> ; Raman d'activité optique de résonance
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
SERS	<i>Surface-enhanced Raman spectroscopy</i>
SM	Sphingomyéline
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i>
ssNMR	<i>Solid-state nuclear magnetic resonance</i>
TDC	<i>Transition dipole coupling</i> ; couplage dipolaire de transition
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> ; microscopie électronique à transmission
TERS	<i>Tip-enhanced Raman spectroscopy</i>
TFA	acide 2,2,2-trifluoroacétique
TTR	<i>Transthyretin</i>
VCD	<i>Vibrational circular dichroism</i> ; dichroïsme circulaire vibrationnel
XRD	<i>X-ray diffraction</i>

À papy René.

*« Éduquer ce n'est pas remplir un vase, c'est
allumer un feu. »
Michel de Montaigne*

Remerciements

J'ai repoussé l'écriture de ces remerciements jusqu'au dernier moment, par peur de ne pas réussir à trouver les mots qui traduisent exactement le fond de ma pensée. Dorénavant le moment est venu, et j'espère sincèrement qu'ils réussiront à être le reflet de l'immense gratitude que je porte aux différentes personnes qui auront marquées ce parcours, et bien évidemment en particulier, que je te porte, Michèle.

Tu m'as accueilli dans ton laboratoire alors que je n'étais qu'un simple étudiant à la recherche d'un stage à l'étranger et d'une belle aventure. Pour être une belle aventure, ça l'a été, et cela grâce à toi. Tu auras été sans aucun doute une personne qui a changé le cours de ma vie. Ça peut paraître bête à dire, mais un doctorat n'est pas juste une période d'étude supplémentaire de quelques années, c'est avant tout une tranche de vie. Cette tranche de vie, je ne l'aurais passée nulle part ailleurs. Être sous ta supervision a été un honneur et je me sens ô combien chanceux de t'avoir connue. Plus qu'une directrice de recherche, n'importe qui t'ayant côtoyée peut témoigner à quel point tu as été, et tu resteras dans nos mémoires, une femme extraordinaire. De simples mots écrits ici n'arriveront malheureusement pas à dépeindre ta personnalité généreuse, ton humilité, ton immense force face aux épreuves auxquelles la vie t'a confrontée. Quelque part, ne pas réussir à transposer tout ce que tu as représenté pour moi paraît logique, une personne comme toi ne se raconte pas, elle se rencontre. Tu auras été le point de départ de ce que j'espère sera une longue carrière de chercheur universitaire. Tu as su par ton dynamisme, ta passion et ta pédagogie, me déclencher l'envie de marcher, humblement, dans tes pas. Ton parcours admirable, salué et reconnu par tous est, et restera, une source d'inspiration. Tu étais une personne formidable, tant professionnellement que personnellement, comme en témoignent les nombreux messages provenant du monde entier reçus dans les semaines suivant le 29 octobre 2018. Malgré ton départ bien trop précoce, tu as remarquablement réussi à accomplir tant de choses et à marquer tant de vies. Bien plus que de simples expériences de laboratoire, ces quelques années sous ta supervision m'auront forgé une personnalité scientifique évidemment, mais également une vision de la vie et du monde que je n'échangerais pour rien au monde. Tu étais ce qu'on appelle une grande dame, une très grande dame. J'espère être, dans les années et

décennies à venir, un bon ambassadeur du « Lab Auger ». Une chose reste certaine, c'est que chaque accomplissement scientifique sera avant tout marqué du sceau MA.

Mes remerciements vont ensuite à ton « bras droit », Thierry. Merci Thierry, pour tout, sincèrement. Ta patience, pédagogie et joie de vivre font de chaque jour au bureau une très bonne journée. Ta volonté de faire briller les autres est admirable. Tous les mémoires, rapports de stage et thèses portant le nom de Michèle comme directrice mériteraient amplement que ton nom suive le sien. Ton accompagnement dans chaque aspect de la recherche, autant au niveau expérimental, rédactionnel, analyse de résultats que relationnel m'a été extrêmement précieux. Parce qu'avant d'être un lieu de science, un labo est avant tout un lieu où vit un groupe, et cette vision de la science que toi et Michèle m'avez offert de découvrir me suivra pour toujours. Ton dévouement à faire avancer la science, en prenant le recul nécessaire vis-à-vis des impératifs actuels de publications à tout crin, nous a fait faire de la belle science. Plus qu'un bras droit de Michèle, tu auras été un mentor à part entière. Le contexte de ces derniers mois a rendu les choses bien compliquées pour tout le monde, autant professionnellement que personnellement, et tu as réussi de bien belle manière à tenir le labo à flots. Finalement, merci pour tout, autant la science que le côté personnel.

Merci également à Normand, toi qui as très gentiment accepté de nous prendre sous ton aile après le départ de Michèle. Ta présence et ton soutien ont réussi à rendre ces derniers mois beaucoup plus vivables qu'ils ne promettaient de l'être. Merci également pour ta supervision et tes précieux conseils pour mon « après-doctorat », qui, grâce à tes techniques, m'ont permis d'intégrer un labo aux États-Unis pour ce qui promet d'être un post-doctorat passionnant. Je tenais également à te remercier sincèrement pour tout ce que tu fais au niveau de PROTEO, ce qui m'a offert d'assister à de super congrès internationaux et m'a soutenu par le biais d'une bourse d'études. Ton enthousiasme et ton dynamisme contagieux resteront comme un modèle à suivre !

Je tenais également à remercier sincèrement les membres du jury, qui ont gentiment accepté de prendre le temps de lire et d'évaluer cette thèse ainsi que sa soutenance.

Je tenais aussi à remercier Thierry Buffeteau, qui m'a accueilli dans son laboratoire à Bordeaux et m'a initié au VCD lors d'un stage international qui aura accouché de très beaux

résultats. Merci également à Steve Bourgault qui m'a permis d'utiliser l'espace de quelques jours son SPR pour y faire quelques expériences, dont les résultats n'ont pas été à la hauteur de mes attentes, mais m'auront permis de me familiariser avec un nouvel appareil, ce qui fut grandement apprécié.

Merci également à François Paquet-Mercier, toi qui m'as initié à la spectroscopie infrarouge et m'as formé pour prendre ta suite en tant qu'auxiliaire de recherche du Cerma. Merci François pour tout ça, et bien plus encore, les belles discussions tenues au dîner dans notre bureau, ta bonne humeur constante et ta grande pédagogie. Merci également à Pierre Audet, qui a toujours su être là pour résoudre le moindre souci qui se présentait en RMN, et ceux qui en auront fait sauront que ça arrive plus souvent qu'on ne le souhaite ! Ta facilité dans la résolution de problèmes est déconcertante. Là encore, les activités « extra science » telles que les MOOT m'auront permis d'apprendre à connaître la personne derrière le scientifique. Merci également à François Otis pour ton aide précieuse lors de la synthèse peptidique.

Les membres du groupe Auger que j'ai eu la chance de côtoyer durant ces années les auront rendues fort plaisantes. Plus particulièrement, je garderai notamment un excellent souvenir des différents congrès auxquels j'ai pu participer, que ce soit celui de la Biophys à la Nouvelle-Orléans avec toi Justine, ou plus récemment celui à Berlin avec toi Jane, sans oublier bien sûr l'escapade parisienne d'une journée en compagnie de Gab Edison ! Merci aussi à toi MC, la conscience écolo du labo, avec Thierry bien évidemment, toujours prête à rendre service ou répondre à mes questions. Les activités du groupe me manqueront assurément, que ce soient les dîners de Noël, les gâteaux de fête, sorties bowling, tournois de volley ou encore *escape games* ! J'espère que les années et la distance ne changeront rien aux relations d'amitié qui ont vu le jour au bureau. Parmi ces membres du bureau, je tiens aussi à remercier chaleureusement Émilie et Gabrielle, stagiaires de premier cycle que j'ai eu la chance d'encadrer, et pour qui, je l'espère, ces stages auront été une belle expérience qui leur auront donné le goût de la science.

Un énorme merci à toute ma famille également, qui m'a soutenu et encouragé en tout temps, et cela depuis le tout début. Ce soutien inconditionnel m'aura permis de faire, l'esprit

libre, mon petit bout de chemin dans les études supérieures. En particulier, Papa et Maman, vous nous avez offert à tous les trois un cadre et des conditions où échouer est plus compliqué que réussir. Je sais pertinemment que vous trouvez ça normal, mais nous avons réellement eu une chance énorme, que je ne suis pas encore sûr de mesurer totalement, donc merci infiniment pour tout. Merci beaucoup aussi à Sophie & David, Victor & Julien et Papy & Mamie pour votre soutien constant malgré la distance. Sophie et Victor, le temps a passé depuis que vous m'expliquiez la RMN en licence et l'énergie cinétique au collège ! J'espère que voir mon travail écrit sera plus clair qu'une explication bancaire de ce que je fais sur FaceTime... Finalement, merci à toi, Caroline, de m'avoir supporté ces derniers mois après mes longues journées de rédaction. Ta patience et ton soutien m'auront permis de voir sereinement le bout de cette thèse. Tu m'offres chaque jour ce que je n'aurais pas pu imaginer avoir il y a encore un an. Désormais, direction New-York tous les deux pour une nouvelle page !

Avant-propos

Les travaux présentés dans cette thèse portent sur les interactions entre un peptide amyloïde, l' α -synucléine (71-82), et des membranes modèles. Plus précisément, nous avons voulu caractériser ces interactions aux niveaux structural et dynamique. L'introduction pose le cadre de cette étude, à savoir la maladie de Parkinson, dans laquelle la protéine α -synucléine est grandement impliquée. Le chapitre 1 présente plus en profondeur les différents aspects biologiques reliés à cette maladie, et présente la protéine α -synucléine ainsi que les membranes neuronales, qui, comme il sera expliqué plus tard, jouent également un rôle primordial dans le développement et l'avancement de la maladie. Le chapitre 2 a pour but de détailler la théorie, ainsi que des aspects expérimentaux, des techniques utilisées lors de ce travail de doctorat. Le chapitre 3 est un article de revue que j'ai rédigé, et qui porte sur l'étude de fragments de protéines amyloïdes par les mêmes techniques que nous avons utilisées, il fait donc office d'introduction plus poussée aux différents aspects qu'il est possible de caractériser pour les fragments de protéines amyloïdes, et met en avant les différentes forces de chaque technique présentée. Les résultats obtenus sont présentés dans les chapitres 4 à 6, sous forme de chapitre conventionnel pour le 4, et sous forme d'articles scientifiques pour les chapitres 5 et 6. L'élaboration de ces articles, autant le projet que la rédaction, a été réalisée en étroite collaboration avec mes superviseurs de recherche, ainsi qu'avec un collaborateur international pour l'article présenté au chapitre 5. La contribution des co-auteurs est détaillée ci-dessous.

Le premier article, présenté au chapitre 3, est un article de revue publié dans le journal *Biophysical Reviews* en mai 2018 (Martial, B., Lefèvre, T. & Auger, M., *Biophys. Rev.*, **2018**, *10*, 1133-1149). Cet article, que j'ai entièrement rédigé, porte sur les applications courantes de spectroscopie vibrationnelle et de résonance magnétique nucléaire de l'état solide en vue de caractériser des fragments de protéines amyloïdes de grande importance dans le processus de fibrillation, et donc dans la pathogénicité de leur protéine parent. Plus précisément, le contenu traite d'exemples récents de la littérature portant sur les techniques infrarouge, Raman, dichroïsme circulaire vibrationnel et résonance magnétique nucléaire de l'état solide, appliquées à des peptides impliqués dans les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, d'Huntington, de diabète de type II ... Les co-auteurs de cet article, Thierry Lefèvre et

Michèle Auger, ont participé au processus de révision du manuscrit avant la soumission au journal.

Le chapitre 4 présente des résultats sur l'étude du peptide AS₇₁₋₈₂ en solution. Ce chapitre permet de présenter la structure d'AS₇₁₋₈₂ dans différentes conditions, de concentration, température et force ionique notamment. Cette étude, réalisée par spectroscopie infrarouge permet de mettre en perspective les résultats présentés dans les chapitres 5 et 6, qui traitent d'interactions avec des membranes modèles. Ainsi, ce chapitre permet de s'assurer que les résultats présentés après sont bel et bien produits par les interactions membranaires, le comportement d'AS₇₁₋₈₂ en solution étant dès lors connu. Les résultats présentés dans ce chapitre sont en partie le fruit du travail de ma stagiaire de premier cycle à la session d'été 2016, Émilie Bruneau.

Le deuxième article, qui constitue le chapitre 5, est un article qui a été publié en février 2019 dans le journal *ACS Nano* (Martial, B., Lefèvre, T., Buffeteau, T. & Auger, M., *ACS Nano*, **2019**, *13*, 3232-3242). Cet article, dont j'ai fait l'entière rédaction assisté par Thierry Lefèvre, porte sur la chiralité supramoléculaire du peptide α -synucléine (71-82) en présence de membranes anioniques, étudiée par dichroïsme circulaire vibrationnel. Les résultats présentés dans cet article sont le fruit d'expériences conduites lors d'un stage international dans le laboratoire du Pr. Thierry Buffeteau à l'Université Bordeaux I, sous la supervision à distance de ma directrice de thèse. La partie expérimentale a donc été réalisée par Thierry Buffeteau et moi-même, tandis que la rédaction a été effectuée par moi-même, avec l'assistance de Thierry Lefèvre pour parfaire la manière de présenter ces résultats.

Le troisième article, retranscrit au chapitre 6, présente des résultats soumis pour publication dans le *Journal of Physical Chemistry B* le 3 février 2020 (Martial, B., Raïche-Marcoux, G., Lefèvre, T., Audet, P., Voyer, N. & Auger, M., soumis à *J. Phys. Chem. B*, **2020** au moment de l'évaluation de la thèse). Ce chapitre traite des interactions entre l' α -synucléine (71-82) et des membranes modèles, étudiées par spectroscopie infrarouge et résonance magnétique nucléaire de l'état solide. Cet article traite de l'importance de l'état physique des membranes modèles sur la structure de l' α -synucléine (71-82), et présente une caractérisation avancée de la structure de ce peptide. J'ai effectué l'intégralité de la rédaction

de cet article, assisté par Thierry Lefèvre. Gabrielle Raîche-Marcoux, stagiaire de premier cycle sous ma supervision, a participé au côté expérimental de ce projet, tant dans la préparation d'échantillons que l'analyse de données. Pierre Audet a participé à la mise en place des séquences RMN ainsi qu'au programme de simulation. Thierry Lefèvre et Michèle Auger ont participé à la mise en place du projet. Thierry Lefèvre et Normand Voyer ont participé au processus de révision du manuscrit avant soumission au journal. Entre l'évaluation de la thèse et le dépôt final, cet article a été accepté pour publication dans *J. Phys. Chem. B* le 31 mars 2020 (**2020**, *124*, 3469–3481).

Introduction

La maladie de Parkinson - Historique et statistiques

Les termes de « maladie amyloïde » ou encore « amylose » datent du 19^{ème} siècle¹. Un médecin allemand, Rudolph Virchow, étudiait des patients atteints d'une maladie responsable du durcissement et du grossissement de certains organes, tels que le cœur, le foie, la rate ou encore la langue. Dans le but d'identifier l'espèce chimique responsable, ce dernier se servit de différents colorants, dont le lugol. Celui-ci, à base d'iode, change de couleur au contact des organes touchés, laissant présager la présence d'amidon ou de glycogène². Le terme « amyloïde » a donc été établi dès cette découverte pionnière. Il trouve son origine dans la langue grecque et est formé de *amylo-* (amidon), et *-ide* (semblable).

Quelques années plus tard l'hypothèse de la réaction du lugol avec des chaînes de sucres est invalidée, et des protéines sont caractérisées comme responsables de cette coloration, tout comme en présence de rouge Congo et de thioflavine. En 1927, Paul Divry, psychiatre belge, observe que le rouge Congo permet également de teinter des plaques séniles découvertes quelques années plus tôt par Aloïs Alzheimer, qui a donné son nom à la maladie éponyme³⁻⁴. Il faut ensuite attendre les années 1970-1980, pour que le chercheur américain George Glenner réussisse à percer le mystère de ces plaques amyloïdes. Il est en effet le premier à décrire les protéines composant les plaques comme des fibres amyloïdes, dont l'amoncellement provoque l'apparition de plaques. Il décrit par ailleurs ces fibres comme étant des structures hautement hiérarchiques et très ordonnées. Il fit une découverte d'une importance capitale : les séquences des protéines n'étaient pas directement responsables de l'apparition de maladies, mais plutôt leur structure tridimensionnelle⁵⁻⁸.

La maladie de Parkinson (MP) fait partie des amyloses les plus connues et répandues, parmi lesquelles on compte le diabète de type 2, la maladie d'Huntington ou encore la maladie de Creutzfeld-Jakob, plus connue sous le nom de la maladie de la vache folle, une variante de la maladie. La MP constitue la deuxième maladie neurodégénérative la plus répandue, après celle d'Alzheimer. On estime aujourd'hui à plus de 10 millions le nombre de personnes atteintes de la MP à travers le monde. Décrite pour la première fois en 1817 par le médecin anglais James Parkinson dans *Essay on the Shaking Palsy*⁹, la MP est longtemps

demeuré un mystère pour les communautés médicale et scientifique. Il aura fallu attendre 1997, soit 180 ans, pour mettre le doigt sur la protéine responsable de la maladie : l' α -synucléine (AS)¹⁰⁻¹¹. Celle-ci fait partie d'une famille de protéines, les synucléines (avec la β - et la γ -), toutes localisées au niveau des synapses (*syn*) et des noyaux neuronaux (*nuclein*).

La MP reste encore mal comprise. Les symptômes moteurs sont pour la plupart connus, à savoir les tremblements, les troubles de postures, la rigidité des membres supérieurs et inférieurs et la lenteur dans les gestes. À ces symptômes moteurs s'ajoutent des troubles non moteurs. Parmi ceux-ci, il est possible de retrouver, entre autres, l'insomnie, l'hypersomnolence diurne, la difficulté à avaler, l'anxiété, la dépression, la vision double, les hallucinations, les troubles sexuels et la transpiration excessive. Par ailleurs, la MP fait partie des synucléopathies, maladies toutes reliées à l'accumulation pathologique d'AS et aux symptômes très similaires à ceux de la MP¹².

Les causes possibles provoquant l'apparition de cette maladie sont multiples et incertaines. Tant et si bien qu'un débat existe sur le fait de savoir si la MP cause l'apparition des symptômes ou est plutôt une conséquence d'un changement physiologique déclenché par un autre facteur. Plusieurs pistes sur les causes possibles ont vu le jour au cours des années :

- utilisation prolongée de pesticides et herbicides¹³⁻¹⁶
- exposition prolongée au monoxyde carbone¹⁷
- ingestion ou contact avec des métaux lourds¹⁸⁻¹⁹
- neurotoxine MPTP, qui déclenche immédiatement l'apparition de la MP²⁰⁻²¹

Bien que les plusieurs facteurs environnementaux et extérieurs cités ci-dessus contribuent à l'apparition de la MP, ceux-ci n'en sont pas les seuls responsables. Bien souvent, une prédisposition génétique va de pair avec ces facteurs, et sont tous les deux coresponsables de l'apparition de la maladie²²⁻²⁴.

Au niveau statistique, des études ont démontré que la MP touche plus particulièrement les hommes que les femmes, en particulier après l'âge de 80 ans, avec 1,5% des femmes affectées contre 2,1% chez les hommes. La MP se déclare généralement après

l'âge de 60 ans : entre 50 et 59 ans, 0,2% de la population est touchée, et entre 60 et 69 ans, 0,8% de la population développe la maladie²⁵.

En plus du sexe de la personne, son origine et son lieu de résidence vont également avoir un impact : les populations sud-américaines sont plus à même de développer la MP que les populations d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Australie. En effet, après 80 ans, plus de 6% de la population sud-américaine souffre de la MP, tandis que ce chiffre descend à 3% en Europe, Amérique du Nord et Australie et à 1,5% en Asie²⁵. Ces chiffres illustrent ce qui a été dit ci-dessus, c'est-à-dire que le milieu de vie, donc les facteurs environnementaux et les prédispositions génétiques, ont tous deux un rôle prépondérant dans le développement de la maladie. L'expression d'AS se fait par le gène SNCA (*synuclein alpha*). Certaines mutations génétiques entraînent l'expression de formes mutantes d'AS (A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E et A53T), toutes directement reliées à une forme familiale de la MP, et très souvent à un développement très précoce de la maladie (à partir de 20 ans dans certains cas)²⁶.

Physiologie de la MP

Tel qu'énoncé ci-dessus, la protéine responsable de la maladie, l'AS, est en très grande majorité exprimée dans les neurones dopaminergiques, et dans une proportion bien moindre dans les globules rouges²⁷⁻²⁸. Le développement progressif de la maladie entraîne la mort simultanée de ces neurones dopaminergiques. La dopamine étant un neurotransmetteur responsable de la mobilité et des mouvements dits « fins », la perte progressive de celle-ci va entraîner l'apparition des tremblements et autres raideurs musculaires. Cependant dans la plupart des cas, la MP se développe longtemps avant l'apparition des premiers symptômes. Un chiffre alarmant étaye ce propos : lorsque les premiers symptômes apparaissent, bien souvent les tremblements, 70 à 80 % des neurones dopaminergiques sont déjà morts²⁹. À partir de là, les symptômes se développent et leur ampleur croît. Il existe cinq stades à la MP, caractérisés par le degré de handicap, et classés sur l'échelle de Hoehn et Yahr³⁰ :

- Stade I : atteinte unilatérale avec handicap fonctionnel minime ou nul
- Stade II : atteinte bilatérale ou axiale, sans atteinte de l'équilibre
- Stade III : altération de l'équilibre (au changement de direction, ou quand on pousse le patient, patient debout pieds joints yeux fermés)

- Stade IV : incapacité sévère : le patient peut tenir debout et marcher sans aide mais avec de grosses difficultés
- Stade V : sans assistance, le patient ne peut se déplacer qu'en fauteuil roulant ou est grabataire

Ces symptômes apparaissent tandis que les neurones dopaminergiques, eux, disparaissent. Ces neurones sont localisés dans la *substantia nigra*, noyau du système nerveux présent dans le cerveau, et qui sert de réserve à neurones dopaminergiques.

Prévention et traitements de la maladie

Médicaments

Aujourd'hui, aucun médicament ou traitement n'est disponible pour guérir la MP. La formation des corps de Lewy semble irréversible, et la cascade d'agrégation qui s'ensuit également. Cependant, depuis le milieu du 20^{ème} siècle, de nombreux traitements ont vu le jour sans qu'aucun ne puisse toutefois guérir la MP. S'il ne fallait en retenir qu'un, ce serait la Levodopa. Cette molécule (3,4-dihydroxyphénylalanine) fut synthétisée en 1911 pour la première fois³¹, mais le milieu médical ne s'y est intéressé qu'au début des années 1960. Précurseur de la dopamine, beaucoup d'espoirs furent placés dans cette molécule pour la guérison de la MP. Malgré des premières années très encourageantes après la première mise sur le marché, les effets thérapeutiques se sont peu à peu dissipés pour ne laisser place qu'aux effets secondaires indésirables, et constater que cette molécule n'avait fait que ralentir la progression de la maladie. La Levodopa, autrement connue sous le nom de L-Dopa, reste cependant le médicament le plus utilisé pour les patients parkinsoniens, et fait partie de la liste des médicaments essentiels de l'Organisation Mondiale de la Santé. Une des nombreuses facettes actuelles de la recherche sur la MP consiste à optimiser le processus de libération de la L-Dopa dans la *substantia nigra*³²⁻³⁵. Une série d'études portant sur la L-Dopa et ses effets, ainsi que le rôle de la dopamine dans le cerveau, ont par ailleurs valu un prix Nobel de médecine au neuropharmacologue suédois Arvid Carlsson en 2000³⁶⁻³⁸.

Chirurgie

Outre les traitements médicamenteux, la chirurgie s'est révélée être une technique efficace pour traiter les symptômes. Cependant, les dernières avancées sont trop récentes pour que la communauté médicale se prononce unanimement sur leur effet vis-à-vis du possible retardement de la maladie. Par ailleurs, les opérations de chirurgies sont la plupart du temps réservées à des patients présentant des symptômes très prononcés, et pour lesquels les traitements médicamenteux n'ont presque plus ou plus aucun effet. Parmi ces opérations chirurgicales, la stimulation cérébrale profonde est celle ayant abouti aux meilleurs résultats jusqu'à présent. Cette opération reste néanmoins invasive et risquée puisqu'elle consiste à placer des électrodes dans le cerveau, au niveau du thalamus³⁹. Par la suite, le rôle de l'électrode est de bloquer les signaux nerveux provoquant les symptômes de la MP. En faisant cela, la maladie continue de progresser mais les symptômes sont dissimulés, le patient acquérant une meilleure qualité de vie. Plus de 120 000 personnes ont pu bénéficier de la stimulation cérébrale profonde, que ce soit pour traiter la MP ou d'autres troubles neurologiques comme le syndrome de la Tourette, l'addiction ou l'anorexie nerveuse⁴⁰.

Une autre technique chirurgicale consiste à greffer des cellules souches embryonnaires. Cette technique qui a vu le jour dans les années 1990⁴¹ est toujours d'actualité tant les espoirs qui sont placés en elle sont grands. En venant greffer des cellules souches embryonnaires, ou provenant directement des patients, il serait possible de diminuer grandement, voire de supprimer toute thérapie médicamenteuse. Cependant, l'état de l'art sur la greffe de cellules souches, ainsi que les questions éthiques qu'elle soulève, ne permettent pas d'envisager ce traitement à court terme, mais plutôt à moyen terme, dans les décennies à venir⁴².

Recherche actuelle : Biomarqueurs et inhibiteurs

Tel qu'énoncé plus tôt, les premiers symptômes de la MP se déclarent seulement après la disparition d'environ 70 à 80% des neurones dopaminergiques²⁹. La recherche de biomarqueurs spécifiques à la MP est donc nécessaire afin de diagnostiquer celle-ci avant même l'apparition des symptômes, pour pouvoir traiter les patients beaucoup plus tôt⁴³. Parmi les origines possibles de la MP, l'hypothèse des intestins comme point de départ a vu

le jour ces dernières années⁴⁴⁻⁴⁶. Plus particulièrement, l'apparition d'agrégats se ferait dans le système nerveux intestinal. Ces agrégats parviendraient ensuite à traverser la barrière hémato-encéphalique pour venir faire office de noyaux de nucléation au niveau des neurones dopaminergiques où se trouve l'AS. Cette incertitude concernant le point de départ de la maladie complique la recherche de biomarqueurs. Plusieurs pistes pouvant mener à déceler la maladie très tôt, voire avant même son développement, sont explorées, avec principalement l'identification de facteurs génétiques sur le gène SNCA⁴⁷ et la quantification de certaines formes d'AS dans le fluide cébrospinal⁴⁸⁻⁴⁹, entre autres⁵⁰⁻⁵⁵. La difficulté de réunir des panels uniformes de patients parkinsoniens dans le cadre d'études cliniques ralentit considérablement l'identification de biomarqueurs significatifs.

Une autre voie de la recherche actuelle vise à créer des inhibiteurs d'agrégation⁵⁶. L'objectif de ce pan de la recherche vise à synthétiser des molécules avec des propriétés d'inhibition sous-stœchiométrique⁵⁷. Régulièrement, les inhibiteurs proposés proviennent de formes dérivées de l'AS, auquel cas la grande homologie entre les séquences de l'inhibiteur et d'AS permet une liaison stabilisant la forme monomérique d'AS⁵⁷⁻⁶¹. Des molécules organiques naturelles ou synthétiques font également l'objet d'études en raison de leur capacités d'inhibition : la nortriptyline⁶², le curcuma⁶³, le mannitol⁶⁴ et certains composés polyphénoliques⁶⁵⁻⁶⁹, entre autres⁷⁰⁻⁷³.

Les essais cliniques : une dernière étape difficile à franchir

Il est légitime de se demander pourquoi, et ce malgré la pléthore de molécules prometteuses visant à la neuroprotection des patients parkinsoniens, les soignants sont toujours en attente d'un médicament efficace sur le long terme. La plupart des molécules proposées montrent des résultats prometteurs, mais le passage aux essais cliniques demeure l'étape où beaucoup échouent, et cela pour plusieurs raisons. Ce point n'étant que très peu soulevé dans la littérature scientifique, Pr. Jon Stoessl, directeur du département de neurologie à *University of British Columbia*, détaille dans un billet sur le blog *World Parkinson Congress* quelques raisons expliquant ces échecs à répétition⁷⁴.

- (i) Le premier point soulevé est la complexité de la maladie : plusieurs formes de la MP existent, et trouvent leur origine dans des mécanismes très disparates,

que ce soit des trafic et recyclage de protéines anormaux, des défauts dans le signallement cellulaire lié au calcium, une inflammation du cerveau, etc. Ainsi, et puisqu'il est probable que différents mécanismes soient responsables de l'apparition de la MP chez chaque personne, il est probable qu'il faille un « cocktail » (pour citer l'auteur du billet) pour être en mesure de traiter les multiples facteurs en jeu. Dans le même ordre d'idée, ce « cocktail » devrait *in fine* être personnalisé pour chaque patient.

- (ii) Le second point abordé est la difficulté rencontrée lors du passage des modèles animaux vers les essais cliniques sur patients. Jusqu'à récemment, les modèles animaux contractaient la MP après injection de MPTP qui dégrade de manière sélective les neurones dopaminergiques. Bien que ces modèles soient appropriés pour tester les molécules visant à réduire les symptômes, ils ne réussissent pas à refléter convenablement la progression de la MP. Plus récemment, d'autres types de modèles sont apparus, notamment des modèles chez qui l'AS est surexprimée (via mutation génétique ou administration exogène de fibrilles d'AS). Ces derniers semblent plus robustes et reflèteraient mieux de la réalité de la maladie, mais il y a encore un manque de recul vis-à-vis de ceux-ci.
- (iii) L'efficacité de nouvelles thérapies est encline à être mal interprétée. Les méthodes actuelles d'évaluation consistent à mesurer des fonctions motrices chez les patients. Ces méthodes sont prédisposées à provoquer des erreurs, puisque l'évaluation effectuée par un clinicien est sujette à la subjectivité, en plus de la variabilité sur une journée des symptômes d'un patient, sans compter le possible effet placebo que provoque un essai clinique. Bien que de nouvelles technologies, à savoir des senseurs, puissent contrevenir à cette subjectivité, le nombre de patients nécessaires pour amoindrir ces erreurs systématiques, ainsi que la longue période de suivi des patients rendent ces essais cliniques extrêmement complexes. Des biomarqueurs permettraient ici une évaluation et une quantification fiables de la MP, et ainsi des essais cliniques plus robustes, notamment lors de la sélection de patients, pour

pouvoir les répartir dans différentes catégories selon le stade d'avancement physiologique de la MP. L'imagerie utilisée pour faire le suivi de l'avancement de la maladie se focalise sur les neurones dopaminergiques, mais ceux-ci ne sont certainement pas les seuls témoins de l'avancement de la MP.

- (iv) Le quatrième point abordé n'est pas propre à la MP. Il est ici question que, malgré une très bonne planification d'un essai clinique avec une molécule très prometteuse, la molécule pourrait être consommée en dehors du cerveau et convertie en un métabolite inactif, ou alors ne parviendrait pas à traverser la barrière hémato-encéphalique. Il est également possible que la molécule d'intérêt réussisse à se rendre là où elle est supposée arriver, mais réagisse différemment, notamment dû à des interférences avec des espèces chimiques propres à la maladie et absentes des modèles animaux, comme ça a récemment été le cas, où différentes formes d'AS ont interféré avec la voie de signalisation du GDNF (*Glial cell-line derived neurotrophic factor*)⁷⁵.
- (v) Le cinquième et dernier point souligné par l'auteur concerne la grande difficulté inhérente aux essais cliniques. Premièrement, la mesure des résultats, dans le cas de la MP, est particulièrement compliquée, comme expliqué plus haut. Deuxièmement, de nombreux traitements visant la neuroprotection ont eu des effets symptomatiques indésirables persistants. D'autres traitements étaient basés sur des mesures de biomarqueurs, dont l'expression pouvait être influencée par le traitement, mais sans que celui-ci ait d'impact sur la maladie. Finalement, la grande variabilité de la MP d'un patient à l'autre, couplée à l'effet placebo et aux mesures basées pour la plupart sur des fonctions motrices, sont autant d'éléments à prendre en compte pour réaliser la difficulté de mettre en place des essais cliniques fiables pour la MP.

Références

1. Iadanza, M. G.; Jackson, M. P.; Hewitt, E. W.; Ranson, N. A.; Radford, S. E., A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 755-773.

2. Sipe, J. D.; Cohen, A. S., Review: History of the amyloid fibril. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 88-98.
3. Howie, A. J.; Brewer, D. B., Optical properties of amyloid stained by Congo red: History and mechanisms. *Micron* **2009**, *40*, 285-301.
4. Alzheimer, A., Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt* **1906**, *23*, 1129-1136.
5. Glenner, G. G.; Eanes, E. D.; Bladen, H. A.; Linke, R. P.; Termine, J. D., β -Pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. *J. Histochem. Cytochem.* **1974**, *22*, 1141-1158.
6. Glenner, G. G.; Ein, D.; Eanes, E. D.; Bladen, H. A.; Terry, W.; Page, D. L., Creation of « amyloid » fibrils from Bence Jones proteins in vitro. *Science* **1971**, *174*, 712-714.
7. Glenner, G. G.; Wong, C. W., Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *120*, 885-890.
8. Termine, J. D.; Eanes, E. D.; Ein, D.; Glenner, G. G., Infrared spectroscopy of human amyloid fibrils and immunoglobulin proteins. *Biopolymers* **1972**, *11*, 1103-1113.
9. Parkinson, J., An essay on the shaking palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **2002**, *14*, 223-236.
10. Spillantini, M. G.; Crowther, R. A.; Jakes, R.; Hasegawa, M.; Goedert, M., α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6469-6473.
11. Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M., α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **1997**, *388*, 839-840.
12. Tamgüney, G.; Korczyn, A. D., A critical review of the prion hypothesis of human synucleinopathies. *Cell and Tissue Research* **2018**, *373*, 213-220.
13. McCormack, A. L.; Thiruchelvam, M.; Manning-Bog, A. B.; Thiffault, C.; Langston, J. W.; Cory-Slechta, D. A.; Di Monte, D. A., Environmental risk factors and Parkinson's disease: Selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide Paraquat. *Neurobiol. Dis.* **2002**, *10*, 119-127.
14. Rajput, A. H.; Uitti, R. J.; Stern, W.; Laverty, W.; O'Donnell, K.; O'Donnell, D.; Yuen, W. K.; Dua, A., Geography, drinking water chemistry, pesticides and herbicides and the etiology of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* **1987**, *14*, 414-418.
15. Gorell, J. M.; Johnson, C. C.; Rybicki, B. A.; Peterson, E. L.; Richardson, R. J., The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* **1998**, *50*, 1346.
16. Semchuk, K. M.; Love, E. J.; Lee, R. G., Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology* **1992**, *42*, 1328.
17. Lai, C.-Y.; Chou, M.-C.; Lin, C.-L.; Kao, C.-H., Increased risk of Parkinson disease in patients with carbon monoxide intoxication: a population-based cohort study. *Medicine* **2015**, *94*, e869-e869.
18. Montgomery, E. B., Heavy metals and the etiology of Parkinson's disease and other movement disorders. *Toxicology* **1995**, *97*, 3-9.
19. Geir, B.; Vera, S.; Mauricio, A. U.; Maryam, D.; Salvatore, C.; Joachim, M., Metals and Parkinson's disease: mechanisms and biochemical processes. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 2198-2214.
20. Kopin, I. J.; Markey, S. P., MPTP toxicity: Implications for research in Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **1988**, *11*, 81-96.
21. Langston, W. J., MPTP and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **1985**, *8*, 79-83.
22. Kurth, J. H.; Kurth, M. C.; Poduslo, S. E.; Schwankhaus, J. D., Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **1993**, *33*, 368-372.

23. Lesnick, T. G.; Papapetropoulos, S.; Mash, D. C.; Ffrench-Mullen, J.; Shehadeh, L.; de Andrade, M.; Henley, J. R.; Rocca, W. A.; Ahlskog, J. E.; Maraganore, D. M., A genomic pathway approach to a complex disease: Axon guidance and Parkinson disease. *PLOS Genet.* **2007**, *3*, e98.
24. Allam, M. F.; Del Castillo, A. S.; Navajas, R. F.-C., Parkinson's disease risk factors: genetic, environmental, or both? *Neurol. Res.* **2005**, *27*, 206-208.
25. Pringsheim, T.; Jette, N.; Frolkis, A.; Steeves, T. D. L., The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* **2014**, *29*, 1583-1590.
26. Flagmeier, P.; Meisl, G.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M.; Buell, A. K.; Galvagnion, C., Mutations associated with familial Parkinson's disease alter the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 10328-10333.
27. Nakai, M.; Fujita, M.; Waragai, M.; Sugama, S.; Wei, J.; Akatsu, H.; Ohtaka-Maruyama, C.; Okado, H.; Hashimoto, M., Expression of α -synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *358*, 104-110.
28. Fauvet, B.; Mbefo, M. K.; Fares, M.-B.; Desobry, C.; Michael, S.; Ardah, M. T.; Tsika, E.; Coune, P.; Prudent, M.; Lion, N., et al., α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15345-15364.
29. Cookson, M. R., α -Synuclein and neuronal cell death. *Mol. Neurodegener.* **2009**, *4*, 9.
30. Hoehn, M. M.; Yahr, M. D., Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology* **1967**, *17*, 427-442.
31. Funk, C., LXV.—Synthesis of dl-3 : 4-dihydroxyphenylalanine. *J. Chem. Soc.* **1911**, *99*, 554-557.
32. LeWitt, P. A.; Fahn, S., Levodopa therapy for Parkinson disease. *Neurology* **2016**, *86*, S3.
33. Abbott, A., Levodopa: the story so far. *Nature* **2010**, *466*, S6.
34. Fahn, S., The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. *Mov. Disord.* **2015**, *30*, 4-18.
35. Fahn, S., The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **2008**, *23*, S497-S508.
36. Andén, N. E.; Carlsson, A.; Dahlström, A.; Fuxe, K.; Hillarp, N. Å.; Larsson, K., Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sciences* **1964**, *3*, 523-530.
37. Carlsson, A.; Waldeck, B., A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine.). *Acta Physiol. Scand.* **1958**, *44*, 293-298.
38. Kehr, W.; Carlsson, A.; Lindqvist, M., A method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) in brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1972**, *274*, 273-280.
39. Benabid, A. L., Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2003**, *13*, 696-706.
40. Graat, I.; Figeé, M.; Denys, D., The application of deep brain stimulation in the treatment of psychiatric disorders. *Int. Rev. Psychiatry* **2017**, *29*, 178-190.
41. Goetz, C. G.; Stebbins, G. T.; Klawans, H. L.; Koller, W. C.; Grossman, R. G.; Bakay, R. A. E.; Penn, R. D., United Parkinson Foundation Neurotransplantation Registry on adrenal medullary transplants. *Neurology* **1991**, *41*, 1719.
42. Henchcliffe, C.; Parmar, M., Repairing the brain: Cell replacement using stem cell-based technologies. *J. Parkinson's Dis.* **2018**, *8*, S131-S137.
43. Miller, D. B.; O'Callaghan, J. P., Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. *Metab., Clin. Exp.* **2015**, *64*, S40-S46.

44. Chandra, R.; Hiniker, A.; Kuo, Y.-M.; Nussbaum, R. L.; Liddle, R. A., α -Synuclein in gut endocrine cells and its implications for Parkinson's disease. *JCI Insight* **2017**, *2*.
45. Liddle, R. A., Parkinson's disease from the gut. *Brain Res.* **2018**, *1693*, 201-206.
46. Forsyth, C. B.; Shannon, K. M.; Kordower, J. H.; Voigt, R. M.; Shaikh, M.; Jaglin, J. A.; Estes, J. D.; Dodiya, H. B.; Keshavarzian, A., Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e28032.
47. Guella, I.; Evans, D. M.; Szu-Tu, C.; Nosova, E.; Bortnick, S. F.; Group, S. C. S.; Goldman, J. G.; Dalrymple-Alford, J. C.; Geurtsen, G. J.; Litvan, I., et al., α -synuclein genetic variability: A biomarker for dementia in Parkinson disease. *Ann. Neurol.* **2016**, *79*, 991-999.
48. Parnetti, L.; Castrioto, A.; Chiasserini, D.; Persichetti, E.; Tambasco, N.; El-Agnaf, O.; Calabresi, P., Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2013**, *9*, 131.
49. Maass, F.; Schulz, I.; Lingor, P.; Mollenhauer, B.; Bähr, M., Cerebrospinal fluid biomarker for Parkinson's disease: An overview. *Mol. Cell Neurosci.* **2019**, *97*, 60-66.
50. Chen-Plotkin, A. S.; Albin, R.; Alcalay, R.; Babcock, D.; Bajaj, V.; Bowman, D.; Buko, A.; Cedarbaum, J.; Chelsky, D.; Cookson, M. R., et al., Finding useful biomarkers for Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*, eaam6003.
51. Jin, H.; Kanthasamy, A.; Anantharam, V.; Kanthasamy, A. G. In *Biomarkers in Toxicology (Second Edition)*; Gupta, R. C., Ed.; Academic Press: 2019; pp 895-909.
52. Adler, C. H.; Dugger, B. N.; Hinni, M. L.; Lott, D. G.; Driver-Dunckley, E.; Hidalgo, J.; Henry-Watson, J.; Serrano, G.; Sue, L. I.; Nagel, T., et al., Submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *Neurology* **2014**, *82*, 858.
53. Wang, N.; Gibbons, C. H.; Lafo, J.; Freeman, R., α -Synuclein in cutaneous autonomic nerves. *Neurology* **2013**, *81*, 1604.
54. Wang, X.; Yu, S.; Li, F.; Feng, T., Detection of α -synuclein oligomers in red blood cells as a potential biomarker of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **2015**, *599*, 115-119.
55. Schindlbeck, K. A.; Eidelberg, D., Network imaging biomarkers: insights and clinical applications in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 629-640.
56. Eisele, Y. S.; Monteiro, C.; Fearn, C.; Encalada, S. E.; Wiseman, R. L.; Powers, E. T.; Kelly, J. W., Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2015**, *14*, 759-780.
57. Agerschou, E. D.; Flagmeier, P.; Saridaki, T.; Galvagnion, C.; Komnig, D.; Heid, L.; Prasad, V.; Shaykhalishahi, H.; Willbold, D.; Dobson, C. M., et al., An engineered monomer binding-protein for α -synuclein efficiently inhibits the proliferation of amyloid fibrils. *eLife* **2019**, *8*, e46112.
58. Cheruvara, H.; Allen-Baume, V. L.; Kad, N. M.; Mason, J. M., Intracellular screening of a peptide library to derive a potent peptide inhibitor of α -synuclein aggregation. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 7426-7435.
59. Brown, J. W. P.; Buell, A. K.; Michaels, T. C. T.; Meisl, G.; Carozza, J.; Flagmeier, P.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M.; Galvagnion, C., β -Synuclein suppresses both the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation via competitive binding to surfaces. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36010.
60. Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., Design of an N-methylated peptide inhibitor of α -synuclein aggregation guided by solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7873-7881.
61. Bodles, A. M.; El-Agnaf, O. M. A.; Greer, B.; Guthrie, D. J. S.; Irvine, G. B., Inhibition of fibril formation and toxicity of a fragment of α -synuclein by an N-methylated peptide analogue. *Neurosci. Lett.* **2004**, *359*, 89-93.
62. Collier, T. J.; Srivastava, K. R.; Justman, C.; Grammatopoulous, T.; Hutter-Paier, B.; Prokesh, M.; Havas, D.; Rochet, J.-C.; Liu, F.; Jock, K., et al., Nortriptyline inhibits

- aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein by enhancing reconfiguration of the monomeric form. *Neurobiol. Dis.* **2017**, *106*, 191-204.
63. Singh, P. K.; Kotia, V.; Ghosh, D.; Mohite, G. M.; Kumar, A.; Maji, S. K., Curcumin modulates α -synuclein aggregation and toxicity. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 393-407.
 64. Paul, A.; Zhang, B.-D.; Mohapatra, S.; Li, G.; Li, Y.-M.; Gazit, E.; Segal, D., Novel mannitol-based small molecules for inhibiting aggregation of α -synuclein amyloids in Parkinson's disease. *Front. Mol. Biosci.* **2019**, *6*.
 65. Caruana, M.; Högen, T.; Levin, J.; Hillmer, A.; Giese, A.; Vassallo, N., Inhibition and disaggregation of α -synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 1113-1120.
 66. Bieschke, J.; Russ, J.; Friedrich, R. P.; Ehrnhoefer, D. E.; Wobst, H.; Neugebauer, K.; Wanker, E. E., EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 7710-7715.
 67. Ardah, M. T.; Paleologou, K. E.; Lv, G.; Abul Khair, S. B.; Kazim, A. S.; Minhas, S. T.; Al-Tel, T. H.; Al-Hayani, A. A.; Haque, M. E.; Eliezer, D., et al., Structure activity relationship of phenolic acid inhibitors of α -synuclein fibril formation and toxicity. *Front. Aging Neurosci.* **2014**, *6*.
 68. Takahashi, R.; Ono, K.; Takamura, Y.; Mizuguchi, M.; Ikeda, T.; Nishijo, H.; Yamada, M., Phenolic compounds prevent the oligomerization of α -synuclein and reduce synaptic toxicity. *J. Neurochem.* **2015**, *134*, 943-955.
 69. Caruana, M.; Neuner, J.; Högen, T.; Schmidt, F.; Kamp, F.; Scerri, C.; Giese, A.; Vassallo, N., Polyphenolic compounds are novel protective agents against lipid membrane damage by α -synuclein aggregates in vitro. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2012**, *1818*, 2502-2510.
 70. Price, D. L.; Koike, M. A.; Khan, A.; Wrasidlo, W.; Rockenstein, E.; Masliah, E.; Bonhaus, D., The small molecule alpha-synuclein misfolding inhibitor, NPT200-11, produces multiple benefits in an animal model of Parkinson's disease. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16165.
 71. Kurnik, M.; Sahin, C.; Andersen, C. B.; Lorenzen, N.; Giehm, L.; Mohammad-Beigi, H.; Jessen, C. M.; Pedersen, J. S.; Christiansen, G.; Petersen, S. V., et al., Potent α -synuclein aggregation inhibitors, identified by high-throughput screening, mainly target the monomeric state. *Cell. Chem. Biol.* **2018**, *25*, 1389-1402.e9.
 72. Temsamani, H.; Krisa, S.; Decossas-Mendoza, M.; Lambert, O.; Mérillon, J.-M.; Richard, T., Piceatannol and other wine stilbenes: A pool of inhibitors against α -synuclein aggregation and cytotoxicity. *Nutrients* **2016**, *8*.
 73. Jha, N. N.; Kumar, R.; Panigrahi, R.; Navalkar, A.; Ghosh, D.; Sahay, S.; Mondal, M.; Kumar, A.; Maji, S. K., Comparison of α -synuclein fibril inhibition by four different amyloid inhibitors. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8*, 2722-2733.
 74. Stoessl, A. J., Why have we failed in our attempts to develop a neuroprotective therapy for parkinson's? How can we improve this situation? In *World Parkinson Congress*, www.worldpdcongress.org/home/2018/5/14/h9kmk04picf604vzz21j6va7x3tm6o, 2018.
 75. Kirkeby, A.; Barker, R. A., Parkinson disease and growth factors — is GDNF good enough? *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15*, 312-314.

Chapitre 1 : L' α -synucléine, une protéine amyloïde

1.1 Les protéines amyloïdes

Les protéines amyloïdes sont très souvent directement reliées à une maladie. L'AS pour PD, la β -amyloïde pour AD, l'huntingtine pour la maladie d'Huntington, l'IAPP pour le diabète de type II... Cependant il est important de noter que la forme amyloïde de protéines n'a pas toujours une connotation pathologique, comme le démontre le fait que certains organismes (bactéries, champignons) utilisent cette structure à des fins fonctionnelles¹, et même que certains nouveaux matériaux sont basés sur des structures amyloïdes, tant leur régularité structurale est remarquable².

La structure amyloïde présente des caractéristiques structurales et morphologiques bien particulières. Les fibrilles amyloïdes formées par les différentes protéines énoncées ci-dessus ont toutes comme particularité d'être composées de feuillets- β croisés (ou *cross β -sheet* en anglais), qui consistent en des brins- β orientés perpendiculairement à l'axe de la fibrille. De la même manière, la plupart des fibrilles amyloïdes ont des dimensions similaires : un diamètre de l'ordre de la dizaine de nm, et une longueur entre la centaine de nm et le μ m. La figure 1.1 illustre les étapes et structures précédant la fibrille amyloïde. Le point de départ est bien souvent une protéine sous forme monomérique non structurée en solution, qui va former un noyau de nucléation avec d'autres monomères, ce qui va mener à la formation d'oligomères, puis de protofibrilles et finalement de fibrilles. L'incertitude règne sur la ou les formes (et/ou les processus) toxiques. Le plus probable reste que plusieurs formes des protéines amyloïdes présentent une toxicité. Ainsi, il a été prouvé que l'AS est toxique sous ses formes monomérique, oligomérique et fibrillaire³.

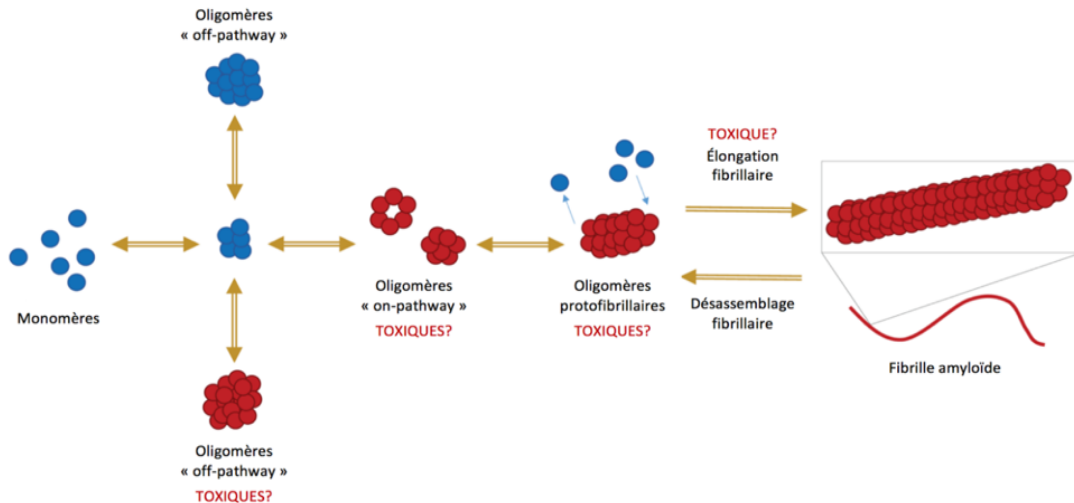


Figure 1.1. Processus d'agrégation typique et les différentes espèces formées au cours des différentes étapes (monomères, oligomères, protofibrilles et fibrilles). Ce schéma montre que différentes espèces/processus peuvent constituer la forme toxique de la protéine. Adapté de Roberts *et al.*⁴ (libre accès)

1.2 α -synucléine : pathologie et physiologie

1.2.1 Pathologie

Dans le cas de la MP, cette agrégation a lieu dans la *substantia nigra*, ce qui a pour effet de réduire cette dernière, parallèlement à la perte des neurones dopaminergiques, comme illustré à la figure 1.2. Par ailleurs, l'agrégation d'AS va provoquer l'apparition de corps de Lewy, amas de fibrilles composées d'AS, visibles à la figure 1.2.

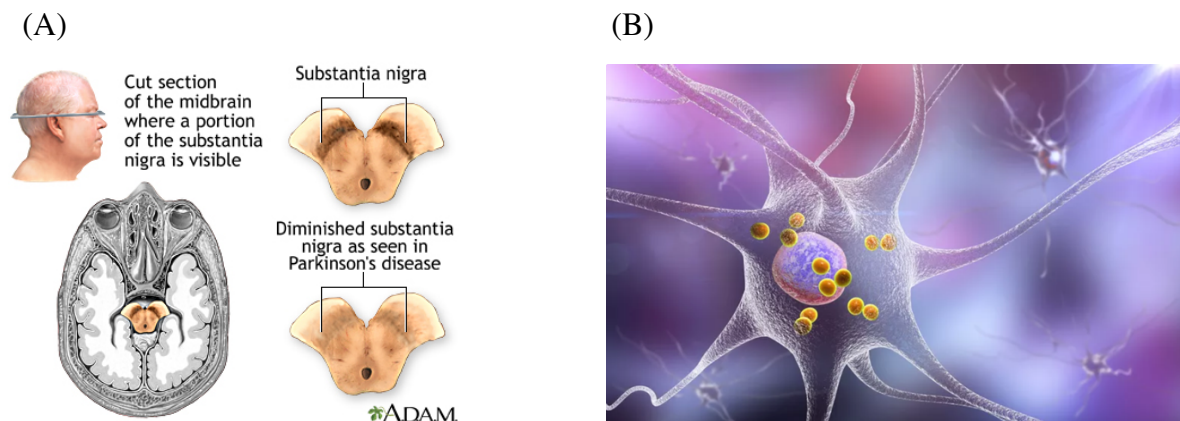


Figure 1.2. (A) Illustration d'une coupe de la *substantia nigra*, réserve à neurones dopaminergiques chez une personne saine (haut) et une personne atteinte de la MP (bas). Figure reprise de Medline Plus⁵. (B) Illustration d'un neurone comportant des corps de Lewy, représentés par les agrégats orange présents dans le cytoplasme. Figure reprise de VeryWellHealth⁶

La diminution de neurones dopaminergiques provoquée par l'accumulation pathologique d'AS est observable chez les patients atteints de la MP. La figure 1.3 compare la densité de neurones dopaminergiques chez une personne en santé, chez un patient au premier stade la MP et chez un patient atteint à un stade avancé de la MP, grâce aux techniques d'imagerie médicale de tomographie par émission monophotonique et par émission de positrons⁷.

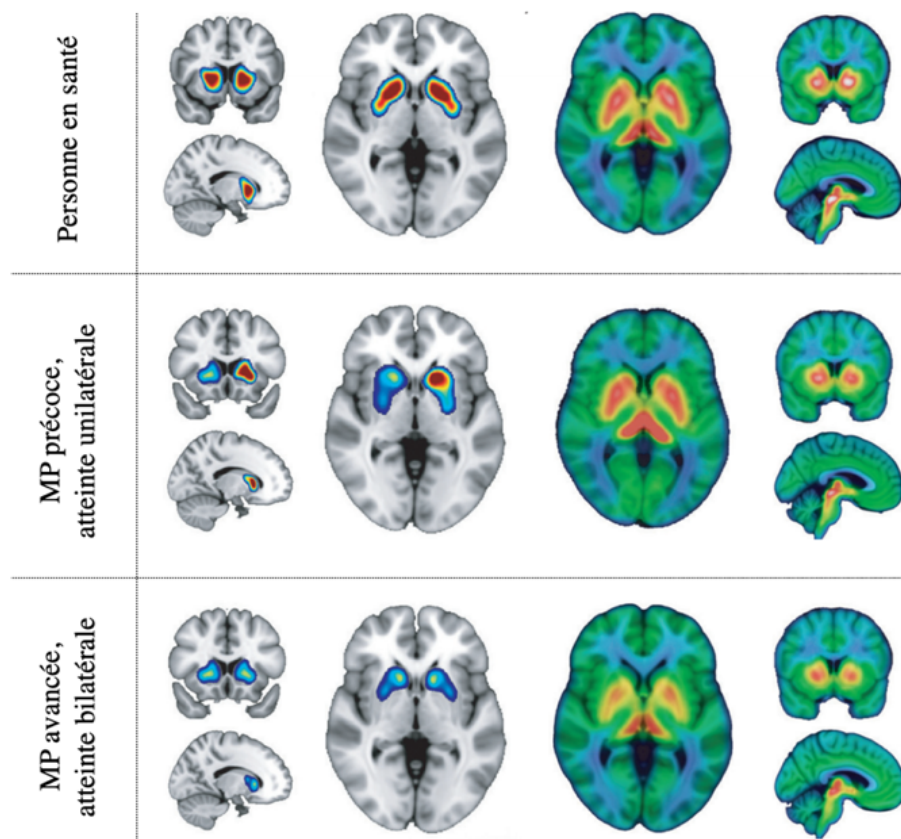


Figure 1.3. Tomographie par émission monophotonique (gauche, rouge densité maximale, bleu densité minimale) et tomographie par émission de positrons (droite, blanc densité maximale, jaune densité minimale) chez une personne saine (haut), un patient atteint de la MP à un stade précoce d'avancement de la maladie (milieu), et un patient avec une MP à un stade avancé (bas). Modifié à partir de Wilson *et al.*⁷ avec permission, Copyright © 2019 Elsevier.

Ces images permettent de constater l'ampleur de la perte de neurones dopaminergiques chez les patients parkinsoniens. Elles mettent également en avant des preuves expliquant la mono-latéralité de la maladie pendant le premier stade de la MP, à savoir une neurodégénérescence plus rapide d'un côté du cerveau que de l'autre, ce qui est flagrant à la figure 1.3 dans la colonne de gauche sur la ligne du milieu.

1.2.2 Structure primaire de l'AS

L'AS est une protéine de 140 acides aminés et est majoritairement exprimée dans les neurones dopaminergiques. Identifiée à la fin des années 1990 comme étant la composante principale des corps de Lewy retrouvés dans le cerveau de patients autopsiés⁸⁻⁹, cette protéine est désormais plus connue. Elle a été caractérisée comme étant non structurée et monomérique en solution dans une situation physiologique¹⁰⁻¹¹. Cependant il est important de noter que quelques études ont tenté de prouver qu'elle pourrait se trouver sous forme de tétramères riches en hélice- α en solution¹², et ont émis l'hypothèse qu'une déstabilisation de ces tétramères mènerait à l'apparition de monomères, permettant ainsi le début de la cascade amyloïde. Cependant, ces résultats ont fait l'objet d'une controverse¹³⁻¹⁴, et cette structure tétramérique n'est pas aussi relayée qu'elle promettait de l'être, les chercheurs choisissant plutôt de décrire AS comme étant majoritairement non structurée en solution.

L'AS est composée de trois parties : la région N-terminale (résidus 1-60), la NAC (*non- β -amyloid component*, résidus 61-95) et la région C-terminale (résidus 96-140). La région N-terminale contient une séquence répétitive très importante dans le processus de liaison aux membranes neuronales, via la formation de deux hélices- α amphiphiles¹⁵⁻¹⁷, et a également un rôle d'inhibiteur d'agrégation¹⁸. La partie centrale, la NAC, est une région très hydrophobe (17 résidus hydrophobes sur 35). Elle porte le nom de *non- β -amyloid component* puisqu'elle a d'abord été identifiée dans des agrégats prélevés lors d'autopsies de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, là où les chercheurs s'attendaient à trouver la *β -amyloid*¹⁹⁻²¹, avant que ces résultats ne soient réfutés²². Cette séquence se trouve au cœur des oligomères et fibrilles formés par l'AS. La région C-terminale est la région ayant le moins d'impact sur le comportement de l'AS, que ce soit en situation physiologique ou pathologique. Cette région, positivement chargée et peu conservée entre les isoformes de la protéine (α , β et γ) ne fait pas partie intégrante du cœur en feuillet- β croisé des fibrilles formées par AS, ne se lie pas non plus aux membranes en situation physiologique (ou se lie dans des conditions particulières²³) et reste non structurée dans ces deux situations^{17,24}. Cependant, le C-terminal semble jouer un rôle de chaperon vis-à-vis de l'agrégation²⁵⁻²⁹.

Aujourd'hui, la fonction précise de l'AS dans la *substantia nigra* reste incertaine, bien que plusieurs études ont démontré qu'elle jouerait certainement un rôle dans la plasticité synaptique, et dans le relargage de neurotransmetteurs³⁰. Cependant, l'absence de protéines homologues de l'AS dans des organismes modèles (mouches, vers, levures) semble indiquer que celle-ci n'est pas indispensable à la plasticité et à la communication synaptique³¹.

1.2.3 Processus de fibrillation

L'AS, comme la plupart des protéines amyloïdes, forme des fibrilles pouvant adopter différentes morphologies, appelées polymorphes. Le polymorphisme complique l'étude de ces protéines, étant donné qu'isoler un polymorphe, ou dans le meilleur des cas, réussir à n'en former qu'un, est bien souvent très complexe. Les problèmes posés par le polymorphisme des protéines amyloïdes, ainsi que des exemples de la littérature, sont détaillés dans le chapitre 3 de cette thèse.

Plusieurs études ont mis en avant le polymorphisme de l'AS³²⁻³⁷. Parmi celles-ci, une en particulier a démontré que deux polymorphes présentaient deux toxicités différentes³³, ce qui a également été prouvé pour l'A β ³⁸. Ce polymorphisme représente un véritable défi quand on en vient à travailler avec les fibrilles, notamment au niveau structural. Cette propriété des protéines amyloïdes ralentit considérablement l'avancée de la recherche tant fondamentale³⁹, qu'appliquée⁴⁰. La formation de fibrilles amyloïdes *in vitro* est notamment très sensible aux paramètres expérimentaux suivants : température, force ionique, agitation, pH et concentration⁴¹.

1.2.4 Interactions membranaires

L'AS est dans son environnement physiologique constamment entourée de membranes neuronales. Son rôle présumé dans la régulation du relargage de dopamine est directement relié à ces interactions membranaires. Cette liaison aux membranes neuronales, et notamment aux microvésicules neuronales se fait via la formation d'hélices- α amphiphiles^{17,42-43}, tel qu'illustré à la figure 1.4. Il est cependant important de noter qu'il existe un équilibre entre la forme non structurée en solution et la forme hélicoïdale liée aux membranes anioniques, en faveur de la forme non structurée. Plusieurs éléments tendent à confirmer que l'AS est impliquée dans la libération de dopamine au niveau des synapses, via

la liaison à des vésicules synaptiques : l'AS est essentielle en vue de l'assemblage du complexe SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*), qui permet l'ancrage puis la fusion de vésicules synaptiques aux membranes présynaptiques des neurones⁴⁴⁻⁴⁸. Cependant, d'autres fonctions sont proposées pour l'AS : régulation des niveaux de glucose⁴⁹⁻⁵², rôle d'antioxydant⁵³⁻⁵⁴, rôle de neuroprotecteur⁵⁵, ou encore rôle dans la synthèse de dopamine⁵⁶⁻⁵⁷.

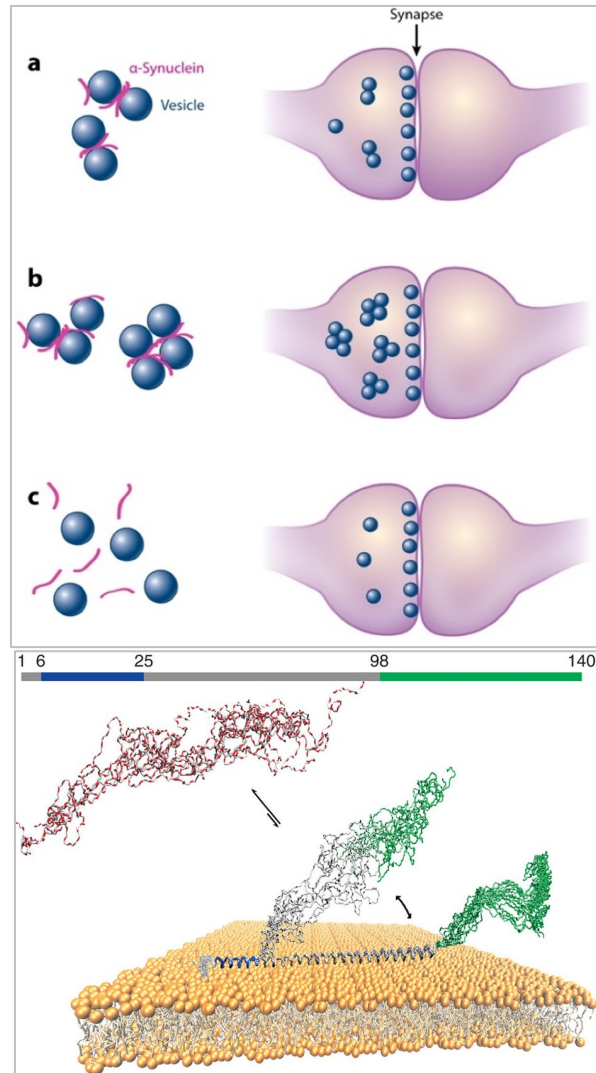


Figure 1.4. En haut, régulation des réserves de microvésicules (a) Situation physiologique : régulation de la quantité de microvésicules se liant à la membrane synaptique, par le biais de complexes SNARE, lors du relargage de dopamine, (b, c) Sous des conditions altérant les propriétés d'AS, la compartimentation des vésicules peut être augmentée (b) ou diminuée (c), modifiant ainsi les cinétiques d'exocytose. Figure tirée de Auluck *et al.*⁵⁸ avec permission, Copyright © 2010, Annual Reviews. En bas, illustration de la liaison membranaire d'AS en situation physiologique, sous forme d'hélice- α . Figure tirée de Fusco *et al.*¹⁷ avec permission, Copyright © 2014, Springer Nature.

Les membranes sont donc impliquées dans la fonction physiologique de l'AS. Cependant, les membranes sont considérées comme une surface propice à induire l'agrégation pathologique de manière générale pour les protéines amyloïdes⁵⁹⁻⁶⁰, et donc pour l'AS⁶¹⁻⁶⁶. En effet, il a été observé que la formation d'agrégats pathologiques d'AS peut provenir d'un changement de structure ayant pour origine les hélices- α liées aux membranes⁶⁷. De plus, les membranes ayant une composition très riche en phospholipides, protéines, sucres (...) ⁶⁸, une multitude d'interactions entre l'AS et d'autres composants membranaires peuvent avoir lieu. Des modifications au niveau membranaire pourraient également être la cause de l'agrégation de l'AS. Par exemple, une dégradation oxydative des phospholipides polyinsaturés entraîne l'agrégation de l'AS⁶⁹, tandis que d'un autre côté, l'AS oligomérique favorise la peroxydation de ces mêmes phospholipides⁷⁰. Dans le même temps, l'AS induit des défauts dans ces membranes en venant extraire des lipides de celles-ci⁷¹, et a même une affinité pour les défauts existants à la surface membranaire⁷². Dans une situation physiologique, cette affinité permettrait la stabilisation des membranes, et par la même occasion jouerait un rôle dans la plasticité synaptique⁷³.

1.3 Membranes biologiques

Les membranes cellulaires constituent une barrière entre l'intérieur de la cellule, le cytoplasme, et l'extérieur de la cellule. En plus de jouer le rôle de barrière, les membranes sont le lieu d'échanges moléculaires et ioniques constants qui permettent aux cellules de remplir leurs fonctions. Les membranes sont des assemblages biologiques hautement complexes, tant par leur composition intrinsèque, que leurs fonctions et dynamiques.

1.3.1 Composition des membranes neuronales

Les membranes neuronales ne font pas exception, et sont elles aussi très complexes. Leur composition est riche en phospholipides, protéines membranaires, cholestérol et autres glycolipides. Ainsi, une vésicule synaptique typique va comporter plus de 100 protéines responsables du trafic cellulaire, plus de 30 protéines de transport/canal, plus de 10 protéines cytosquelettiques, 20 protéines de surface et 17 protéines responsables de la signalisation⁶⁸. En plus de la grande diversité protéique, une pléthore de phospholipides composent la membrane en elle-même via la formation d'une bicouche. La figure 1.5 illustre cette

composition. Les vésicules synaptiques constituent la pierre angulaire du trafic membranaire. Le transport de vésicule, la reconnaissance de cible, l'ancrage et la fusion sont autant de mécanismes qui font appel au recrutement et à la formation de complexes protéiques. Les constituants des vésicules synaptiques sont donc directement responsables pour l'orchestration de la formation de complexes, l'exécution de tâches ainsi que le désassemblage de complexes.

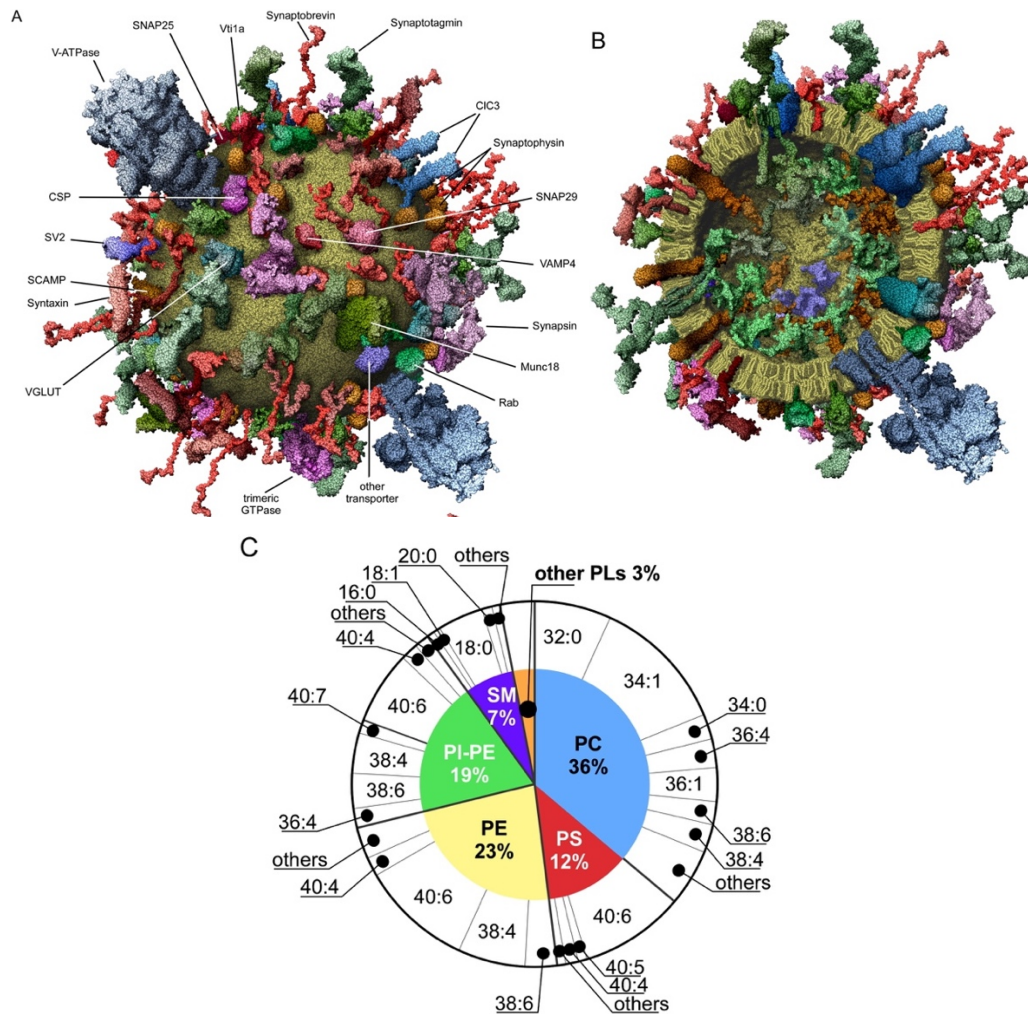


Figure 1.5. Illustration d'une vésicule synaptique pleine (A), en coupe (B) et la composition en phospholipides de la membrane (C). Adapté de Takamori *et al.*⁶⁸ avec permission, Copyright © 2006, Elsevier.

La figure 1.5 (C) donne la composition en phospholipides d'une vésicule neuronale. Le type de phospholipides majoritaires sont les phosphatidylcholines (PC, zwitterionique), suivis par les PE (phosphatidyléthanolamine, zwitterionique), les PI (phosphatidylinositol,

anionique), les PS (phosphatidylsérine, anionique) et les SM (sphingomyéline, zwitterionique). Les lipides les plus présents sont donc les glycérophospholipides. Ceux-ci correspondent à un groupement *sn*-glycérol-3-phosphate, sur le lequel deux acides gras ont été estérifiés aux positions C₁ et C₂. Le C₃ est lui lié au groupement phosphate PO₄³⁻, qui est à son tour lié à la tête polaire (choline, sérine, inositol, éthanolamine, ...). Le tableau 1.1 illustre un squelette de phospholipide, ainsi que les différentes têtes polaires présentes dans les vésicules synaptiques. La deuxième caractéristique d'un phospholipide, en plus de sa tête polaire, sont ses chaînes acyle. Il s'agit de chaînes carbonées pouvant varier en longueur et en nombre d'insaturations. Ainsi, dans la figure 1.5 (C) les chiffres 34:1 pour PC et 40:6 pour PS indiquent que les phosphatidylcholines et phosphatidylsérines les plus présentes dans les vésicules synaptiques ont chacun deux chaînes de 34 et 40 carbones, avec 1 et 6 insaturations, respectivement.

Hydratés, les phospholipides s'assemblent spontanément sous la forme de bicouches et forment ainsi une phase cristal-liquide. De manière générale, deux états physiques de phospholipides hydratés peuvent exister : une phase gel (L_β'), à basses températures, et une phase fluide, ou cristal liquide (L_α), à hautes températures. Le passage d'une phase à l'autre a lieu à la température de transition de phase (T_m, *melting temperature*). Cette transition fait passer le système d'un état ordonné à un état désordonné. Elle est caractérisée par un accroissement important du désordre des chaînes acyle (on parle de fusion des chaînes). La température de transition est propre à chaque phospholipide, en fonction de sa tête polaire et de la longueur de ses chaînes acyle, ainsi que du nombre d'insaturations sur ces chaînes carbonées. Ainsi, la DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), qui comporte une tête polaire choline, et deux chaînes acyle de 14 carbones sans insaturation, a une T_m de 24° C. Par contre, la DMPS (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-sérine), qui a également deux chaînes de 14 carbones sans insaturations, a une T_m de 41° C. Cet exemple souligne l'influence de la tête polaire sur la T_m. Pour une même tête polaire, par exemple PC, DPPC, qui a des chaînes acyle de 16 carbones (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) a une T_m de 41° C contre 24° C pour DMPC. Par ailleurs, les insaturations entraînent une non-linéarité des chaînes acyle, une diminution des forces de van der Waals, et vont induire du désordre dans une bicouche lipidique, et ainsi avoir une T_m plus basse.

Ainsi, la DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 18:1) a une T_m de -17°C tandis que la DSPC (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 18:0) a une T_m de 50°C . Tous les phospholipides ont un groupement phosphate anionique à pH physiologique ($1 < \text{pKa} < 2$).

Tableau 1.1. Illustration d'un phospholipide modèle. R_1 et R_2 correspondent à des chaînes acyle. R_3 correspond à la tête polaire.

SQUELETTE PHOSPHOLIPIDIQUE	TÊTE POLAIRE (R_3)
	Choline
	Éthanolamine
	Inositol
	Sérine

Par ailleurs, les neurones sont extrêmement riches en cholestérol, avec 0,8 molécule de cholestérol par phospholipide, donc 40 % molaire des membranes correspondent au cholestérol pour une vésicule synaptique. Ce dernier joue un rôle primordial dans la plasticité synaptique, la synaptogénèse, la conduction de signaux axonaux et agit comme précurseur d'oxystérols et d'hormones stéroïdiennes⁷⁴⁻⁷⁸. De manière générale, les maladies neurodégénératives sont accompagnées d'une perte importante de cholestérol, qui pourrait être une cause ou une conséquence de la maladie⁷⁴.

1.3.2 Dynamique membranaire

Pour remplir correctement ses fonctions, une membrane cellulaire est un milieu très fluide. Le modèle communément reconnu est celui de la mosaïque fluide de Singer et Nicolson, proposé en 1972⁷⁹, et toujours valide malgré l'avancée des connaissances⁸⁰. Singer

et Nicolson ont proposé un modèle où la bicouche lipidique est vue comme une mosaïque bidimensionnelle où les lipides sont en phase fluide et sont distribués aléatoirement. Dans leur modèle, les constituants autres que les phospholipides, donc les glycoprotéines, les protéines membranaires et transmembranaires, peuvent diffuser sans contrainte à la surface et dans la membrane. Des avancées plus récentes ont cependant permis de nuancer ce modèle, en réussissant à déterminer les temps de diffusion de ces différents composants.

Les phospholipides peuvent se mouvoir de différentes manières au sein d'une membrane, et cela à des échelles de temps allant de la nanoseconde pour le mouvement de protrusion, jusqu'à la seconde pour l'oscillation coordonnée de la bicouche. Parmi les autres mouvements accessibles aux phospholipides, il y a la diffusion rotationnelle (10^{-8} s), la diffusion latérale (10^{-7} s) et le basculement (10^{-3} - 10^{-4} s). Au niveau des chaînes acyle des phospholipides, deux phénomènes peuvent être observés : l'isomérisation *trans/gauche* (10^{-10} s) et l'oscillation des CH_3 terminaux (10^{-12} s). La dynamique des phospholipides est illustrée à la figure 1.6.

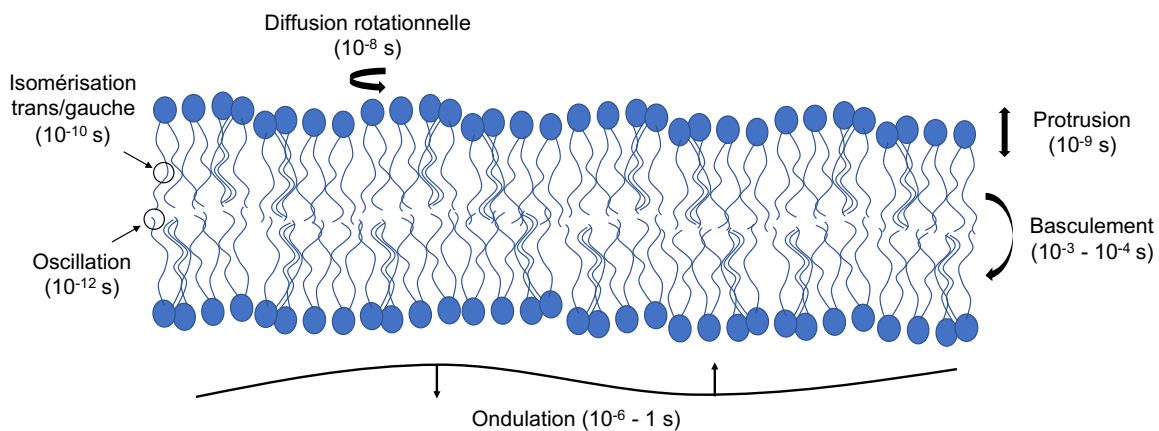


Figure 1.6. Illustration des aspects dynamiques d'une bicouche lipidique. Adapté de Yeagle⁸¹ (voir **copyright bouquin**)

Bien que les membranes cellulaires soient très souvent représentées par une simple bicouche lipidique, il faut garder à l'esprit que les protéines membranaires et transmembranaires constituent une grande partie de ces membranes. Pour une vésicule synaptique, le rapport massique de protéines par rapport aux phospholipides est de 1,94:1 en faveur des protéines⁶⁸. Par ailleurs, les bicouches ne sont pas toujours parfaitement

uniformes, et des microdomaines peuvent se former. Cette formation peut intervenir pour des lipides montrant une grande affinité (tête polaire et/ou longueur de chaînes acyle), ou dans le cas où une protéine membranaire ou transmembranaire a besoin d'un environnement spécifique pour adopter sa conformation active, bien souvent un radeau lipidique plus stable et moins mobile.

1.3.3 Membranes modèles

La complexité des membranes naturelles les rend quasi inutilisables en spectroscopie vibrationnelle pour étudier des interactions protéines/membranes. Les membranes modèles servent donc à remplacer les membranes naturelles en vue d'études spectroscopiques. Celles-ci servent en premier lieu à reconstituer la composition lipidique de la membrane naturelle visée. Ainsi, en connaissant la composition d'une membrane naturelle, il est possible de recréer une membrane modèle à la composition lipidique s'y rapprochant. Bien souvent les membranes modèles sont composées d'un à trois types de phospholipides, quand une membrane biologique en compte des centaines, voire des milliers. Il est également possible d'y ajouter des molécules de cholestérol ou des sphingolipides. L'utilisation de tels systèmes permet donc d'étudier spécifiquement des interactions peptide/protéine et membranes.

Les membranes modèles ont cependant des limitations quant à leur représentativité réelle des membranes naturelles. Elles sont utilisées depuis des décennies et ont permis l'élucidation des structures et des propriétés des membranes biologiques. Bien que la simplification inhérente du passage de membrane biologique à celui de membrane modèle est indispensable pour l'étude de certaines interactions moléculaires au niveau membranaire, elles peuvent représenter un obstacle à la compréhension précise de certaines fonctions que les membranes jouent pendant des interactions avec des molécules extérieures. De plus, l'utilisation de membranes modèles ne permet pas de recréer certaines subtilités propres aux membranes biologiques, telles que l'asymétrie dans la composition des deux couches formant l'extérieur et l'intérieur de la membrane. Malgré ces inconvénients, les membranes modèles restent très prisées pour les études spectroscopiques dynamiques et structurales. Les systèmes lipidiques modèles permettent notamment de travailler dans une grande gamme de conditions, que ce soit au niveau de la concentration, de la température ou encore de conditions de tampons (force ionique, pH). Par ailleurs, une large palette d'architectures est

offerte par les systèmes lipidiques modèles. Il est possible de mentionner les vésicules, monocouches à l'interface air/eau, bicouches supportées, micelles, nanodisques et bicelles, entre autres⁸².

Vésicules multilamellaires

Les travaux présentés dans cette thèse de doctorat ont tous fait appel à l'utilisation de vésicules multilamellaires (MLVs, *multilamellar vesicles*). Des résultats obtenus avec d'autres systèmes lipidiques (bicouches supportées et petites vésicules unilamellaires) n'ayant pas donné de résultats concluants, ils ne seront pas présentés ici. Les MLVs sont constituées d'une multitude de bicouches lipidiques concentriques et hydratées, tel qu'illustré à la figure 1.7. Une couche d'hydratation est présente entre chaque bicouche.

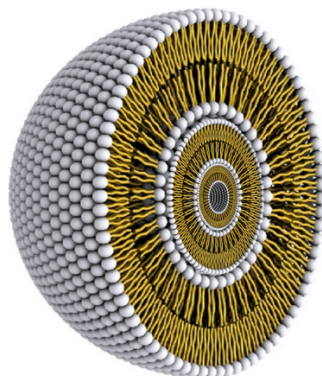


Figure 1.7. Représentation d'une vésicule multilamellaire formée par des phospholipides. Les têtes polaires des phospholipides sont représentées en blanc, et les chaînes acyle sont représentées en jaune. Le diamètre varie généralement entre 100 et 1000 nm. Modifié à partir de Bitounis *et al.*⁸³ (libre accès)

Les MLVs utilisées ici sont préparées à partir de phospholipides en poudre, qui sont par la suite solubilisés dans un mélange chloroforme:méthanol 2:1 (V:V). Le solvant est ensuite évaporé par un jet d'azote puis la préparation est séchée sous vide pour retirer toute trace de solvant. Après une lyophilisation de plusieurs heures, le film lipidique est hydraté avec un tampon puis une série cinq cycles gel/dégel. Un cycle gel/dégel consiste à plonger l'échantillon dans de l'azote liquide (-195°C), puis le chauffer à $T_m + 12^{\circ}\text{C}$. Après 5 minutes de chauffage, l'échantillon est vigoureusement agité à l'aide d'un agitateur mécanique. Après cinq répétitions, la suspension lipidique est hydratée et homogène, et les MLVs sont formées⁸⁴. Le grand avantage des membranes modèles est le fait que leur composition exacte

est connue, et donc qu'il est possible de prévoir leurs comportements thermique et dynamique.

Organisation lipidique

La nature amphiphile des phospholipides cylindriques pousse ceux-ci à former des bicouches lipidiques dans un milieu aqueux. Dans une telle structure, les têtes polaires se trouvent aux surfaces externe et interne des bicouches. Cette propriété vise à ne pas exposer les chaînes acyle aux molécules d'eau entourant la bicouche. Cependant, la structure en bicouche décrite jusqu'ici n'est pas la seule structure lipidique existante pour des phospholipides en milieu aqueux. En plus de la bicouche lipidique, les phospholipides peuvent adopter des formes sphériques avec les micelles et les vésicules uni- et multilamellaires, ainsi que structures non lamellaires de type hexagonal, comme illustré à la figure 1.8. Dans toutes ces différentes organisations, le but premier des phospholipides est de limiter au minimum le contact entre les chaînes acyle hydrophobes et le milieu aqueux. Ces arrangements supramoléculaires sont maintenus grâce à un mélange de forces de van der Waals, de forces hydrophobes, de liaisons hydrogène et électrostatiques principalement. Ainsi, les différentes organisations, grâce à ces mêmes forces, présentent des particularités d'autoréparation suite à une dégradation de la structure conduisant à l'exposition des chaînes acyle au milieu aqueux⁸⁵.

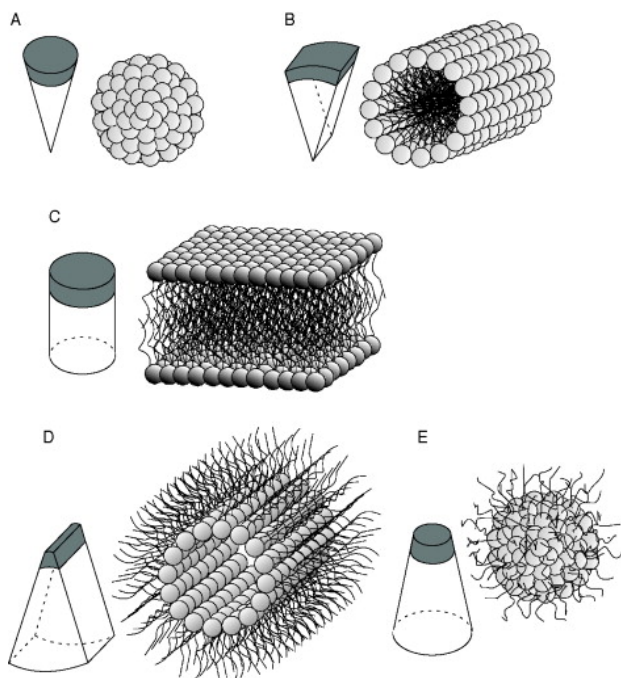


Figure 1.8. Illustration des phases lipidiques suivant la géométrie des phospholipides : micelle sphérique (A), cylindre (B), bicouche (C), cylindre inverse (D) et micelle inverse (E). Repris de Perutková *et al.*⁸⁶ avec permission, Copyright © 2009, Elsevier.

Phospholipides utilisés

Dans le cadre de ce travail de doctorat différents phospholipides ont été utilisés : DMPC, DPPC, et DMPG (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phospho-1'-rac-glycérol). Ici, le choix a été fait de travailler avec le DMPG, un lipide anionique, plutôt qu'avec la DMPS, le phospholipide anionique le plus abondant des membranes neuronales. En effet, la DMPS ne peut pas être utilisée en spectroscopie infrarouge en raison d'une composante spectrale due à sa tête polaire sérine dans la bande amide I⁸⁷, qui sert à l'étude de peptides et protéines. La présence de cette bande rend tout traitement spectral plus complexe, et surtout plus prompt à la création d'artefacts, et donc de mauvaises interprétations. La structure du DMPG est donnée à la figure 1.9.

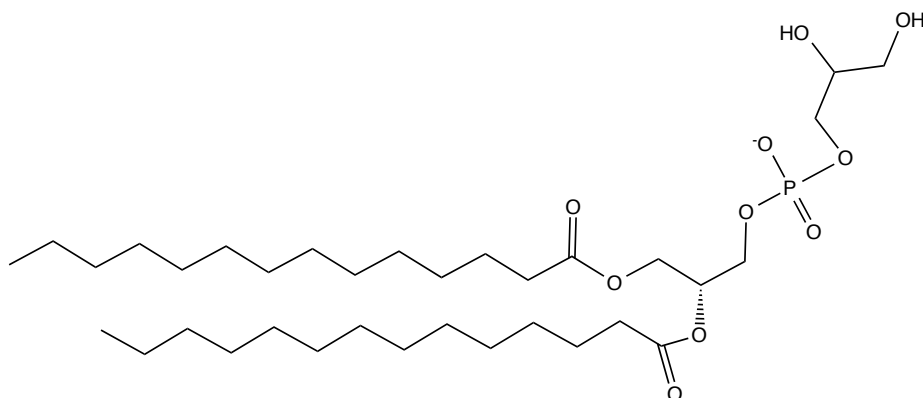


Figure 1.9. Structure chimique du DMPG.

La majeure différence entre DMPG et DMPS se trouve au niveau de la tête polaire, DMPG est anionique mais a une tête polaire neutre (glycérol), quand DMPS a une tête polaire zwitterionique (sérine). Des tests ont été effectués ponctuellement pour s'assurer de manière qualitative que les résultats obtenus avec DMPG sont les mêmes avec DMPS.

1.4 Origine, précédents, et objectifs du projet

Les présents travaux portent sur l'étude des interactions entre le peptide amyloïde α -synucléine 71-82 (AS₇₁₋₈₂) et des membranes modèles. La séquence 71-82 se trouve au cœur de la séquence hydrophobe NAC de l'AS, elle permet donc d'étudier le côté pathologique du comportement de la protéine. L'importance de cette séquence particulière a été mise en avant lors de précédentes études. L' α - et la β -synucléine (BS) présentent une grande homologie de séquences, excepté dans la partie centrale de la NAC, au niveau des résidus 71 à 82. Cette différence semble être d'une importance capitale vis-à-vis de l'agrégation, car l'AS agrège et forme des fibrilles amyloïdes, tandis que la BS agrège très peu, et il a même été prouvé que la BS peut jouer un rôle d'inhibiteur d'agrégation pour AS⁸⁸⁻⁸⁹. De plus, des études ont souligné l'importance de cette séquence en créant des mutants d'AS avec des mutations et des délétions au niveau de cette séquence⁹⁰⁻⁹³. Une étude en particulier a prouvé qu'une mutation ralentit l'agrégation de la protéine, et qu'une mutation bloque l'agrégation⁹⁴. Des travaux de dynamique moléculaire se sont également penchés sur ce peptide particulier étant donné son importance lors de l'agrégation⁹⁵⁻⁹⁶. Par ailleurs, il s'agit d'un des peptides amyloïdogéniques les plus courts d'AS, qui reste soluble en solution aqueuse⁹⁷, permettant ainsi de l'étudier à la fois en solution, ainsi qu'en présence de membranes. Tous ces éléments

font en sorte que AS₇₁₋₈₂ représente la séquence visée lors de certaines études d'inhibition d'agrégation, notamment avec comme molécule active cette séquence, ou une partie de cette séquence modifiée⁹⁸⁻⁹⁹.

Ces travaux font suite à des travaux de maîtrise effectués par Laurie Bédard au sein de notre laboratoire, et dont les résultats ont été publiés¹⁰⁰. Laurie Bédard s'était servie de membranes modèles composées d'un seul type de phospholipide, pour conduire des études en spectroscopie infrarouge, résonance magnétique de l'état solide, et dichroïsme circulaire électronique. Ces travaux ont permis de mettre en avant la grande homologie entre AS₇₁₋₈₂ et AS, notamment au niveau structural. Les résultats permettent de penser que cette séquence particulière constitue donc un bon modèle pour étudier le comportement pathologique d'AS, et notamment l'importance de cette séquence lors de la fibrillation.

L'objectif primaire de ce projet est de réussir à caractériser les interactions entre AS₇₁₋₈₂ et des membranes modèles, pour tenter de mettre le doigt sur des éléments permettant de mieux comprendre les interactions entre la protéine parent, AS, et des membranes neuronales. Pour cela nous avons utilisé les spectroscopies infrarouge et de résonance magnétique nucléaire de l'état solide, mais appliquées à des systèmes mettant en jeu des membranes modèles composées de mélanges de phospholipides. Par ailleurs, une nouvelle technique spectroscopique particulièrement précieuse pour la caractérisation de protéines et peptides amyloïdes, le dichroïsme circulaire vibrationnel, a été utilisée. Cet ensemble de techniques nous permet d'accéder, au niveau moléculaire, à une description structurale et dynamique à la fois du peptide AS₇₁₋₈₂, et des membranes modèles avec lesquelles il interagit.

1.5 Références

1. Otzen, D.; Riek, R., Functional amyloids. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2019**.
2. Knowles, T. P. J.; Mezzenga, R., Amyloid fibrils as building blocks for natural and artificial functional materials. *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 6546-6561.
3. Chavarría, C.; Rodríguez-Bottero, S.; Quijano, C.; Cassina, P.; Souza, J. M., Impact of monomeric, oligomeric and fibrillar alpha-synuclein on astrocyte reactivity and toxicity to neurons. *Biochem. J.* **2018**, *475*, 3153-3169.
4. Roberts, H. L.; Brown, D. R., Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α -synuclein. *Biomolecules* **2015**, *5*, 282-305.
5. Substantia nigra and Parkinson disease. <https://medlineplus.gov/ency/imagepages/19515.htm> (accessed 09/09/2019).

6. Parkinson's dementia vs. dementia with Lewy bodies. <https://www.verywellhealth.com/parkinsons-dementia-vs-lewy-dementia-98766> (accessed 17/10/2019).
7. Wilson, H.; Dervenoulas, G.; Pagano, G.; Koros, C.; Yousaf, T.; Picillo, M.; Polychronis, S.; Simitsi, A.; Giordano, B.; Chappell, Z., et al., Serotonergic pathology and disease burden in the premotor and motor phase of A53T α -synuclein parkinsonism: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* **2019**, *18*, 748-759.
8. Spillantini, M. G.; Crowther, R. A.; Jakes, R.; Hasegawa, M.; Goedert, M., α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6469-6473.
9. Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M., α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **1997**, *388*, 839-840.
10. Theillet, F.-X.; Binolfi, A.; Bekei, B.; Martorana, A.; Rose, H. M.; Stuiver, M.; Verzini, S.; Lorenz, D.; van Rossum, M.; Goldfarb, D., et al., Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature* **2016**, *530*, 45-50.
11. Fauvet, B.; Mbefo, M. K.; Fares, M.-B.; Desobry, C.; Michael, S.; Ardah, M. T.; Tsika, E.; Coune, P.; Prudent, M.; Lion, N., et al., α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15345-15364.
12. Bartels, T.; Choi, J. G.; Selkoe, D. J., α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* **2011**, *477*, 107-110.
13. Burré, J.; Vivona, S.; Diao, J.; Sharma, M.; Brunger, A. T.; Südhof, T. C., Properties of native brain α -synuclein. *Nature* **2013**, *498*, E4.
14. Bartels, T.; Selkoe, D. J., Bartels & Selkoe reply. *Nature* **2013**, *498*, E6.
15. Vamvaca, K.; Volles, M. J.; Lansbury, P. T., The first N-terminal amino acids of α -synuclein are essential for α -helical structure formation *in vitro* and membrane binding in yeast. *J. Mol. Biol.* **2009**, *389*, 413-424.
16. Dikiy, I.; Eliezer, D., N-terminal acetylation stabilizes N-terminal helicity in lipid- and micelle-bound α -synuclein and increases its affinity for physiological membranes. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 3652-3665.
17. Fusco, G.; De Simone, A.; Gopinath, T.; Vostrikov, V.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Veglia, G., Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3827.
18. Kessler, J. C.; Rochet, J.-C.; Lansbury, P. T., The N-terminal repeat domain of α -synuclein inhibits β -sheet and amyloid fibril formation. *Biochemistry* **2003**, *42*, 672-678.
19. Han, H.; Weinreb, P. H.; Lansbury, P. T., The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by β -amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease? *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 163-169.
20. Iwai, A.; Masliah, E.; Yoshimoto, M.; Ge, N.; Flanagan, L.; Rohan de Silva, H. A.; Kittel, A.; Saitoh, T., The precursor protein of Non-A β Component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* **1995**, *14*, 467-475.
21. Weinreb, P. H.; Zhen, W.; Poon, A. W.; Conway, K. A.; Lansbury, P. T., NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13709-13715.
22. Culvenor, J. G.; McLean, C. A.; Cutt, S.; Campbell, B. C. V.; Maher, F.; Jäkälä, P.; Hartmann, T.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; Li, Q.-X., Non-A β component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) Revisited : NAC and α -synuclein are not associated with A β amyloid. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 1173-1181.
23. Lautenschläger, J.; Stephens, A. D.; Fusco, G.; Ströhl, F.; Curry, N.; Zacharopoulou, M.; Michel, C. H.; Laine, R.; Nespovitaya, N.; Fantham, M., et al., C-terminal calcium binding of α -synuclein modulates synaptic vesicle interaction. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 712.

24. Tuttle, M. D.; Comellas, G.; Nieuwkoop, A. J.; Covell, D. J.; Berthold, D. A.; Kloepper, K. D.; Courtney, J. M.; Kim, J. K.; Barclay, A. M.; Kendall, A., et al., Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 409-415.
25. Iyer, A.; Roeters, S. J.; Kogan, V.; Woutersen, S.; Claessens, M. M. A. E.; Subramaniam, V., C-Terminal truncated α -synuclein fibrils contain strongly twisted β -sheets. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15392-15400.
26. Ma, L.; Yang, C.; Zhang, X.; Li, Y.; Wang, S.; Zheng, L.; Huang, K., C-terminal truncation exacerbates the aggregation and cytotoxicity of α -Synuclein: A vicious cycle in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 3714-3725.
27. Li, W.; West, N.; Colla, E.; Pletnikova, O.; Troncoso, J. C.; Marsh, L.; Dawson, T. M.; Jäkälä, P.; Hartmann, T.; Price, D. L., et al., Aggregation promoting C-terminal truncation of α -synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 2162-2167.
28. Kim, T. D.; Paik, S. R.; Yang, C.-H., Structural and functional implications of C-terminal regions of α -synuclein. *Biochemistry* **2002**, *41*, 13782-13790.
29. van der Wateren, I. M.; Knowles, T. P. J.; Buell, A. K.; Dobson, C. M.; Galvagnion, C., C-terminal truncation of α -synuclein promotes amyloid fibril amplification at physiological pH. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 5506-5516.
30. Bellani, S.; Sousa, V. L.; Ronzitti, G.; Valtorta, F.; Meldolesi, J.; Chiergatti, E., The regulation of synaptic function by α -synuclein. *Commun. Integr. Biol.* **2010**, *3*, 106-109.
31. Bendor, J. T.; Logan, T. P.; Edwards, R. H., The function of α -synuclein. *Neuron* **2013**, *79*, 1044-1066.
32. Bousset, L.; Pieri, L.; Ruiz-Arlandis, G.; Gath, J.; Jensen, P. H.; Habenstein, B.; Madiona, K.; Olieric, V.; Böckmann, A.; Meier, B. H., et al., Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2575.
33. Gath, J.; Bousset, L.; Habenstein, B.; Melki, R.; Böckmann, A.; Meier, B. H., Unlike twins: an NMR comparison of two α -synuclein polymorphs featuring different toxicity. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e90659.
34. Guerrero-Ferreira, R.; Taylor, N. M. I.; Arteni, A.-A.; Kumari, P.; Mona, D.; Ringler, P.; Britschgi, M.; Lauer, M. E.; Verasdock, J.; Riek, R., et al., Two new polymorphic structures of alpha-synuclein solved by cryo-electron microscopy. *bioRxiv* **2019**, 654582.
35. Li, B.; Ge, P.; Murray, K. A.; Sheth, P.; Zhang, M.; Nair, G.; Sawaya, M. R.; Shin, W. S.; Boyer, D. R.; Ye, S., et al., Cryo-EM of full-length α -synuclein reveals fibril polymorphs with a common structural kernel. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3609.
36. Gath, J.; Bousset, L.; Habenstein, B.; Melki, R.; Meier, B. H.; Böckmann, A., Yet another polymorph of α -synuclein: solid-state sequential assignments. *Biomol. NMR Assignments* **2014**, *8*, 395-404.
37. Watson, M. D.; Lee, J. C., N-Terminal acetylation affects α -synuclein fibril polymorphism. *Biochemistry* **2019**, *58*, 3630-3633.
38. Petkova, A. T.; Leapman, R. D.; Guo, Z.; Yau, W.-M.; Mattson, M. P.; Tycko, R., Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Science* **2005**, *307*, 262-265.
39. Tycko, R., Amyloid polymorphism: Structural basis and neurobiological relevance. *Neuron* **2015**, *86*, 632-645.
40. Fändrich, M.; Nyström, S.; Nilsson, K. P. R.; Böckmann, A.; LeVine, H., 3rd; Hammarström, P., Amyloid fibril polymorphism: a challenge for molecular imaging and therapy. *J. Intern. Med.* **2018**, *283*, 218-237.
41. Sebastiao, M.; Quittot, N.; Bourgault, S., Thioflavin T fluorescence to analyse amyloid formation kinetics: Measurement frequency as a factor explaining irreproducibility. *Anal. Biochem.* **2017**, *532*, 83-86.

42. Bodner, C. R.; Dobson, C. M.; Bax, A., Multiple tight phospholipid-binding modes of α -synuclein revealed by solution NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **2009**, *390*, 775-790.
43. Chandra, S.; Chen, X.; Rizo, J.; Jahn, R.; Südhof, T. C., A broken α -helix in folded α -synuclein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15313-15318.
44. Burré, J.; Sharma, M.; Südhof, T. C., α -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, E4274-E4283.
45. Burré, J.; Sharma, M.; Tsetsenis, T.; Buchman, V.; Etherton, M. R.; Südhof, T. C., α -Synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro*. *Science* **2010**, *329*, 1663-1667.
46. Chandra, S.; Gallardo, G.; Fernández-Chacón, R.; Schlüter, O. M.; Südhof, T. C., α -Synuclein cooperates with CSP α in preventing neurodegeneration. *Cell* **2005**, *123*, 383-396.
47. Choi, B.-K.; Choi, M.-G.; Kim, J.-Y.; Yang, Y.; Lai, Y.; Kweon, D.-H.; Lee, N. K.; Shin, Y.-K., Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 4087.
48. Lai, Y.; Kim, S.; Varkey, J.; Lou, X.; Song, J.-K.; Diao, J.; Langen, R.; Shin, Y.-K., Nonaggregated α -synuclein influences SNARE-dependent vesicle docking via membrane binding. *Biochemistry* **2014**, *53*, 3889-3896.
49. Geng, X.; Lou, H.; Wang, J.; Li, L.; Swanson, A. L.; Sun, M.; Beers-Stolz, D.; Watkins, S.; Perez, R. G.; Drain, P., α -Synuclein binds the KATP channel at insulin-secretory granules and inhibits insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2010**, *300*, E276-E286.
50. Sharma, S. K.; Chorell, E.; Steneberg, P.; Vernersson-Lindahl, E.; Edlund, H.; Wittung-Stafshede, P., Insulin-degrading enzyme prevents α -synuclein fibril formation in a nonproteolytic manner. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12531.
51. Rodriguez-Araujo, G.; Nakagami, H.; Hayashi, H.; Mori, M.; Shiuchi, T.; Minokoshi, Y.; Nakaoka, Y.; Takami, Y.; Komuro, I.; Morishita, R., et al., Alpha-synuclein elicits glucose uptake and utilization in adipocytes through the Gab1/PI3K/Akt transduction pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 1123-1133.
52. Rodriguez-Araujo, G.; Nakagami, H.; Takami, Y.; Katsuya, T.; Akasaka, H.; Saitoh, S.; Shimamoto, K.; Morishita, R.; Rakugi, H.; Kaneda, Y., Low alpha-synuclein levels in the blood are associated with insulin resistance. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12081.
53. Zhu, M.; Qin, Z.-J.; Hu, D.; Munishkina, L. A.; Fink, A. L., α -Synuclein can function as an antioxidant preventing oxidation of unsaturated lipid in vesicles. *Biochemistry* **2006**, *45*, 8135-8142.
54. Hashimoto, M.; Hsu, L. J.; Rockenstein, E.; Takenouchi, T.; Mallory, M.; Masliah, E., α -Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 11465-11472.
55. Jin, H.; Kanthasamy, A.; Ghosh, A.; Yang, Y.; Anantharam, V.; Kanthasamy, A. G., α -Synuclein negatively regulates protein kinase C δ expression to suppress apoptosis in dopaminergic neurons by reducing p300 histone acetyltransferase activity. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 2035.
56. Peng, X. M.; Tehranian, R.; Dietrich, P.; Stefanis, L.; Perez, R. G., α -Synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 3523.
57. Perez, R. G.; Waymire, J. C.; Lin, E.; Liu, J. J.; Guo, F.; Zigmond, M. J., A role for α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 3090.
58. Auluck, P. K.; Caraveo, G.; Lindquist, S., α -Synuclein: Membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 211-233.
59. Andreasen, M.; Lorenzen, N.; Otzen, D., Interactions between misfolded protein oligomers and membranes: A central topic in neurodegenerative diseases? *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2015**, *1848*, 1897-1907.

60. Gorbenko, G. P.; Kinnunen, P. K. J., The role of lipid–protein interactions in amyloid-type protein fibril formation. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *141*, 72-82.
61. Snead, D.; Eliezer, D., Alpha-synuclein function and dysfunction on cellular membranes. *Exp. Neurobiol.* **2014**, *23*, 292-313.
62. Buell, A. K.; Galvagnion, C.; Gaspar, R.; Sparr, E.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Linse, S.; Dobson, C. M., Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 7671-7676.
63. Galvagnion, C., The role of lipids interacting with alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Parkinson's Dis.* **2017**, *7*, 433-450.
64. Galvagnion, C.; Buell, A. K.; Meisl, G.; Michaels, T. C. T.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M., Lipid vesicles trigger α -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 229-234.
65. Dikiy, I.; Eliezer, D., Folding and misfolding of alpha-synuclein on membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2012**, *1818*, 1013-1018.
66. O'Leary, E. I.; Lee, J. C., Interplay between α -synuclein amyloid formation and membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteom.* **2019**, *1867*, 483-491.
67. Comellas, G.; Lemkau, L. R.; Zhou, D. H.; George, J. M.; Rienstra, C. M., Structural intermediates during α -synuclein fibrillogenesis on phospholipid vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5090-5099.
68. Takamori, S.; Holt, M.; Stenius, K.; Lemke, E. A.; Grønberg, M.; Riedel, D.; Urlaub, H.; Schenck, S.; Brügger, B.; Ringler, P., et al., Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **2006**, *127*, 831-846.
69. Shamoto-Nagai, M.; Hisaka, S.; Naoi, M.; Maruyama, W., Modification of α -synuclein by lipid peroxidation products derived from polyunsaturated fatty acids promotes toxic oligomerization: its relevance to Parkinson disease. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2018**, *62*, 207-212.
70. Angelova, P. R.; Horrocks, M. H.; Klenerman, D.; Gandhi, S.; Abramov, A. Y.; Shchepinov, M. S., Lipid peroxidation is essential for α -synuclein-induced cell death. *J. Neurochem.* **2015**, *133*, 582-589.
71. Pan, J.; Dalzini, A.; Khadka, N. K.; Aryal, C. M.; Song, L., Lipid extraction by α -synuclein generates semi-transmembrane defects and lipoprotein nanoparticles. *ACS Omega* **2018**, *3*, 9586-9597.
72. Chaudhary, H.; Iyer, A.; Subramaniam, V.; Claessens, M. M. A. E., α -Synuclein oligomers stabilize pre-existing defects in supported bilayers and propagate membrane damage in a fractal-like pattern. *Langmuir* **2016**, *32*, 11827-11836.
73. Ouberai, M. M.; Wang, J.; Swann, M. J.; Galvagnion, C.; Guilliams, T.; Dobson, C. M.; Welland, M. E., α -Synuclein senses lipid packing defects and induces lateral expansion of lipids leading to membrane remodeling. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 20883-20895.
74. Orth, M.; Bellosta, S., Cholesterol: Its regulation and role in central nervous system disorders. *Cholesterol* **2012**, *2012*, 19.
75. Björkhem, I.; Meaney, S., Brain cholesterol: Long secret life behind a barrier. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 806-815.
76. Goritz, C.; Mauch, D. H.; Pfrieger, F. W., Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol. Cell Neurosci.* **2005**, *29*, 190-201.
77. Mauch, D. H.; Nägler, K.; Schumacher, S.; Göritz, C.; Müller, E.-C.; Otto, A.; Pfrieger, F. W., CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* **2001**, *294*, 1354-1357.
78. Pfrieger, F. W.; Ungerer, N., Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog. Lipid Res.* **2011**, *50*, 357-371.

79. Singer, S. J.; Nicolson, G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **1972**, *175*, 720.
80. Nicolson, G. L., The fluid—mosaic model of membrane structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2014**, *1838*, 1451-1466.
81. Yeagle, P. L., *The structure of biological membranes*. CRC Press: 2004.
82. Chan, Y.-H. M.; Boxer, S. G., Model membrane systems and their applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 581-587.
83. Bitounis, D.; Fanciullino, R.; Iliadis, A.; Ciccolini, J., Optimizing druggability through liposomal formulations: New approaches to an old concept. *ISRN Pharmaceutics* **2012**, *2012*, 11.
84. Jones, M. N.; Chapman, D., *Micelles, monolayers, and biomembranes*. Wiley-Wiss: 1995.
85. Gennis, R. B., *Biomembranes: Molecular structure and function*. Springer Science & Business Media: 2013; p 549.
86. Perutková, Š.; Daniel, M.; Dolinar, G.; Rappolt, M.; Kralj-Iglič, V.; Iglič, A. In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*; Academic Press: 2009; Vol. 9, pp 237-278.
87. Kimura, Y.; Nagai, Y., Infrared spectra of brain phosphatidylserine. *Biochem. J.* **1960**, *77*, 3-4.
88. Park, J.-Y.; Lansbury, P. T., β -Synuclein inhibits formation of α -synuclein protofibrils: A possible therapeutic strategy against Parkinson's disease. *Biochemistry* **2003**, *42*, 3696-3700.
89. Tsigelny, I. F.; Bar-On, P.; Sharikov, Y.; Crews, L.; Hashimoto, M.; Miller, M. A.; Keller, S. H.; Platoshyn, O.; Yuan, J. X. J.; Masliah, E., Dynamics of α -synuclein aggregation and inhibition of pore-like oligomer development by β -synuclein. *FEBS J.* **2007**, *274*, 1862-1877.
90. Bodles, A. M.; El-Agnaf, O. M. A.; Greer, B.; Guthrie, D. J. S.; Irvine, G. B., Inhibition of fibril formation and toxicity of a fragment of α -synuclein by an N-methylated peptide analogue. *Neurosci. Lett.* **2004**, *359*, 89-93.
91. Bodles, A. M.; Guthrie, D. J. S.; Greer, B.; Irvine, G. B., Identification of the region of Non-A β Component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity. *J. Neurochem.* **2001**, *78*, 384-395.
92. Periquet, M.; Fulga, T.; Myllykangas, L.; Schlossmacher, M. G.; Feany, M. B., Aggregated α -synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity *in vivo*. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 3338-3346.
93. Waxman, E. A.; Mazzulli, J. R.; Giasson, B. I., Characterization of hydrophobic residue requirements for α -synuclein fibrillization. *Biochemistry* **2009**, *48*, 9427-9436.
94. Giasson, B. I.; Murray, I. V. J.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y., A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α -synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2380-2386.
95. Park, S.-B.; Yoon, J.-S.; Jang, S.-M.; Lee, K.-H.; Shin, S.-M., Computational study on oligomer formation of fibril-forming peptide of α -synuclein. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, *33*, 848-854.
96. Yoon, J.; Jang, S.; Lee, K.; Shin, S., Dimerization of fibril-forming segments of α -synuclein. *Bull. Korean Chem. Soc* **2009**, *30*, 1845-1850.
97. 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 associated with neurodegenerative diseases. *J. Mol. Biol.* **2005**, *350*, 379-392.
98. Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., Design of an N-methylated peptide inhibitor of α -synuclein aggregation guided by solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7873-7881.
99. El-Agnaf, O. M. A.; Paleologou, K. E.; Greer, B.; Abogrein, A. M.; King, J. E.; Salem, S. A.; Fullwood, N. J.; Benson, F. E.; Hewitt, R.; Ford, K. J., et al., A strategy for designing inhibitors of α -synuclein aggregation and toxicity as a novel treatment for Parkinson's disease and related disorders. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1315-1317.

100. Bédard, L.; Lefèvre, T.; Morin-Michaud, É.; Auger, M., Besides fibrillization: Putative role of the peptide fragment 71–82 on the structural and assembly behavior of α -synuclein. *Biochemistry* **2014**, *53*, 6463-6472.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Les résultats présentés dans cette thèse portent sur l'étude des interactions entre le peptide amyloïde AS₇₁₋₈₂ et diverses membranes lipidiques modèles. Tel qu'expliqué dans le chapitre d'introduction, la séquence 71-82 de l'AS a été sélectionnée pour son rôle primordial dans l'agrégation pathologique d'AS. Quelques études ont été effectuées sur AS₇₁₋₈₂, au sein du laboratoire, ainsi que dans d'autres laboratoires¹⁻⁶. Afin d'apporter de nouveaux éléments sur les interactions entre AS₇₁₋₈₂ et des membranes modèles, nous avons eu recours à trois techniques spectroscopiques complémentaires, soit la spectroscopie infrarouge (IR), le dichroïsme circulaire vibrationnel (VCD), et la résonance magnétique nucléaire de l'état solide (RMN-ÉS). Dans un premier temps, l'IR et le VCD nous ont permis d'étudier la structure d'AS₇₁₋₈₂, en solution et en présence de membranes modèles. Par la suite, nous avons étudié l'impact d'AS₇₁₋₈₂ sur les membranes modèles, via l'étude des bandes d'élongations des chaînes acyle et des bandes carbonyle des liens phosphodiester des phospholipides en IR. En RMN-ÉS, nous avons utilisé la technique PROCSA (*Phosphorus recoupling of chemical shift anisotropy*) pour étudier les têtes polaires des phospholipides, ainsi que la technique DQF-DRAWS (*Double-quantum filtered dipolar recoupling in a windowless sequence*) pour obtenir des distances internucléaires dans les fibrilles formées par AS₇₁₋₈₂.

Ces méthodes spectroscopiques complémentaires sont expliquées en détail dans ce chapitre, avec les fondements théoriques qui s'y rapportent, ainsi que les considérations expérimentales relatives à la synthèse peptidique, et une courte description de la microscopie électronique en transmission.

2.1 Spectroscopie infrarouge

2.1.1 Théorie

La spectroscopie IR est une technique permettant d'observer des interactions lumière-matière pour en retirer des informations structurales. La lumière infrarouge (400-4000 cm⁻¹ pour le moyen infrarouge) permet d'observer des transitions vibrationnelles. Cependant, pour qu'une liaison chimique soit active en infrarouge, il faut que l'absorption de la lumière provoque une variation nette du moment dipolaire de cette liaison. Plus précisément, pour qu'une liaison chimique soit active il faut, pour une transition entre les niveaux vibrationnels

0 et **1**, du mode normal de vibration **a** de coordonnée normal Q_a que la force de l'oscillateur D_{01}^a :

$$D_{01}^a = \frac{\hbar}{2\omega_a} \left| \left(\frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q_a} \right)_0 \right|^2 \quad (2.1)$$

avec

$$\left| \left(\frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q_a} \right)_0 \right| \neq 0, \quad (2.2)$$

où $\frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q_a}$ est la variation du moment dipolaire électrique $\vec{\mu}$ de la liaison chimique lors de la vibration, \hbar la constante de Planck réduite, ω_a la fréquence⁷. Par exemple, les molécules diatomiques homonucléaires ne sont pas observables en IR étant donné qu'elles ne subissent jamais de variation de leur moment dipolaire. Les variations du moment dipolaire suite à une interaction lumière-matière se produisent de manière très rapide (de l'ordre de 10^{-13} s)⁸.

L'IR a été appliqué à l'étude de protéines dès les années 1930⁹, avant de voir un gain de popularité dans les années 1940¹⁰⁻¹². Les grandes longueurs d'onde employées en spectroscopie IR permettent de travailler dans un milieu turbide sans craindre une trop grande diffraction. Cette caractéristique en fait une technique de choix pour étudier des complexes protéines-membranes modèles, en plus de pouvoir étudier ces protéines dans un milieu aqueux, organique, ou encore sous forme de poudre ou de film solide.

La vibration moléculaire en IR peut s'apparenter en première approximation à un oscillateur, dont la fréquence de vibration est donnée par l'équation de l'oscillateur harmonique :

$$\bar{\nu} \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.3)$$

avec :

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}, \quad (2.4)$$

où $\bar{\nu}$ correspond à la fréquence de vibration en cm^{-1} , c à la vitesse de la lumière, k à la constante de force de la liaison, μ la masse réduite, et m_1 et m_2 aux masses des atomes impliqués dans la liaison.

Puisqu'une fréquence de vibration et la probabilité d'absorption dépendent de la force et de la polarité des liens chimiques, cette fréquence va être influencée par des effets intra- et intermoléculaires¹³. De plus, l'une des forces de l'IR réside dans la possibilité de travailler avec des échantillons qui ne sont pas marqués isotopiquement, en plus du fait que presque toutes les biomolécules absorbent dans l'IR. Par ailleurs cette technique ne requiert pas non plus l'ajout de sondes moléculaires qui pourraient perturber le système.

Pour un groupement chimique donné, plusieurs types de vibration sont possibles dans le plan de la liaison (élongations symétrique et asymétrique, cisaillement, basculement) et hors du plan (balancement et torsion). Ces vibrations sont illustrées à la figure 2.1.

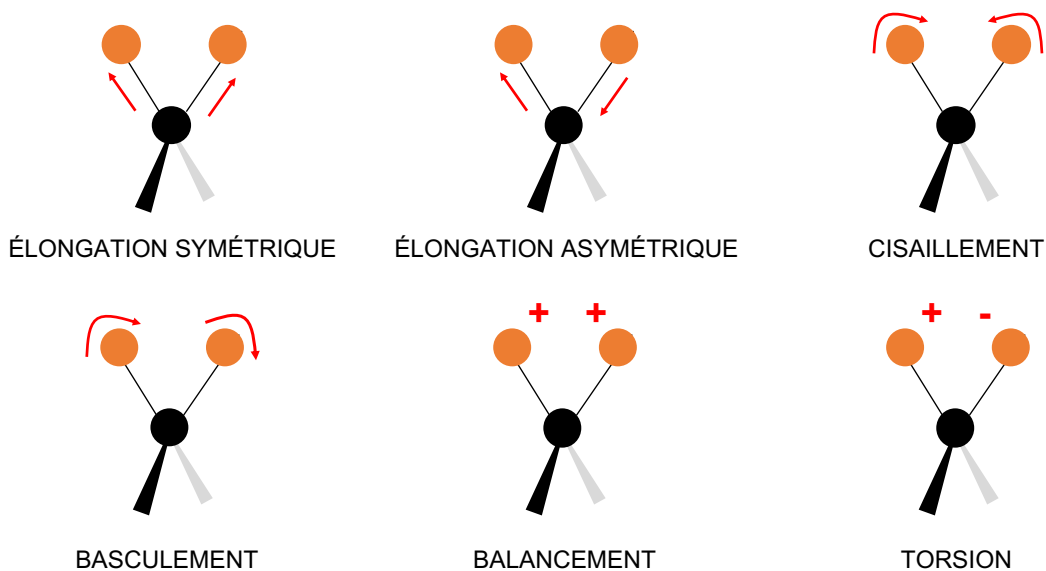


Figure 2.1. Modes de vibration moléculaires en spectroscopie IR.

2.1.2 Spectroscopie infrarouge des protéines

Il est possible d'étudier, par IR, des structures chimiques particulières, notamment l'état de protonation de chaînes latérales telles que Asp, Glu, His et Tyr¹⁴⁻¹⁶, des réactions de transfert d'électron¹⁷, du relargage de Ca²⁺ de l'ATPase¹⁸⁻¹⁹ ou encore de phosphorylation²⁰⁻²¹.

La spectroscopie IR est surtout une technique permettant la détermination de structure de protéines, des mécanismes moléculaires dans lesquelles celles-ci sont impliquées ainsi que leur repliement, dépliement et mépliement. Plusieurs bandes correspondent aux vibrations du squelette peptidique dans la région du moyen infrarouge, et sont détaillées au tableau 2.1.

Tableau 2.1. Bandes de vibration des peptides et protéines. Adapté de Kong *et al.*²²

Vibration	Fréquences de vibration (cm ⁻¹)	Description
Amide A	3300	Élongation NH
Amide B	3100	Élongation NH
Amide I	1600-1690	Élongation C=O
Amide II	1480-1575	Élongation CN, torsion NH
Amide III	1229-1301	Élongation CN, torsion NH
Amide IV	625-767	Torsion OCN
Amide V	640-800	Torsion NH hors du plan
Amide VI	537-606	Torsion C=O hors du plan
Amide VII	200	Torsion du squelette

Parmi toutes ces bandes de vibration associées aux protéines, la région la plus utilisée pour la détermination de structures est la région amide I¹³. Celle-ci provient majoritairement de la vibration du carbonyle du lien peptidique (contribution > 80%), ainsi que de l'élongation NH. Cette vibration fournit directement de l'information sur les structures secondaires en présence. À chaque nombre d'onde est associée une structure secondaire, ainsi

que des valeurs d'angles dièdres (ϕ , ψ) correspondants. Les structures secondaires ainsi que les nombres d'onde correspondants sont données au Tableau 2.2.

Tableau 2.2. Structures secondaires et leur nombre d'ondes associé dans la région amide I. Adapté de Barth¹³

Structures secondaires	Nombre d'ondes (cm ⁻¹)
Hélice- α	1650-1655
Feuillet- β parallèle	1620-1630
Pelote statistique/ non structurée	1640-1645
Coude- β	1660-1670
Feuillet- β anti-parallèle	1620-1630 / 1685-1690

L'IR permet donc une détermination structurale de protéines et peptides. De plus, la rapidité d'acquisition permet d'enregistrer des changements très rapides, que ce soit au niveau de la structure ou le suivi d'une deutération²³⁻²⁴. Il est également possible d'observer des effets sur la structure résultant de différents facteurs : pH, force ionique, solvant, etc. Par ailleurs, il est possible de chauffer les échantillons sur une large gamme de température (5-80° C) et ainsi observer des effets de température. De telles expériences permettent d'étudier le thermotropisme des phospholipides composant les membranes modèles, et ce de manière simultanée à l'analyse de la structure de protéines/peptides.

2.1.3 Spectroscopie infrarouge des phospholipides

L'avantage de pouvoir étudier des échantillons turbides sans craindre trop d'effets de diffraction ou de perte de signal permet d'étudier des membranes modèles sous forme de MLVs, et ainsi de connaître leur comportement thermique. Trois régions du moyen infrarouge sont propres aux vibrations moléculaires des phospholipides : la région des CH (2800-3000 cm⁻¹) pour les chaînes acyle, la région des C=O ester (1700-1800 cm⁻¹) pour la région interfaciale sous le glycérol et la région phosphate pour la tête polaire phosphatée (1200-1300 cm⁻¹). Nous nous intéressons ici uniquement aux régions CH et C=O ester. L'avantage de la spectroscopie IR est ici de pouvoir obtenir de l'information simultanément sur ces régions.

Région des CH

Quatre bandes sont identifiables dans la région 2800-3000 cm^{-1} . Celles-ci correspondent aux vibrations d'élongations symétrique (2850 cm^{-1}) et asymétrique (2925 cm^{-1}) des CH_2 des chaînes acyle, et aux bandes d'élongations symétrique (2875 cm^{-1}) et asymétrique (2950 cm^{-1}) des CH_3 terminaux. La figure 2.2 représente la région CH du spectre infrarouge, ainsi que l'effet de la température sur les bandes de cette région.

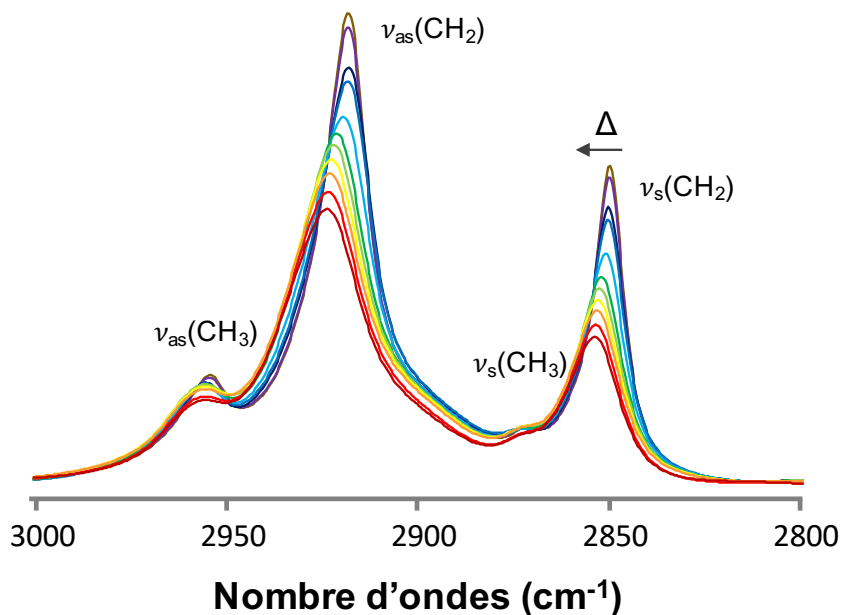


Figure 2.2. Bandes de vibration de la région CH (3000-2800 cm^{-1}) de DMPC:DMPG (1:1), avec, dans l'ordre, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ et $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, en fonction de la température (Δ représente le chauffage de la suspension de membranes modèles).

Le déplacement marqué des bandes $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ et $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ avec la température est provoqué par un changement conformationnel. En effet, tel qu'expliqué plus haut, les phospholipides peuvent être généralement sous deux phases : gel et fluide. Dans la phase gel, les CH_2 des chaînes acyle se trouvent dans une conformation *trans*, et au moment de la transition de phase, ces derniers vont adopter une configuration *gauche*, tel qu'illustré à la figure 2.3. Ce changement conformationnel se traduit en termes spectraux par une augmentation des nombres d'onde des bandes CH, ainsi qu'une diminution de leur hauteur, accompagnée d'un élargissement, ce qui traduit une plus grande variété de conformations.

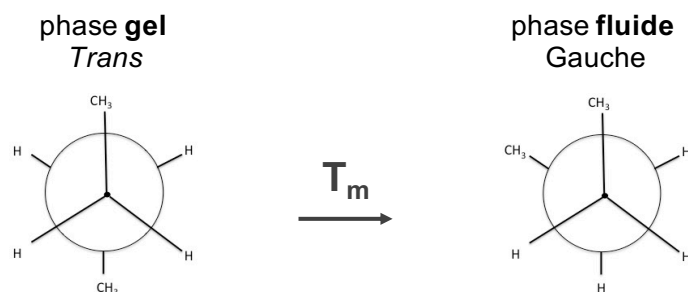


Figure 2.3. Représentation de Newman du changement de conformation des CH₂ des chaînes acyle lors de la transition de phase, avec le passage d'une conformation *trans* à *gauche*.

En traçant la position du maximum de $\nu_s(\text{CH}_2)$ en fonction de la température, tel qu'illustré à la figure 2.4, on obtient une courbe de thermotropisme qui informe à la fois sur les phases gel et fluide, mais également sur la transition de phase. La T_m correspond au point d'inflexion de cette courbe, qui permet par ailleurs d'obtenir de l'information sur l'amplitude et la coopérativité de cette transition de phase. De cette manière il est possible d'observer si une biomolécule a une quelconque influence sur le degré d'ordre –l'isomérisation *trans-gauche*– des chaînes acyle des phospholipides d'une membrane modèle, ainsi que sur la température de transition de phase et sa coopérativité. La vibration d'élongation symétrique des CH₂ est préférée à celle d'élongation asymétrique. Bien que cette dernière puisse nous renseigner de la même manière, les chaînes latérales des acides aminés ont plus tendance à avoir une contribution dans cette bande, ce qui rend l'interprétation des résultats légèrement moins fiable.

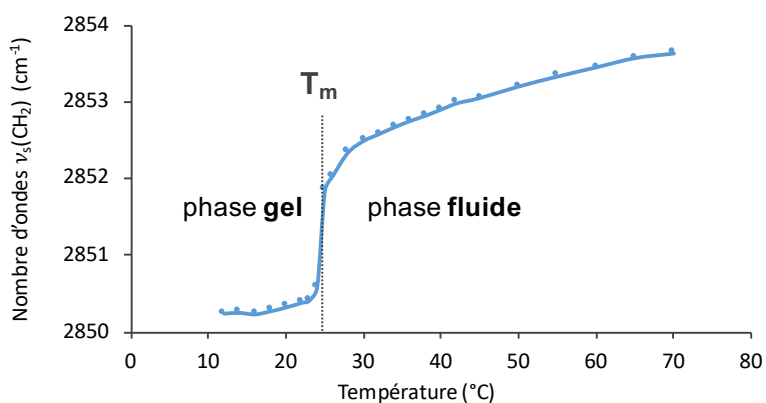


Figure 2.4. Courbe de thermotropisme d'une suspension de membranes modèles DMPC:DMPG (1:1). Cette courbe correspond au tracé de la position du maximum de la bande d'élongation symétrique $\nu_s(\text{CH}_2)$ en fonction de la température. T_m correspond à la température de transition de phase.

Il est également possible d'étudier des phospholipides avec des chaînes acyle deutérées (figure 2.5). Les fréquences de vibration des groupements CD_2 et CD_3 ($\nu_s(CD_2, CD_3)$ et $\nu_{as}(CD_2, CD_3)$) se trouvent à plus bas nombres d'ondes que leurs équivalents $\nu_{as}(CH_3, CH_2)$ et $\nu_s(CH_3, CH_2)$, tel que dicté par la formule de l'oscillateur harmonique, entre 2000 et 2200 cm^{-1} , sans toutefois que cette deutération n'affecte les constantes de force²⁵. Cette caractéristique permet d'étudier simultanément et individuellement des phospholipides deutérés et non deutérés dans des mélanges, étant donné que les signaux sont séparés. On peut ainsi obtenir une information distincte sur l'ordre et le désordre de chaque type de phospholipides au sein de MLVs (dans le cas d'un système binaire).

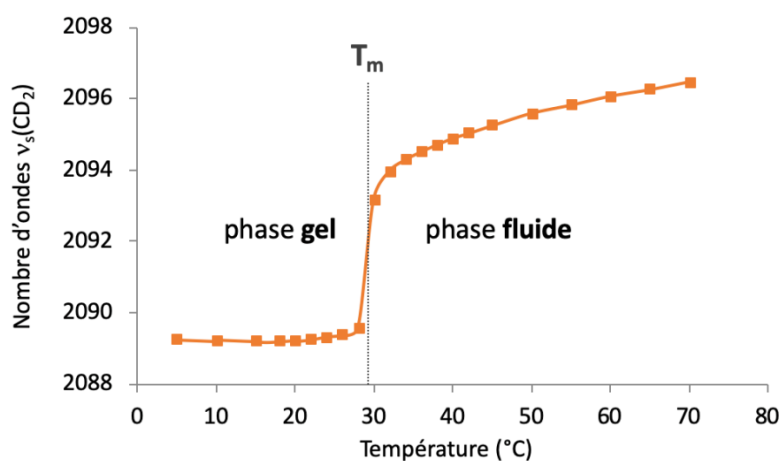


Figure 2.5. Courbe de thermotropisme d'une suspension de membranes modèles DPPC- d_{62} :DMPG (1:1). Cette courbe correspond au tracé de la position du maximum de la bande d'élongation symétrique $\nu_s(CD_2)$, donc associée à la DPPC- d_{62} en fonction de la température. T_m correspond à la température de transition de phase.

Région des C=O ester

La région d'élongation des C=O ester permet d'obtenir de l'information sur l'hydratation de la zone interfaciale des phospholipides des membranes. En effet, les carbonyles ester peuvent lier des molécules d'eau, notamment lorsque les phospholipides se trouvent en phase fluide. Un exemple de bande C=O ester et de l'effet de la température est donné à la figure 2.6.

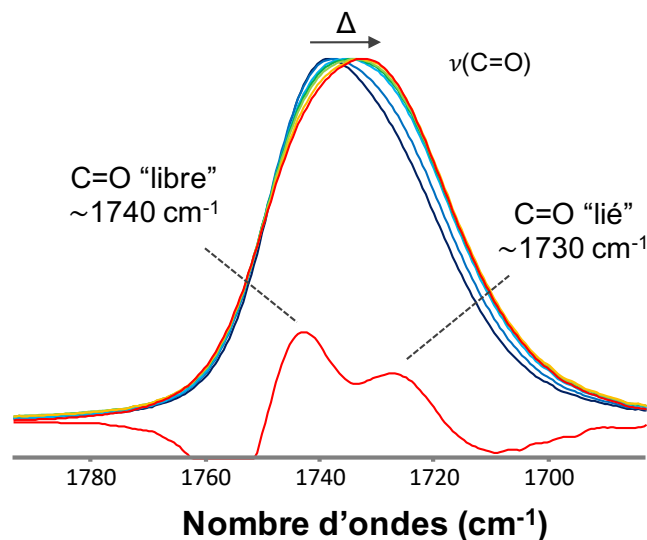


Figure 2.6. (A) Bande des C=O ester de DMPC à différentes températures (Δ représente la tendance lors du chauffage de la suspension de membranes modèles) et (B) dérivée seconde de la bande C=O ester à 5° C pour illustrer les deux composantes C=O libre ($\sim 1740\text{ cm}^{-1}$) et C=O lié ($\sim 1730\text{ cm}^{-1}$).

La bande qui correspond à l'élongation des carbonyles est asymétrique. Celle-ci est en fait la somme de deux bandes très proches, et centrées autour de 1740 et 1730 cm^{-1} ^{8,26-27}. La dérivée seconde du premier spectre permet de révéler ces deux composantes : une composante à 1740 cm^{-1} , qui correspond à des C=O « libres », et une composante à 1730 cm^{-1} qui correspond à des C=O « liés ». Les termes « libre » et « lié » font référence à une liaison avec une (ou plusieurs) molécule(s) d'eau. Au moment de la transition de phase, une majorité des C=O sont hydratés, comme le montre la figure 2.7 qui trace la position du maximum de la bande C=O en fonction de la température. À chaque température, les deux composantes contribuent à la bande, mais dans des proportions différentes. Plus la température augmente et plus la contribution de la composante C=O « lié » est importante, quand dans le même temps la contribution relative de la composante C=O « libre » diminue. De manière similaire à la courbe de thermotropisme des chaînes acyle, celle des C=O ester nous renseigne sur l'hydratation de la région interfaciale des phospholipides dans la phase gel et la phase fluide, et sur la transition de phase (température, amplitude et coopérativité). Finalement, dans la phase fluide, les phospholipides sont plus hydratés que dans la phase gel, d'où la contribution plus importante de la composante C=O « lié »²⁷. Un exemple de courbe de thermotropisme est donné à la figure 2.7.

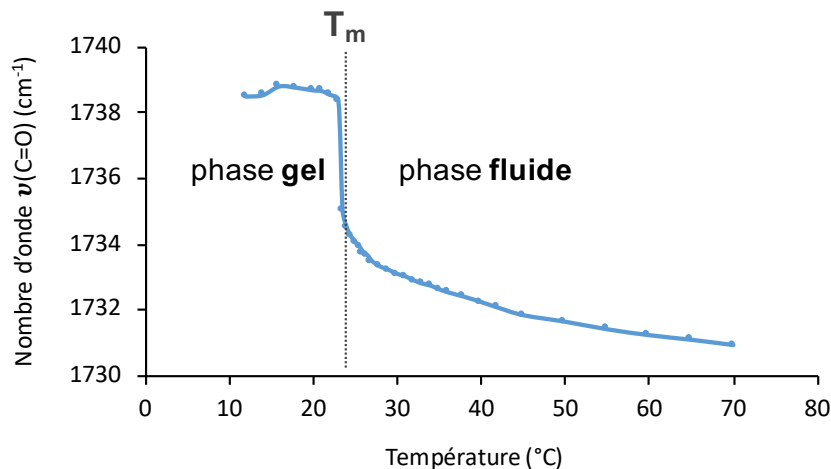


Figure 2.7. Courbe de thermotropisme d’une suspension de membranes modèles DMPC:DMPG (1:1). Cette courbe correspond au tracé de la position du maximum de la bande d’élongation $\nu(\text{C}=\text{O})$ en fonction de la température. T_m correspond à la température de transition de phase.

De la même manière que pour les phospholipides aux chaînes deutérées, il est possible de séparer deux signaux provenant des carbonyles de deux types de phospholipides. Pour cela il faut utiliser des phospholipides marqués au $^{13}\text{C}=\text{O}$, dont le nombre d’ondes de vibration est plus bas que celui des phospholipides avec des carbonyles $^{12}\text{C}=\text{O}$ ²⁷, la bande $\nu(^{13}\text{C}=\text{O})$ étant centrée autour de 1700 cm^{-1} .

2.1.4 Réflexion totale atténuée (ATR)

La technique ATR (*attenuated total reflectance*) est communément utilisée pour étudier des échantillons solides. Les échantillons sont déposés sur un matériau ayant un indice de réfraction élevé, qui absorbe le moins possible dans la région d’intérêt. Dans notre cas, il s’agit d’un diamant de géométrie trapézoïdale. L’angle d’incidence du faisceau infrarouge doit être supérieur à l’angle critique, de manière à produire le phénomène de réflexion totale interne²⁸. La valeur de l’angle critique θ_c peut être obtenue en reformulant la loi de Snell-Descartes :

$$\theta_c = \sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right), \quad (2.5)$$

où n_1 et n_2 représentent les indices de réfraction du diamant et du milieu externe, respectivement. Le parcours optique du faisceau infrarouge est illustré à la figure 2.8.

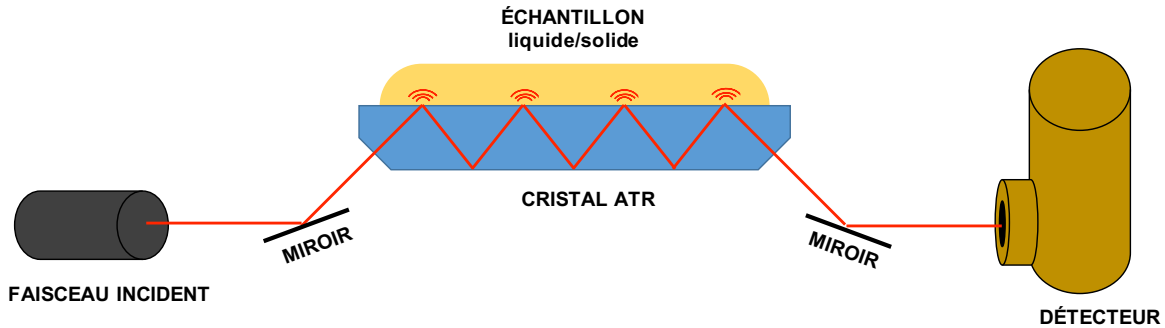


Figure 2.8. Illustration d'un montage ATR multi-réflexions, avec le parcours du faisceau infrarouge entre la source et le détecteur. Les ondulations présentes à l'interface cristal/échantillon représentent les ondes évanescentes.

Le phénomène d'ATR produit l'apparition d'ondes évanescentes, décrites par les équations de Maxwell²⁸, et qui vont sonder l'échantillon suivant la normale à la surface du cristal, permettant ainsi d'obtenir de l'information sur l'échantillon. La pénétration d'ondes évanescentes dans l'échantillon s'étend sur une profondeur de l'ordre du dixième de μm .

2.1.5 Considérations expérimentales

Les quantités d'échantillon nécessaires sont relativement faibles, de l'ordre de 10 à 50 μL de solution à des concentrations entre 1 et 10% m:v pour une suspension²⁹. Le plus gros inconvénient de la spectroscopie IR pour l'étude de systèmes biologiques est l'eau : celle-ci absorbe très intensément dans l'IR, notamment au niveau de la bande amide I. Pour contourner ce problème, on peut remplacer l'eau par de l'eau « lourde », ou eau deutérée (D_2O), dont les bandes d'absorption ($2450\text{-}2540\text{ cm}^{-1}$ et $1215\text{-}1555\text{ cm}^{-1}$) ne perturbent pas les études spectroscopiques de systèmes protéine-membrane. Lors d'utilisation de tampons deutérés, la bande amide I est notée bande amide I', pour signifier que les H des liens peptidiques sont deutérés. Les études en transmission se font à l'aide d'une cellule de fluorure de calcium (CaF_2), transparente dans l'IR, avec un parcours optique de 40 μm , et scellée à l'aide d'une solution huile de paraffine:chloroforme (2:1, v:v) qui rend la cellule hermétique et prévient donc la transformation de O-D en O-H. Ces considérations expérimentales sont

également valables pour la spectroscopie VCD. Pour la suite, il est précisé lorsque des spectres ont été enregistrés par ATR. Lorsqu'aucune précision n'est donnée, il s'agit de spectres en transmission. Les paramètres d'acquisition typique des spectres sont donnés dans la partie expérimentale du chapitre 6.

2.2 Dichroïsme circulaire vibrationnel

2.2.1 Théorie, appareil et signal

Le dichroïsme circulaire vibrationnel (VCD) est une technique basée sur la différence d'absorption par des molécules, de lumière polarisée circulairement gauche et droite. La source de lumière incidente émet dans la région infrarouge du spectre électromagnétique, de sorte que les vibrations moléculaires actives en infrarouge peuvent également l'être en VCD. Le grand nombre de chromophores actifs dans l'infrarouge rend cette technique particulièrement intéressante pour la caractérisation structurale de molécules organiques, de biomolécules ou de molécules inorganiques.

La technique de VCD a vu le jour dans les années 1970, avec des premières mesures sur des molécules chirales, telles que le 2,2,2-trifluoro-1-phényléthanol³⁰, ou le α -NiSO₄ · 6 H₂O et α -ZnSeO₄ · 6 H₂O³¹. Ces premières études ont permis de valider la méthode VCD, ainsi que d'optimiser les différents paramètres d'acquisition. Avant d'être disponible commercialement, les spectromètres VCD étaient tous issus d'une fabrication au sein-même des laboratoires. Un schéma simplifié d'un montage VCD est donné à la figure 2.9.

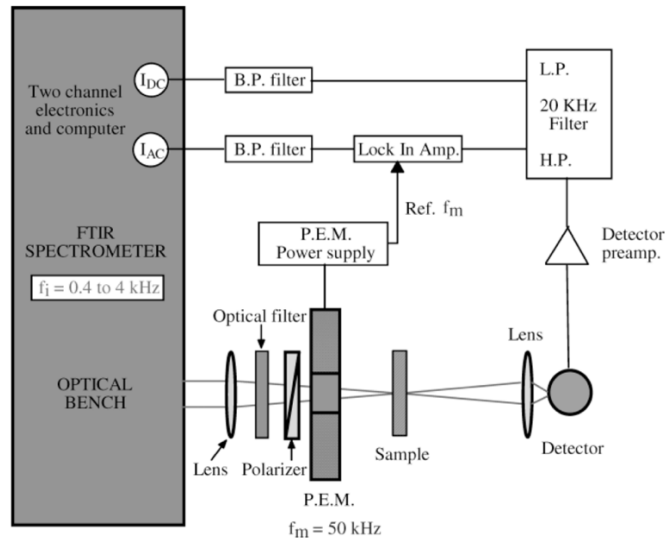


Figure 2.9. Illustration de l'appareillage VCD avec la partie optique et la partie traitement du signal. P.E.M. correspond à *photoelastic modulator* (modulateur photoélastique), L.P. et H.P. à *low-pass* et *high-pass filters* (filtres passe-bas et passe-haut), respectivement, f_m à la fréquence de modulation du P.E.M. et I_{DC} et I_{AC} correspondent aux signaux de modulation d'intensité et de modulation de polarisation, respectivement. Figure reprise de Buffeteau *et al.*³² avec permission, Copyright © 2005, SAGE Publications.

Tel qu'expliqué plus haut, le signal VCD correspond à la différence d'absorption entre deux lumières polarisées circulairement gauche et droite (figure 2.10). Conventionnellement, le signal VCD s'exprime tel que $\Delta A = A_L - A_R$. Cependant, ce signal ΔA , habituellement de l'ordre de 10^{-5} , est très faible en intensité comparé aux intensités d'absorbance en transmission. La faiblesse du signal ΔA est la raison pour laquelle le VCD est basée sur la modulation de polarisation. La théorie voudrait que ΔA puisse être obtenu simplement par la différence de deux spectres, l'un obtenu avec une polarisation circulaire gauche, et l'autre obtenu ensuite avec une polarisation circulaire droite. Cependant, le signal de différence est tellement faible que d'inévitables artefacts faussent les résultats de soustraction, ce qui explique la nécessité d'introduire une modulation de polarisation très rapide (50 kHz).

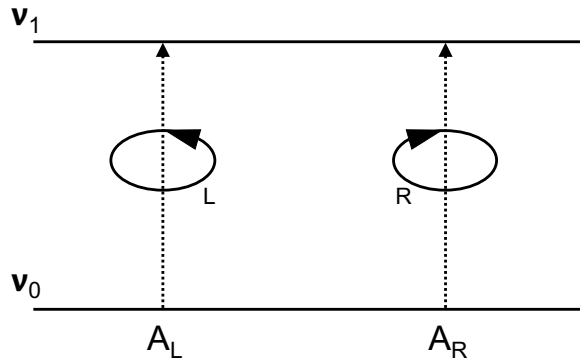


Figure 2.10. Illustration de l'absorption de la lumière IR polarisée circulairement gauche (L) et droite (R). Figure modifiée à partir de Nafie³³ avec permission, Copyright © 1996, SAGE Publications.

D'un point de vue technique, la modulation de polarisation nécessite l'utilisation d'un modulateur photoélastique (PEM). Ce dernier est capable de polariser une onde polarisée linéairement en une onde polarisée circulairement droite, et une autre polarisée circulairement gauche. Le fonctionnement du PEM repose sur le principe de la piézo-optique. Le cristal (en ZnSe dans notre cas) subit des déformations mécaniques, de manière à le rendre biréfringent, c'est-à-dire que la lumière va s'y propager de manière anisotrope, ce qui est provoqué par la présence de différents indices optiques en fonction de la direction de propagation. La figure 2.11 illustre de manière schématisée la modulation de polarisation par passage à travers un PEM.

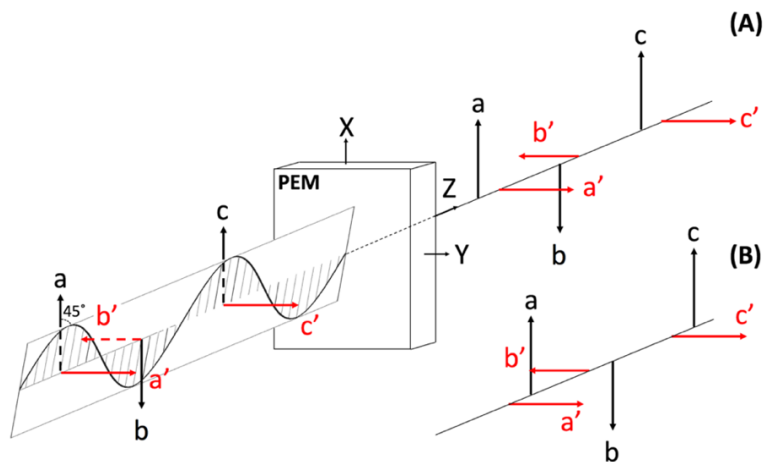


Figure 2.11. Illustration du fonctionnement d'un PEM. (A) $n_x > n_y$; retard de phase $\delta = \lambda/4 \equiv$ polarisation circulaire droite. (B) $n_x < n_y$; $\delta = -\lambda/4 \equiv$ polarisation circulaire gauche. Figure inspirée de Drake³⁴ avec permission, Copyright © 1986, IOP Publishing.

Le signal arrive sous forme de lumière polarisée linéairement, et peut être définie par deux composantes abc et $a'b'c'$. Cette lumière arrive avec un angle de 45° par rapport aux axes de compression du cristal piézo-optique (X et Y), qui est rendu biréfringent par compression de l'axe X ou Y ($n_x \neq n_y$). Cette différence d'indice optique fait en sorte qu'une des deux composantes de la lumière, abc ou $a'b'c'$, passera au travers du cristal plus rapidement que l'autre. Dans le cas où $n_x > n_y$, la composante en X (abc) sera ralentie par rapport à la composante Y ($a'b'c'$), ce qui donnera lieu à une lumière polarisée circulairement droite. À l'inverse, dans le cas où $n_x < n_y$, la composante $a'b'c'$ sera ralentie par rapport à la composante abc , et la lumière résultante sera alors polarisée circulairement gauche. Ainsi, tel que montré à la figure 2.11 (A), un retard d'onde $\delta = \lambda/4$ de la composante X conduira à une polarisation circulaire droite. Symétriquement, un retard d'onde de $\delta = -\lambda/4$ de la composante Y donnera lieu à une polarisation circulaire gauche. Il est à noter que dans le cas de retards d'onde de $\delta = \pm\lambda/2$, les lumières résultantes sont polarisées linéairement (parallèle et perpendiculaire), pour mener des expériences de dichroïsme linéaire ou encore de spectroscopie IR de réflexion-absorption par modulation de polarisation (PM-IRRAS). Le retard de phase δ , provoqué par compression des axes X et Y du cristal piézo-optique, induit une polarisation ellipsoïdale de la lumière, ce phénomène est appelé modulation de polarisation.

Après passage à travers le PEM puis l'échantillon, le faisceau est focalisé sur un détecteur externe haute vitesse (semi-conducteur refroidi à l'azote liquide). Le signal est ensuite amplifié puis séparé dans deux canaux. Le premier signal subit une transformation de Fourier directement à la sortie du filtre passe-bas (8 kHz). Le signal $I_{DC}(\nu)$ donne le spectre en transmission. Le signal dans l'autre canal, après passage dans le filtre passe-haut (20 kHz), est dirigé vers un amplificateur à détection synchrone (*lock-in amplifier*, LIA) qui opère à la fréquence de polarisation du PEM. Le LIA amplifie sélectivement le faible signal de différence provenant du dichroïsme circulaire de l'échantillon, puis subit une transformée de Fourier pour devenir $I_{AC}(\nu)$. Le ratio $I_{AC}(\nu)/I_{DC}(\nu)$ est proportionnel à ΔA , et est ensuite traité pour obtenir le spectre VCD.

Pour faire le parallèle avec la spectroscopie IR décrite par la force de l'oscillateur, il faut, pour avoir un signal en VCD, en plus du critère de sélection IR, pour une transition entre les niveaux vibrationnels **0** et **1**, du mode normal de vibration **a**, où la force rotationnelle R^a_{01} s'écrit³⁵ :

$$R^a_{01} = \frac{\hbar}{2i\omega_a} \left(\frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q_a} \right)_0 \cdot \left(\frac{\partial \vec{m}}{\partial Q_a} \right)_0 \quad (2.6)$$

que :

$$\left(\frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q_a} \right)_0 \cdot \left(\frac{\partial \vec{m}}{\partial Q_a} \right)_0 \neq 0, \quad (2.7)$$

où $\vec{\mu}$ et \vec{m} sont respectivement les vecteurs des moments électrique et magnétique d'une liaison chimique, et Q la position. Puisque la force rotationnelle est le produit scalaire des vecteurs des moments électrique et magnétique d'une liaison chimique, il faut qu'aucun d'eux ne soit nul, ni orthogonaux. De plus, si l'angle entre $\vec{\mu}$ et \vec{m} est supérieur à 90° , le signal VCD sera négatif, et inversement.

2.2.2 Applications

Les premières applications en VCD, datant des années 1970 et portant sur des molécules inorganiques, étaient limitées par un domaine spectral plus restreint qu'aujourd'hui pour des raisons techniques^{30-31,36}. Depuis, le nombre d'études portées sur les biomolécules a considérablement augmenté, que ce soit pour de l'ADN³⁷⁻⁴⁰, des oligonucléotides⁴¹⁻⁴³, des peptides ou des protéines^{32,44-48}. Le VCD est également une technique très puissante pour la caractérisation de molécules organiques, comme l'illustre la figure 2.12, qui montre les spectres VCD de deux énantiomères du camphre, aux signes opposés quand les spectres IR sont identiques. Le VCD permet donc de déterminer la configuration absolue de molécules chirales, ainsi que de calculer des excès énantiomériques à l'aide de calculs de DFT (*density functional theory*). Cette force du VCD est particulièrement utile dans l'industrie pharmaceutique, où il est nécessaire d'obtenir les eutomères des molécules synthétisées, et non pas les distomères, qui dans le meilleur des cas

sont inactifs, et dans le pire, peuvent être nocifs, comme l'a démontré le cas de la thalidomide⁴⁹.

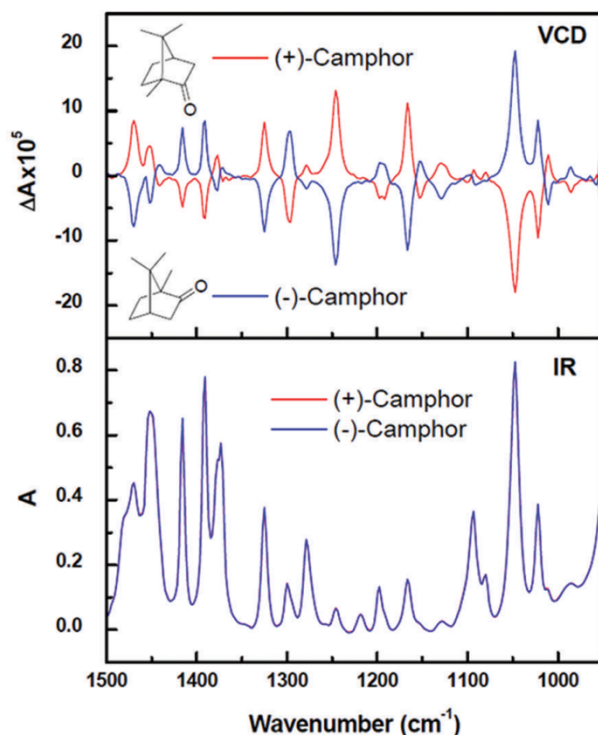


Figure 2.12. Spectres VCD (haut) et IR (bas) des deux énantiomères du (+)-camphre (-)-camphre. Tiré de He *et al.*⁵⁰, avec permission Copyright © 2011, © SAGE Publications

Le VCD est complémentaire de la spectroscopie IR pour l'étude de biomolécules. L'inconvénient de la spectroscopie IR est la proximité des fréquences de vibration de certaines structures secondaires dans la région amide I, ce qui peut compliquer l'analyse spectrale. Par exemple, les biomolécules désordonnées peuvent être difficilement distinguées par rapport aux hélice- α . Par ailleurs, le VCD est, contrairement à l'IR, capable de discriminer une conformation totalement désordonnée d'une structure en pelote statistique (*random coil*)^{44-45,48}. Le VCD offre des patrons très distincts pour chaque structure secondaire, tel qu'illustré à la figure 2.13.

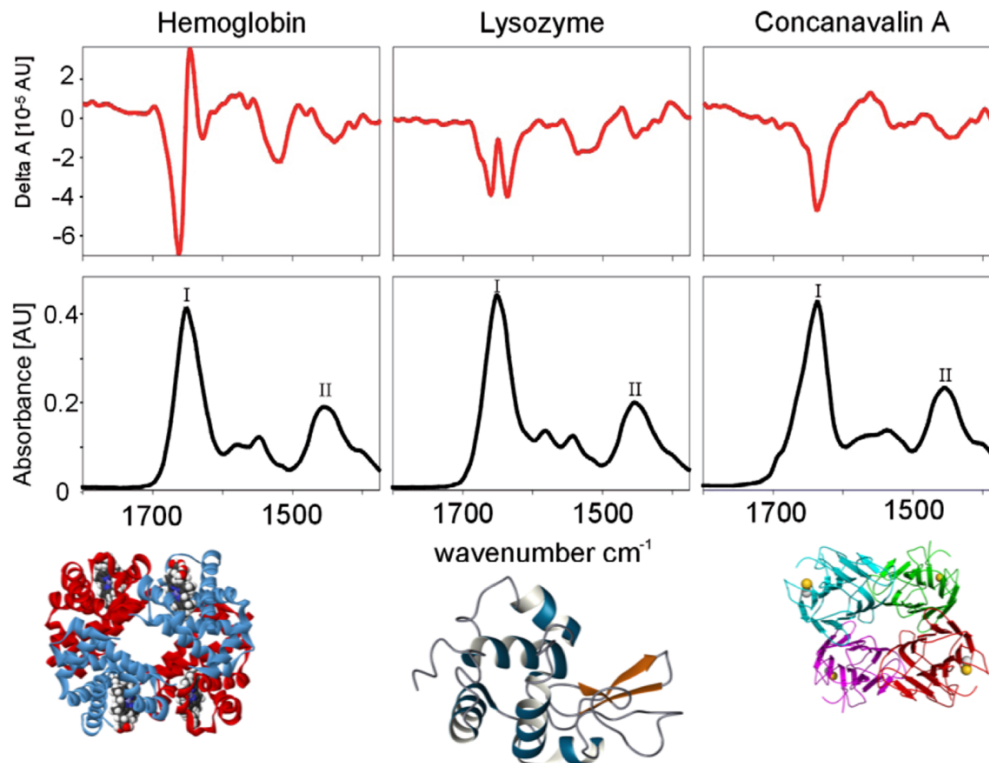


Figure 2.13. Spectres VCD (haut) et IR (bas) de l'hémoglobine, du lysozyme et de la concanavoline A obtenus à 50 mg/mL dans du D₂O. Figure reprise de Bruker.com⁵¹

La figure 2.13 compile les spectres VCD de trois protéines, l'hémoglobine, le lysozyme et la concanavoline A, qui ont des structures secondaires majoritairement en hélice- α , en mélange d'hélice- α et de feuillet- β et majoritairement en feuillet- β , respectivement.

Le VCD appliqué aux protéines et peptides amyloïdes a connu un intérêt soudain dans la communauté scientifique suite à une publication du groupe du Pr. Nafie à Syracuse University⁵². Une description détaillée de tels travaux effectués par VCD pour l'études d'amyloïdes est donnée au Chapitre 3, dans le cadre d'une revue de littérature, et dans la partie introduction du Chapitre 4, qui est un article présentant des résultats obtenus par VCD.

2.3 RMN de l'état solide

La RMN a vu le jour dans les années 1940-1950, avec les Professeurs Felix Bloch (Stanford) et Edward Purcell (Harvard) qui ont été les pionniers de cette technique, et qui se sont vu attribuer le Prix Nobel de physique en 1952⁵³⁻⁵⁶. En ce qui a trait à la RMN de l'état

solide, le professeur John Waugh (MIT) a posé des bases théoriques et pratiques d'un grand nombre de concepts sur lesquelles les expériences d'aujourd'hui sont toujours fondées⁵⁷⁻⁶¹.

Nous allons aborder dans cette section les principes fondamentaux de la spectroscopie RMN, et détailler les techniques utilisées dans cette thèse en insistant sur les aspects théoriques pertinents pour l'étude d'interactions peptide/membranes. La partie concepts fondamentaux est basée sur trois ouvrages⁶²⁻⁶⁴. La partie présentant la théorie des interactions en RMN de l'état solide est quant à elle basée sur deux autres ouvrages⁶⁵⁻⁶⁶, complémentaires aux précédents.

2.3.1 Concepts fondamentaux

Moment angulaire de spin et magnétisation nucléaire

La résonance magnétique est un phénomène physique rencontré dans des systèmes magnétiques qui possèdent à la fois des moments magnétique et angulaire de spin. Ce moment angulaire de spin, plus communément appelé spin, est une propriété quantique intrinsèque aux particules et dont les valeurs dépendent directement du nombre quantique de spin I :

$$\vec{I} = [I(I + 1)]^{1/2} \hbar, \quad (2.8)$$

où \vec{I} est le moment angulaire de spin, I le nombre de spin et \hbar la constante de Planck réduite ($1,055 \cdot 10^{-34}$ J.s). \vec{I} peut prendre $(2I+1)$ orientations dans l'espace selon un axe arbitraire habituellement nommé axe z . La projection de \vec{I} sur l'axe z prend donc la forme :

$$I_z = m \hbar, \quad (2.9)$$

m étant le nombre quantique magnétique pouvant prendre $(2I+1)$ valeurs possibles. Ainsi, pour les noyaux de spin $\frac{1}{2}$ ($I = \frac{1}{2}$) comme ^1H , ^{13}C , ^{15}N et ^{31}P (entre autres), I_z peut prendre les valeurs $\pm \hbar/2$. Pour les noyaux de deutérium ^2H et ^{14}N , plus utilisés pour l'étude membranes modèles, et qui ont un spin égal à 1 ($I = 1$), trois orientations sont possibles, soit $I_z = 0, \pm \hbar$.

Les moments magnétique et angulaire d'un noyau sont reliés par la formule :

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{I}, \quad (2.10)$$

où γ est le rapport gyromagnétique du noyau en question, c'est-à-dire le rapport entre ses moments magnétique et cinétiques, et qui s'exprime en $T^{-1} \cdot s^{-1}$. Ainsi, un noyau au rapport gyromagnétique positif aura ses moments magnétique et électrique orientés parallèlement, et un noyau avec un γ négatif aura ses moments magnétique et électrique orientés antiparallèlement.

Effet du champ magnétique – Fréquence de Larmor

Lorsqu'un noyau est placé dans un champ magnétique externe B_0 suivant l'axe z , par définition en RMN, les vecteurs moment magnétique $\vec{\mu}$, qui sont à la base tous au même niveau d'énergie, vont subir une levée de dégénérescence, et prendre des valeurs d'énergie données par la formule :

$$E = -\mu_z B_0 = -m\gamma\hbar B_0, \quad (2.11)$$

où μ_z est la projection du moment magnétique sur l'axe z . Ainsi, pour un noyau de spin $\frac{1}{2}$, deux états d'énergie sont accessibles, pour $m = \pm\frac{1}{2}$, et sont appelés états α et β . La différence d'énergie entre ces deux niveaux est donnée et illustrée à la figure 2.14 :

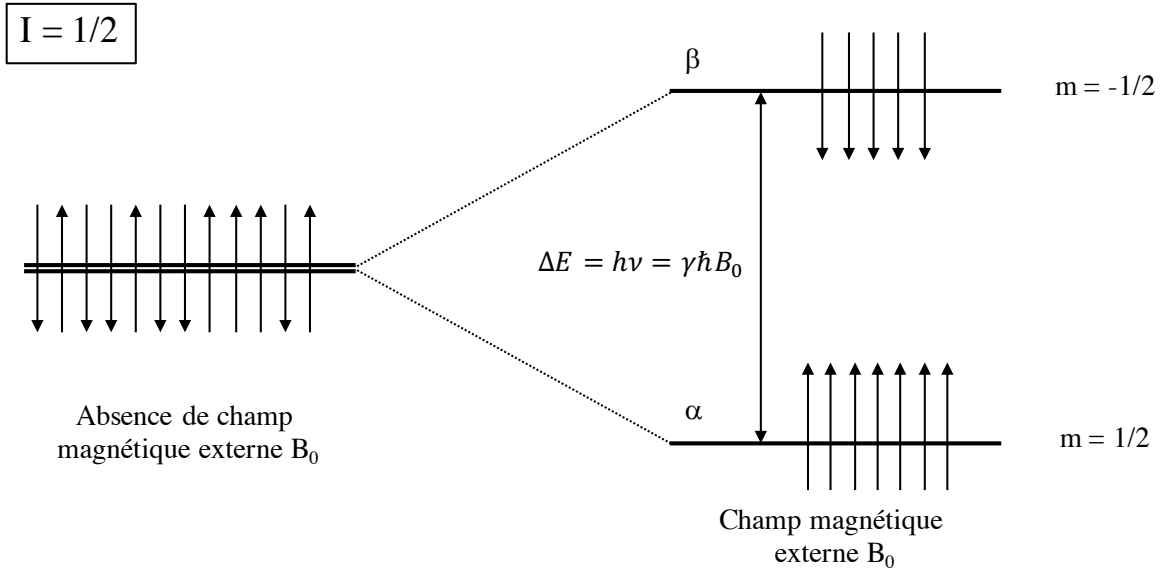


Figure 2.14. Niveaux d'énergie non dégénérés à gauche (absence de champ magnétique B_0), et dégénérés à droite (dans un champ magnétique externe B_0), pour un spin $I = 1/2$. Ici, ν correspond à la fréquence de la radiation électromagnétique nécessaire pour la transition d'énergie du niveau où $m = 1/2$ à $m = -1/2$.

Quand ils sont placés dans un champ magnétique externe, les noyaux possédant des moments angulaire et de spin vont adopter un mouvement de précession autour du vecteur du champ \vec{B}_0 , c'est la précession de Larmor. La fréquence de Larmor est propre à chaque noyau, puisque celle-ci est directement reliée au rapport gyromagnétique par la formule :

$$\nu(\text{Hz}) = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (2.12)$$

Le signe de la fréquence de Larmor, donc le sens de précession des spins, dépend du signe du rapport gyromagnétique. Pour un noyau avec un γ positif, par exemple ^{13}C , la précession se fera dans le sens horaire, et le niveau d'énergie α sera celui de plus faible énergie. À l'opposé, un noyau avec un γ négatif, par exemple ^{15}N , va voir ses spins adopter une précession dans le sens antihoraire, et le niveau de plus faible énergie sera dans son cas le niveau β . Ce phénomène est illustré à la figure 2.15.

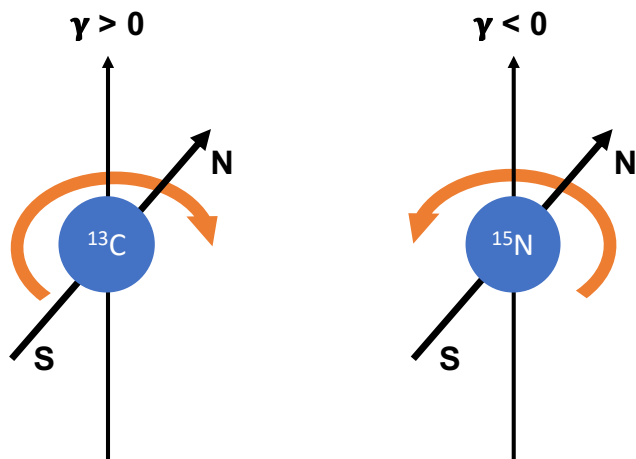


Figure 2.15. Illustration de la précession de Larmor pour deux noyaux, ^{13}C et ^{15}N , de rapports gyromagnétiques positif et négatif, respectivement.

Les données des principaux noyaux étudiés lors d'études de protéines et de membranes modèles sont compilées dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3. Valeurs de spin, d'abondance naturelle, du rapport gyromagnétique et de la fréquence de Larmor (à 9,4 T) pour les noyaux actifs en RMN les plus communément étudiés.

Noyau	Valeur de spin I	Abondance naturelle (%)	Rapport gyromagnétique γ ($10^7 \text{ rad.T}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	Fréquence de Larmor (à 9,4 T)
^1H	1/2	99,98	26,75	400,0
^2H	1	0,015	4,11	61,5
^{13}C	1/2	1,07	6,73	100,6
^{15}N	1/2	0,37	-2,71	40,5
^{31}P	1/2	100	10,84	161,9

Impulsions radiofréquence et relaxation

Un système à l'équilibre dans un champ magnétique B_0 voit ses spins répartis entre les états α et β , avec un léger excédent dans le niveau d'énergie inférieur α . Cette répartition suit la distribution de Boltzmann, dont l'expression est la suivante :

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp^{-\Delta E/k_B T}, \quad (2.13)$$

où N_α et N_β correspondent respectivement aux populations des états d'énergie α et β , ΔE à la différence d'énergie entre les niveaux α et β , k_B à la constante de Boltzmann, et T à la température. Cette différence de population entraîne une aimantation nette dans la direction de B_0 , comme illustré à la figure 2.16.

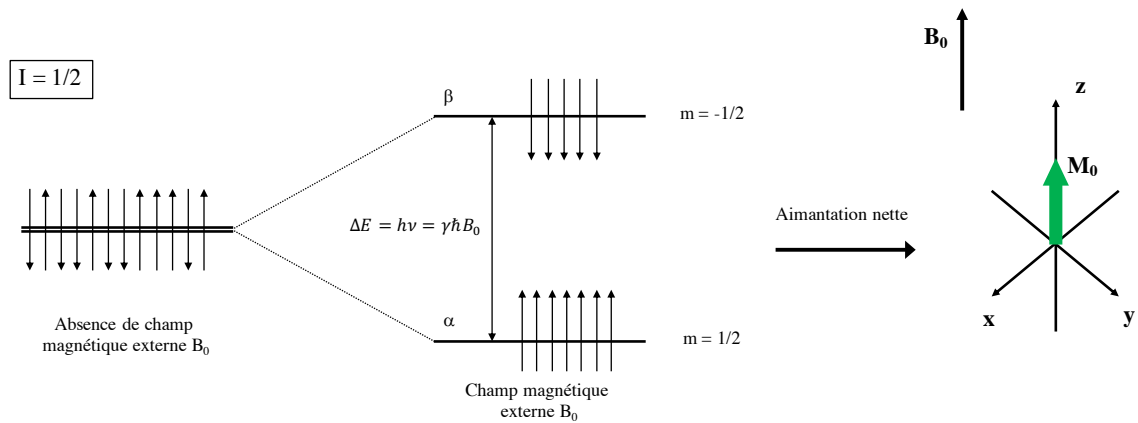


Figure 2.16. Génération de l'aimantation nette M_0 par la surpopulation de spins au niveau d'énergie α .

Lors d'une expérience RMN, un champ magnétique perpendiculaire à B_0 , le champ B_1 , est appliqué sur l'échantillon. Cette impulsion radiofréquence est synchronisée à la fréquence de Larmor du noyau étudié, de manière à produire ce qu'on appelle la résonance magnétique. L'impulsion produite par B_1 fait basculer les moments magnétiques des spins dans le plan (xy) , qui précessent alors autour de B_1 , générant ainsi une aimantation nette dite transversale, M_{xy} . Cette impulsion va provoquer des transitions, puis un équilibrage entre les populations des niveaux d'énergie α et β , jusqu'à atteindre la saturation. Une fois l'impulsion terminée, les spins reviennent à leur état d'équilibre initial le long de B_0 . Cette relaxation, dite longitudinale, ou spin-réseau, se produit grâce à des échanges d'énergie avec les champs magnétiques locaux du milieu environnant oscillant à la fréquence de Larmor. Ce retour à l'équilibre se traduit par un signal de précession libre (*free induction decay*, FID) qui est mesurable. L'intensité de ce signal décroît dans le temps, et correspond à une diminution de l'aimantation M_{xy} en faveur de l'aimantation M_0 selon l'axe z , M_z .

La valeur de M_z en fonction du temps est donnée par l'équation suivante :

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-t/T_1}), \quad (2.14)$$

où t est le temps, et T_1 le temps nécessaire pour recouvrer 63% de l'aimantation initiale M_0 selon l'axe z . T_1 dépend largement de l'environnement de celui-ci. Une mesure de T_1 permet donc d'obtenir de l'information sur l'environnement local des noyaux d'intérêt.

Le deuxième mécanisme de relaxation s'appelle relaxation transversale, et a trait à la décroissance de l'aimantation transversale M_{xy} . Autrement appelée relaxation spin-spin, celle-ci a lieu sans transfert d'énergie avec le réseau, et a un effet direct au niveau spectral, à savoir au niveau de la largeur des raies. Ainsi, plus un T_2 est court, plus les raies seront larges. La valeur de l'aimantation transversale en fonction du temps est donnée par l'équation suivante :

$$M_{xy}(t) = M_0 \left(e^{-t/T_2} \right), \quad (2.15)$$

où T_2 est le temps de relaxation transversale. Lorsque $t = T_2$, M_{xy} n'est plus qu'à 37% de sa valeur initiale (au moment de l'arrêt de l'impulsion). Ce phénomène de relaxation est provoqué par la perte de cohérence des spins responsables de M_{xy} . Les fluctuations des champs magnétiques locaux provoquent des changements aléatoires au niveau des vitesses de précession des spins, induisant ainsi un déphasage par rapport à l'état initial post-impulsion, et menant finalement à une aimantation M_{xy} nulle. Le FID est une mesure de cette décroissance de l'aimantation dans le plan (xy) via une bobine placée autour de l'échantillon. Pour des échantillons tels que des liquides, où les mouvements sont très rapides, T_1 et T_2 sont du même ordre de grandeur. Pour ce qui est de la RMN de l'état solide, où les mouvements sont plus lents, T_2 est plus court que T_1 .

2.3.2 Spins nucléaires en RMN de l'état solide

Un spectre RMN est la résultante des interactions entre les spins nucléaires et les champs magnétiques interne et externe. D'un point de vue de mécanique quantique sommaire, ces interactions peuvent s'exprimer sous la forme d'un hamiltonien total \mathcal{H} relié à l'énergie totale E du système suivant l'équation de Schrödinger indépendante du temps :

$$\mathcal{H}\psi = E\psi, \quad (2.16)$$

où ψ , fonction d'onde du spin, contient toute l'information quantique du spin. L'hamiltonien total du système \mathcal{H} est la somme de six hamiltoniens qui décrivent toutes les interactions possibles ressenties par un spin dans un champ magnétique :

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_{RF} + \mathcal{H}_{CS} + \mathcal{H}_D + \mathcal{H}_J + \mathcal{H}_Q, \quad (2.17)$$

où $\mathcal{H}_Z, \mathcal{H}_{RF}, \mathcal{H}_{CS}, \mathcal{H}_D, \mathcal{H}_J$ et \mathcal{H}_Q sont respectivement les hamiltoniens décrivant les interactions de Zeeman, de radiofréquence, de déplacement chimique, de couplage dipolaire, de couplage scalaire et de couplage quadrupolaire. Seuls les hamiltoniens $\mathcal{H}_Z, \mathcal{H}_{CS}$ et \mathcal{H}_D seront décrits ici puisque nécessaires à la suite de la théorie.

Interaction de Zeeman

L'interaction de Zeeman est définie comme étant l'interaction entre un spin et le champ magnétique, origine de la levée de dégénérescence des niveaux d'énergie (Figure 2.14). La découverte de cet effet a valu à Pieter Zeeman le prix Nobel de physique en 1902. Concrètement et simplement, plus un champ magnétique est élevé et plus les transitions engendrées se feront entre des états d'énergie éloignés, ce qui aura comme effet direct d'améliorer la sensibilité (éq. 2.13). L'interaction Zeeman domine toutes les autres interactions mettant en jeu le spin, celle-ci est donc peu perturbée par ces autres interactions.

Interaction de déplacement chimique

Le déplacement chimique est dû au fait qu'un noyau donné ressentira un champ magnétique légèrement différent suivant son environnement direct, et notamment aux nuages électroniques des atomes avoisinants qui provoquent de petits champs magnétiques B' . Dans le cas d'un fort B' , le déplacement chimique sera petit, traduisant ainsi un fort blindage ou fort effet d'écran. Le champ magnétique B ressenti par un noyau s'exprime par l'équation suivante :

$$B = B_0 - B' = B_0(1 - \sigma), \quad (2.18)$$

où σ est la constante d'écran. L'équation de fréquence de résonance (2.12) devient donc :

$$\nu(\text{Hz}) = \frac{\gamma B_0(1 - \sigma)}{2\pi} \quad (2.19)$$

Alors qu'en RMN en solution les mouvements moléculaires rapides ont un effet de moyenne des tenseurs de blindage dans l'espace et produisent des raies au déplacement chimique isotrope, la RMN de l'état solide ne connaît pas un tel effet de moyenne car il s'agit de systèmes aux mouvements lents. Ceci donne lieu à des spectres larges appelés spectres de poudre, produits de l'anisotropie de déplacement chimique (ADC). En effet, la densité d'électrons autour d'un noyau n'est pas isotrope et dépend en partie de la direction des liaisons entre noyaux. La constante d'écran σ doit donc être représentée sous forme d'un tenseur de rang 2 par une matrice 3×3 (éq. 2.20), représentant géométriquement un ellipsoïde, tel qu'illustré à la figure 2.17. Cette représentation tensorielle permet de prendre en compte que le champ magnétique B' n'est pas parallèle au champ B_0 .

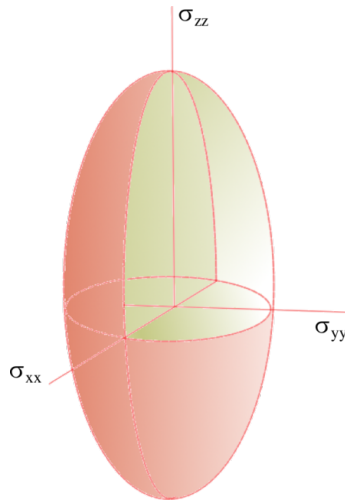


Figure 2.17. Ellipsoïde représentant la constante d'écran σ , et représentée mathématiquement par une matrice 3×3.

$$\sigma = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.20)$$

Ici, la composante matricielle σ_{yz} représente la composante du déplacement chimique dans la direction (y) quand le champ magnétique est appliqué suivant la direction (z). Il en est de même pour les autres composantes. En règle générale, le tenseur de déplacement

chimique est considéré comme symétrique autour de sa diagonale, de sorte que $\sigma_{yz} = \sigma_{zy}$. Pour chaque noyau, il est possible de trouver un référentiel, ensemble de directions orthogonales, notées X, Y et Z qui peuvent décrire le champ magnétique induit B' comme étant orienté parallèlement à B₀. Dans un tel cas, les éléments non diagonaux du tenseur disparaissent. Ce nouveau système est communément appelé système d'axes principaux (*principal axes system*, PAS) et est souvent corrélé à des éléments moléculaires structuraux telle que la direction des liens chimiques. Le nouveau tenseur de déplacement chimique σ_{PAS} peut donc être écrit comme :

$$\sigma_{\text{PAS}} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.21)$$

Dans le cas où un échantillon est animé de mouvements moléculaires rapides, le tenseur va présenter une isotropie, et donc $\sigma_{xx} = \sigma_{yy} = \sigma_{zz}$. Dans le cas de molécules aux mouvements lents telles que des biomacromolécules, il y a une ADC, et conventionnellement, la valeur donnée à la composante σ_{zz} est toujours soit plus grande, soit égale, à σ_{yy} qui est à son tour soit égale soit supérieure à σ_{xx} . Ceci a pour but de représenter la dépendance orientationnelle du déplacement chimique en fonction de l'orientation d'un groupement par rapport à B₀. L'hamiltonien \mathcal{H}_{CS} s'écrit donc :

$$\mathcal{H}_{\text{CS}} = \gamma \hbar \sigma_{zz} I_z B_0, \quad (2.22)$$

avec :

$$\sigma_{zz} = \sigma_{11} \cos^2(\alpha) \sin^2(\beta) + \sigma_{22} \sin^2(\alpha) \sin^2(\beta) + \sigma_{33} \cos^2(\beta) \quad (2.23)$$

Le terme σ_{zz} est la composante zz du tenseur de déplacement chimique exprimée dans le référentiel du laboratoire, et I_z l'opérateur de spin nucléaire du spin I. σ_{11} , σ_{22} et σ_{33} sont les valeurs, dans le PAS, des éléments diagonaux du tenseur σ_{PAS} . Les angles α et β sont les angles d'Euler reliant les axes du tenseur σ_{PAS} par rapport à B₀. Ces équations décrivent donc la relation entre l'orientation moléculaire, B₀, et le déplacement chimique : l'ADC.

Interaction dipolaire

L'interaction dipolaire concerne deux dipôles (des spins) qui interagissent à travers l'espace. Deux types de couplages dipolaires existent : les couplages homonucléaires et les couplages hétéronucléaires. L'hamiltonien du couplage dipolaire s'écrit :

$$\mathcal{H}_D = \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar^2}{r^3} (3 \cos^2 \theta - 1) I_z \cdot S_z, \quad (2.24)$$

où γ_I et γ_S sont les rapports gyromagnétiques des noyaux couplés I et S, r est la distance séparant ces deux noyaux, θ est l'angle entre le vecteur internucléaire et B_0 , et I_z et S_z sont les opérateurs de spin nucléaire associés aux noyaux I et S. Dans le cas d'un couplage homonucléaire, la formule reste la même, à l'exception que tous les termes associés au noyau S sont associés à un deuxième noyau I. La composante $(3 \cos^2 \theta - 1)$ décrit la dépendance orientationnelle de la liaison I-S ou I-I par rapport à B_0 . Ce terme, ainsi que l'ADC, peuvent devenir nul lorsque l'on définit $\theta = 54,74^\circ$ et que l'on fait tourner l'échantillon à haute fréquence de rotation à cet angle, appelé angle magique. Le terme r^3 indique la forte relation entre la distance internucléaire et la force du couplage dipolaire. Ce paramètre est notamment exploité pour les mesures de distances internucléaires en RMN.

2.3.3 RMN des membranes modèles – ^{31}P

La spectroscopie de RMN de l'état solide est particulièrement bien adaptée à l'étude de membranes modèles. De multiples noyaux peuvent être exploités dans ce cadre : ^2H , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N et ^{31}P principalement. Certains lipides modifiés par greffage d'un atome de ^{19}F sur une chaîne acyle peuvent également servir de sonde moléculaire pour des mesures de distance molécule-phospholipide⁶⁷. Nous allons ici détailler la RMN du phosphore ^{31}P .

Théorie de la RMN ^{31}P

Les phospholipides qui composent les membranes modèles comportent tous un atome de phosphore-31 de spin 1/2 (abondance naturelle de 100%) au niveau de leur tête polaire. L'étude en phosphore de membranes modèles ne nécessite donc aucun marquage isotopique, tout en fournissant une très bonne sensibilité (tableau 2.3). En mode statique, la RMN du ^{31}P est dominée par les interactions d'ADC et de couplage dipolaire hétéronucléaire $D_{\text{P-H}}$, ce qui

donne lieu à des spectres larges et mal résolus. Ce couplage D_{P-H} , peut néanmoins être éliminé lors d'une expérience de RMN grâce à un découplage à haute puissance des protons. Finalement, les spectres ^{31}P statiques représentent uniquement le phénomène d'ADC des noyaux de phosphore des phospholipides⁶⁸⁻⁷⁰. L'ADC peut être décrite par un tenseur dont les principales composantes σ_{11} , σ_{22} et σ_{33} relatives à l'orientation moléculaire, définissent la forme du spectre de poudre, tel qu'illustré à la figure 2.18.

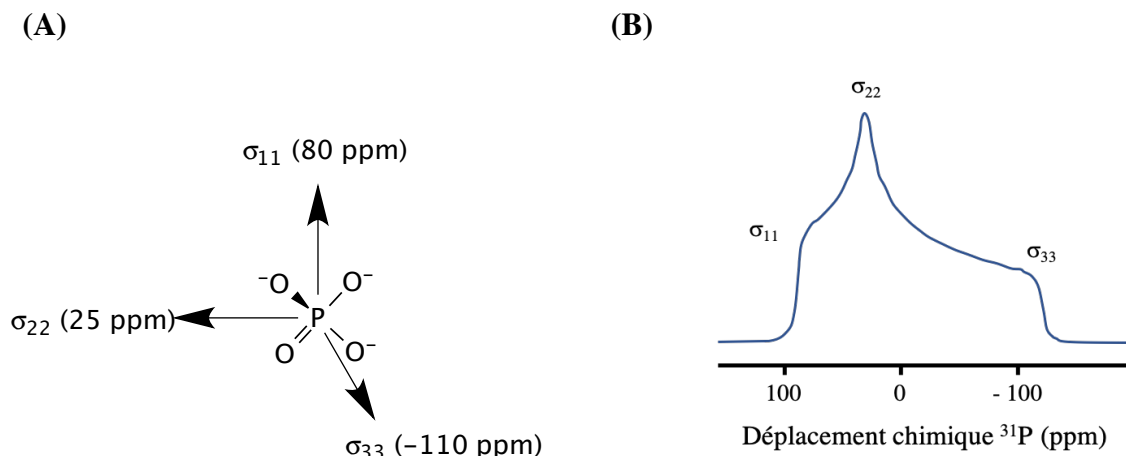


Figure 2.18. (A) Axes σ_{11} , σ_{22} et σ_{33} du tenseur d'ADC dans le système d'axes principaux (PAS) pour un atome de phosphore à la tête polaire des phospholipides. (B) Représentation spectrale des tenseurs d'ADC pour un phospholipide statique.

Les membranes modèles étudiées dans le cadre de cette thèse sont toutes en phase gel proche de la transition T_m , ou en phase fluide. Les phospholipides les composant sont donc en mouvement, avec notamment des mouvements de rotation axiale et d'oscillation. Ces mouvements ont lieu suivant un axe défini comme étant la normale à la bicouche lipidique. Les composantes du tenseur d'ADC deviennent donc σ_{\perp} et $\sigma_{//}$ dans un système de symétrie axiale, où :

$$\sigma_{\perp} = \frac{(\sigma_{22} + \sigma_{33})}{2} \quad (2.25)$$

$$\sigma_{//} = \sigma_{11} \quad (2.26)$$

et donc la valeur isotrope σ_{iso} du tenseur ADC prend la forme :

$$\sigma_{iso} = \frac{1}{3}(\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33}) = \frac{1}{3}(\sigma_{\parallel} + 2\sigma_{\perp}), \quad (2.27)$$

où σ_{\perp} et σ_{\parallel} sont les composantes perpendiculaire et parallèle du tenseur ADC dans une symétrie axiale. Les composantes σ_{\perp} et σ_{\parallel} constituent les valeurs observées pour des lipides orientés parallèlement et perpendiculairement à B_0 . Il est donc possible de définir l'ADC d'un système à symétrie axiale, $\Delta\sigma$ comme étant :

$$\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp} \quad (2.28)$$

À partir de cette équation, il est possible d'écrire la fréquence réduite $\Delta\nu$, qui décrit la dépendance orientationnelle du déplacement chimique par rapport à B_0 , ou ADC, comme étant :

$$\Delta\nu(\theta) = \frac{2}{3} \Delta\sigma \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right), \quad (2.29)$$

où θ représente l'angle entre le tenseur ADC et B_0 , et où $\Delta\nu$ s'exprime en ppm. Cette équation se traduit par le fait que chaque orientation d'un phospholipide par rapport à B_0 va produire un déplacement chimique unique.

Ainsi, les spectres obtenus pour des membranes modèles, qui sont des spectres de poudres, sont une représentation directe de toutes les orientations adoptées par les phospholipides constituant ces membranes, et corrélés aux populations relatives présentes pour chaque orientation. La figure 2.19 illustre cette distribution de population dans une membrane, et le spectre de poudre ^{31}P correspondant, pour une membrane où les phospholipides sont animés de mouvement de rotation et d'oscillation.

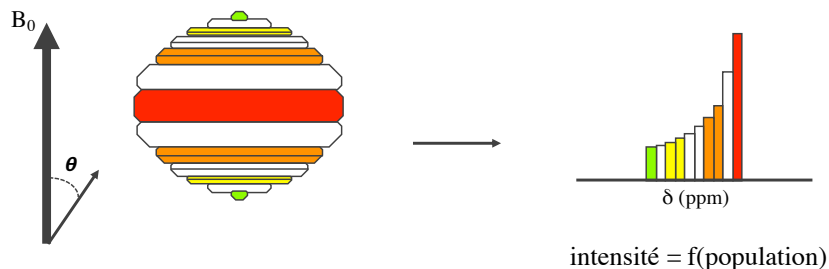


Figure 2.19. Illustration de la dépendance orientationnelle de population de phospholipides sur un spectre de poudre. Figure inspirée du cours de « Caractérisation des biomolécules » donnée par la Pre Michèle Auger (session Hiver 2016).

Comme illustré à la figure 2.19, la densité de population de phospholipides est plus grande à l'équateur de la membrane, d'où une plus grande contribution au spectre de poudre, comparativement aux phospholipides aux pôles (virtuellement un phospholipide par pôle), qui produisent une intensité moindre sur le spectre.

Les spectres RMN de ^{31}P sont une indication directe de l'état physique d'une membrane. En effet, plus les phospholipides sont animés, et plus l'ADC va être faible, tel qu'illustré à la figure 2.20. De plus, lorsque les lipides sont animés, le système tend vers l'isotrope, ce qui réduit également la largeur de raie.

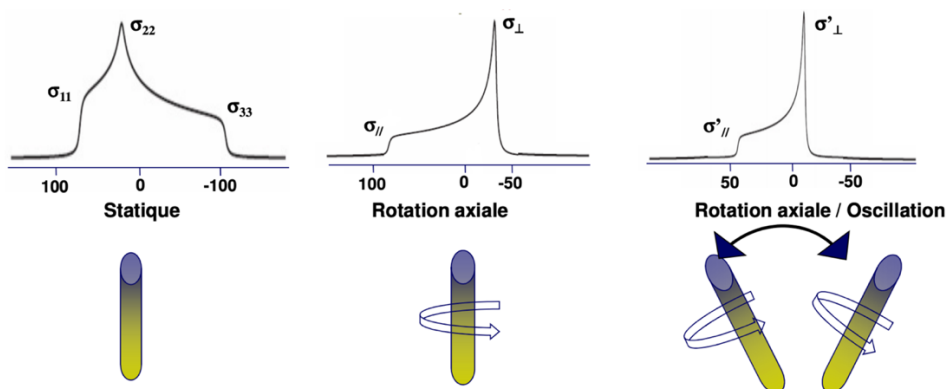


Figure 2.20. Spectres statiques ^{31}P en fonction des mouvements moléculaires des phospholipides. Figure reprise du cours de « Caractérisation des biomolécules » donnée par la Pre Michèle Auger (session Hiver 2016).

Un spectre de poudre de ^{31}P est caractérisé par trois éléments : son asymétrie, son ADC, et son déplacement chimique isotrope. La RMN du ^{31}P est donc une technique qui permet d'obtenir de l'information sur la dynamique moléculaire des membranes, mais également sur la morphologie de celles-ci.

Mesure de spectres RMN ^{31}P - Echo de Hahn⁷¹

La séquence d'impulsions utilisée pour enregistrer des spectres RMN ^{31}P statiques s'appelle écho de Hahn et est illustrée à la figure 2.21.

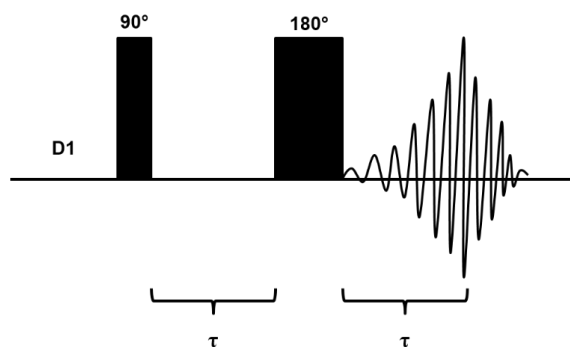


Figure 2.21. Séquence d'impulsions écho de Hahn.

Cette séquence consiste en une première impulsion de 90° , après un délai d'équilibration D_1 , qui bascule l'aimantation suivant y . Les spins subissent ensuite un phénomène de déphasage, mais également de relaxation. L'impulsion de 180° va ensuite servir à basculer les spins à l'inverse, de manière à ce qu'à $t = 2\tau$, les spins sont rephasés, c'est ce qu'on appelle l'écho de Hahn. Cette technique permet d'obtenir un signal maximal pour enregistrer des spectres.

Il est ainsi possible d'obtenir de l'information sur la dynamique et la morphologie des membranes, suivant l'allure des spectres et la grandeur de l'ADC. Par contre, elle n'est pas optimale pour effectuer des mesures sur des membranes composées de mélanges de phospholipides. Dans un tel cas, chaque type de phospholipide va contribuer au spectre de poudre observé, empêchant alors de distinguer les contributions individuelles de chaque phospholipide. Pour remédier à cela, une séquence d'impulsions a vu le jour récemment : la séquence PROCSA (*Phosphorus recoupling of the chemical shift anisotropy*)⁷².

Mesure de spectres RMN ^{31}P - PROCSA

La séquence PROCSA donne lieu à des spectres bidimensionnels, avec sur la dimension directe les déplacements chimiques isotropes de chaque type de phospholipide, et sur la dimension indirecte, les spectres de poudre. Elle permet donc d'obtenir une information beaucoup plus précise qu'un spectre ^{31}P statique pour l'étude de membranes composées de mélanges de phospholipides. Cette séquence utilise le principe de la rotation à l'angle magique (MAS). La rotation à l'angle magique permet d'éliminer toute composante anisotrope, donc l'ADC, et les interactions de couplages homonucléaires et hétéronucléaires. Une simple expérience conduite en MAS donne donc lieu à des spectres haute résolution avec des résonances aux déplacements chimiques isotropes. Le MAS consiste à faire tourner l'échantillon à haute vitesse à un angle $\theta_{\text{MAS}} = 54,7^\circ$. En procédant de la sorte, la dépendance orientationnelle $(3 \cos^2\theta - 1)$ devient nulle. Puisque l'information sur l'ADC de chaque phospholipide est perdue par le MAS, la séquence PROCSA sert à recoupler cet ADC. La séquence PROCSA est donnée à la figure 2.22.

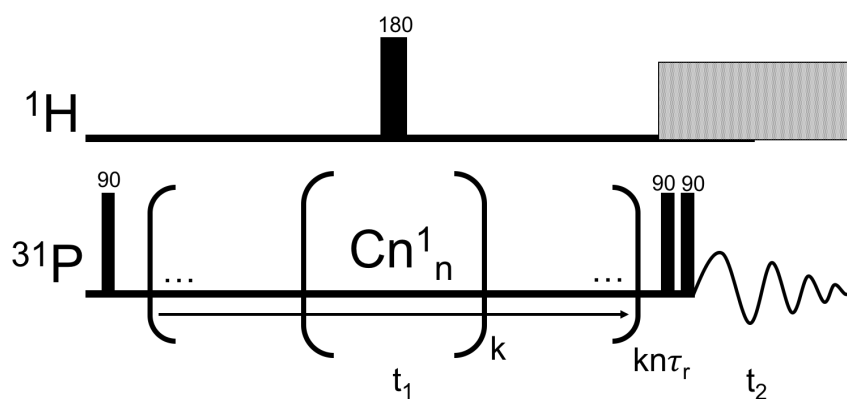


Figure 2.22. Séquence d'impulsions bidimensionnelle PROCSA (*Phosphorus recoupling of the chemical shift anisotropy*). Figure adaptée de Warschawski *et al.*⁷² avec permission, Copyright © 2018, Elsevier.

Cette séquence fait partie de la classe des séquences CN_n^{ν} ⁷³⁻⁷⁵, bien qu'ici elle utilise sa forme la plus simple, Cn_n^1 . En général, les séquences d'impulsion CN_n^{ν} comprennent N répétitions du sous-cycle C, le tout étalé sur un total de n périodes de rotor τ_R . Le terme C est ici une séquence radiofréquence de longueur $\tau_C = n\tau_R/N$ comprenant uniquement des impulsions de phase 0 ou π qui produit une rotation nette qui est un multiple entier de 2π . Un

décalage de phase global de $2\pi q\nu/N$ est appliqué à la $q^{\text{ème}}$ répétition de C, où q est un entier itéré entre 0 et $N - 1$. La figure 2.23 illustre les différentes impulsions de la séquence Cn_n^1 .

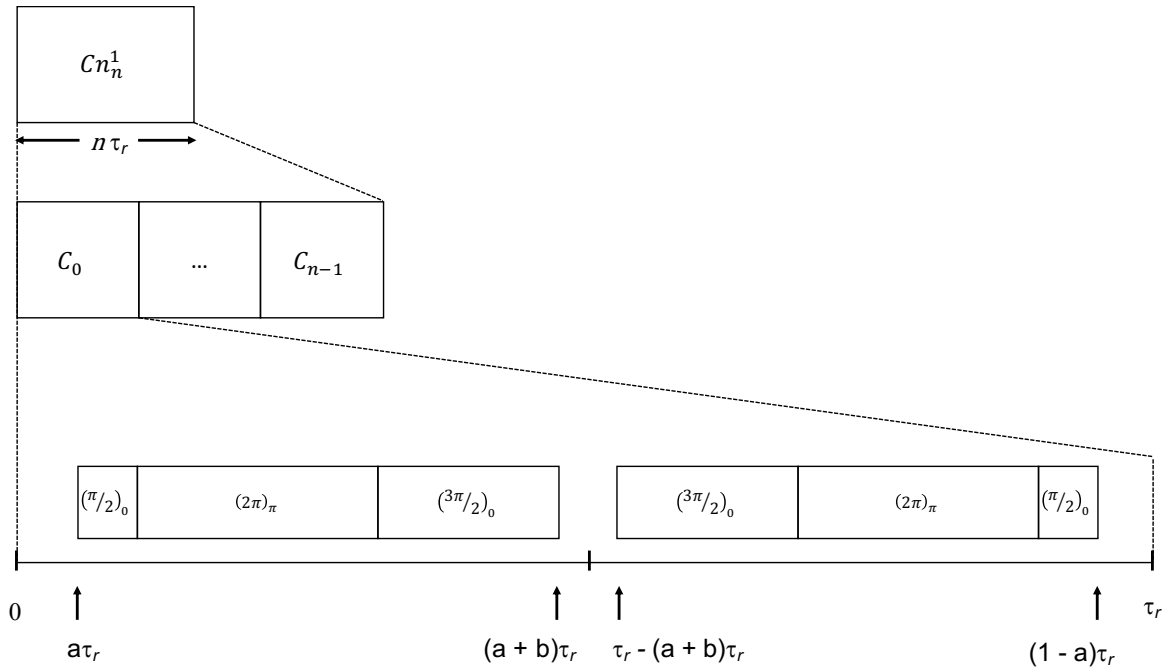


Figure 2.23. La période de recouplage t_1 comprend k cycles de Cn_n^1 (Figure 2.22). Chaque cycle complet de Cn_n^1 se fait sur n périodes de rotor ($n\tau_r$). La phase radiofréquence de chaque sous-cycle C_q est réglée comme égale à $2\pi q/n$, où q est un indice allant de 0 à $N - 1$. Dans chaque sous-cycle C_q , $a\tau_r$ et $b\tau_r$ indiquent la position et la durée de l'impulsion POST (séquence de phase « 0π » et d'impulsions 90_x 360_x 270_x) qui corrige l'inhomogénéité du champ radiofréquence. Les valeurs entre parenthèses indiquent la longueur de pulse, et les valeurs en sous-script indiquent la phase, en radians. Figure adaptée de Chan *et al.*⁷⁶ avec permission, Copyright © 2003, AIP Publishing.

Cette séquence a donc pour but de recoupler les spectres de poudre associés à chaque déplacement isotrope. L'article publié pour cette séquence a démontré son fonctionnement et son utilité lors d'expériences portées sur des membranes modèles imitant la composition de cellules bactériennes. Ces exemples sont illustrés à la figure 2.24 pour le spectre bidimensionnel, et à la figure 2.25 pour les tranches extraites du spectre de la figure 2.24.

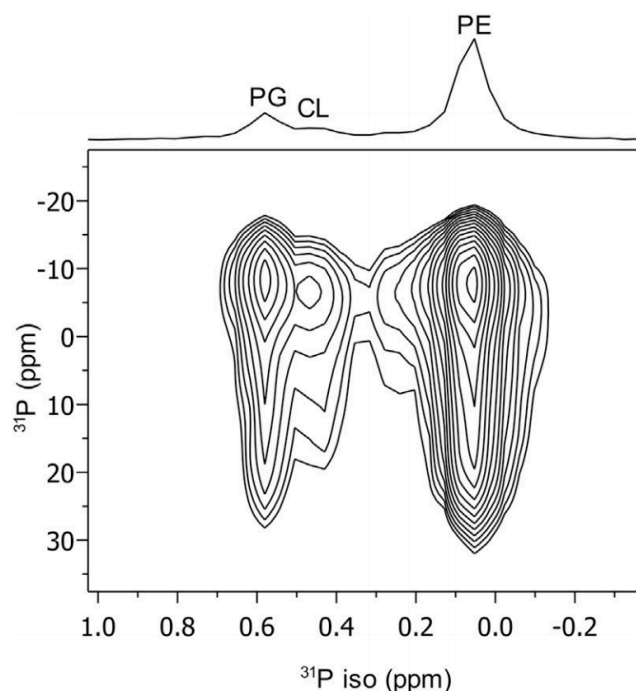


Figure 2.24. Spectre PROCSA 2D de membrane modèle répliquant la composition lipidique d'une cellule de *E. coli* avec une composition de palmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), palmitoylphosphatidylglycérol (POPG) et tétraoctadécenoylcardiolipine (TOCL) dans un rapport POPE:POPG:TOCL 77:20:3. Figure reprise de Warchawski *et al.*⁷² avec permission, Copyright © 2018, Elsevier.

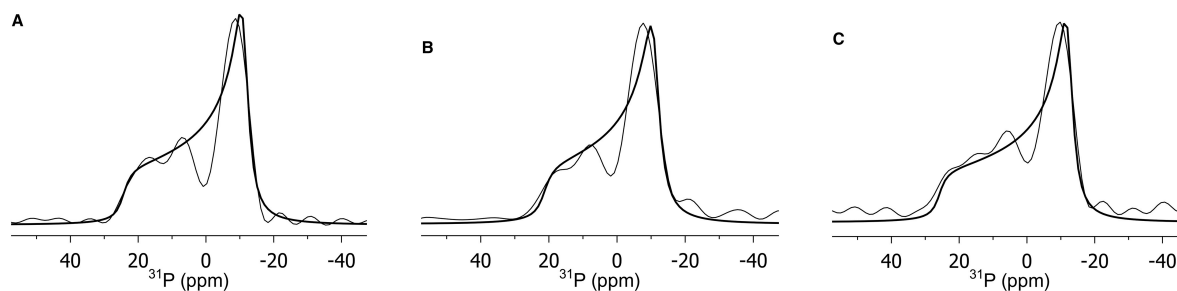


Figure 2.25. Tranches 1D extraites du spectre 2D de la figure 2.23. Spectre de poudre de (A) PE, (B) CL et (C) PG. Figure adaptée à partir de Warchawski *et al.*⁷² avec permission, Copyright © 2018, Elsevier.

2.3.4 Étude RMN de l'AS₇₁₋₈₂ – ¹³C

DQF-DRAWS

La séquence DQF-DRAWS (*Double quantum filtered-Dipolar recoupling in a windowless sequence*) est une séquence d'impulsions utilisant également la rotation à l'angle magique. Celle-ci sert à mesurer des distances internucléaires homonucléaires. Dans notre cas, nous l'avons utilisée pour mesurer des distances ¹³C=O – ¹³C=O. Le noyau ¹³C a un

rapport gyromagnétique faible (tableau 2.3), et une abondance naturelle de 1,07 %. Pour effectuer des mesures de distances entre ^{13}C , il faut donc effectuer un marquage isotopique au préalable. Cette séquence est basée sur la séquence DRAWS, plus simple, et dont il convient de faire une brève description avant de pouvoir décrire la séquence DQF-DRAWS. La séquence DRAWS est illustrée à la figure 2.26, et ne présente que le canal ^{13}C , le canal ^1H ne consistant qu'en un découplage constant et élevé après la polarisation croisée (CP, *cross-polarization*).

La séquence commence donc par une CP $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$. Cette étape sert à transférer la magnétisation des protons, qui est grande, vers les ^{13}C , pour augmenter leur polarisation, et donc l'intensité du signal. La CP est une technique qui se sert du couplage dipolaire ^1H - ^{13}C pour transférer cette polarisation, et cela suivant la condition de Hartmann-Hahn (HH)⁷⁷ :

$$\omega_1^H = \omega_1^C \quad (2.30)$$

qui s'écrit aussi :

$$\gamma_H B_1^H = \gamma_C B_1^C, \quad (2.31)$$

où ω_1^H et ω_1^C sont les fréquences des protons et des carbones, respectivement; γ_H et γ_C leurs rapports gyromagnétiques; B_1^H et B_1^C les champs magnétiques perpendiculaires à B_0 , appliqués sur les protons et les carbones. La CP requiert que les spins soient verrouillés, c'est-à-dire qu'ils soient positionnés suivant l'axe de l'impulsion, B_1 .

La suite de la séquence est basée sur la séquence DRAMA⁷⁸, qui réintroduit le couplage dipolaire par deux impulsions de 90° par période de rotor. Ces deux impulsions sont conservées dans la séquence DRAWS, mais elle comporte en plus un train d'impulsions de 360° en vue d'amoinrir les effets d'ADC et d'*offset*. De plus, un supercycle \overline{RRRR} d'une durée de quatre périodes de rotor a été implanté. Finalement une impulsion de 180° est appliquée une période de rotor après la fin du supercycle, afin de détecter un écho de Hahn après une nouvelle période de rotor.

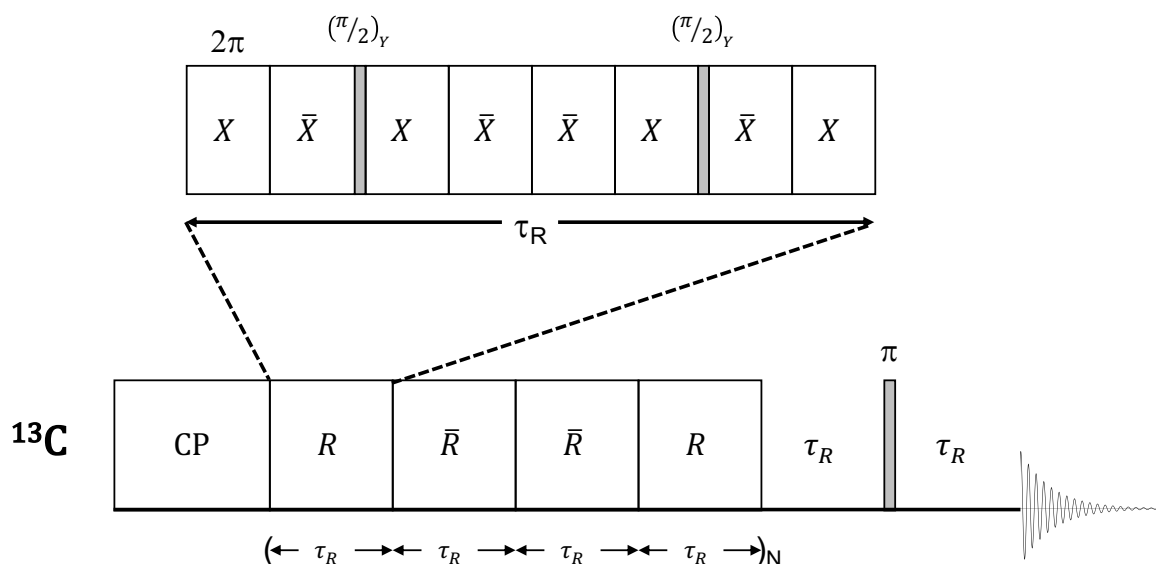


Figure 2.26. Séquence d'impulsions DRAWS sur le canal ^{13}C . Dans la partie supérieure, le train d'impulsions R pour une période de rotor. Dans la partie inférieure, le supercycle $R\bar{R}\bar{R}R$ est illustré, et correspond à quatre périodes de rotor représentées dans la partie supérieure, pour R, tandis que \bar{R} correspond à l'inverse de R. Figure adaptée de Gregory *et al.*⁷⁹ avec permission, Copyright © 1995, Elsevier.

Cette séquence permet donc de réintroduire le couplage dipolaire homonucléaire, et d'obtenir des distances internucléaires homonucléaires en faisant varier le temps de mélange, qui ici correspond à des multiples de N, et est fonction du nombre de supercycles $R\bar{R}\bar{R}R$, entre 0 et N - 1. Ainsi, la perte de magnétisation transverse (déphasage), ou le transfert de magnétisation d'un spin à un autre, mesurés en fonction du temps d'application de la séquence de recouplage (temps de mélange, *mixing time*) donne lieu à des courbes de déphasage (DRAWS), ou des courbes de croissance (DQF-DRAWS). Ces courbes permettent de remonter à des distances internucléaires, en comparant la courbe de décroissance expérimentale à des courbes simulées correspondant à des valeurs de couplage dipolaire, et par extrapolation, à des distances internucléaires.

Cependant, la séquence DRAWS présente des limites quant aux mesures de distances internucléaires, tel qu'illustré à la figure 2.27, où elle est comparée à des résultats obtenus via DQF-DRAWS.

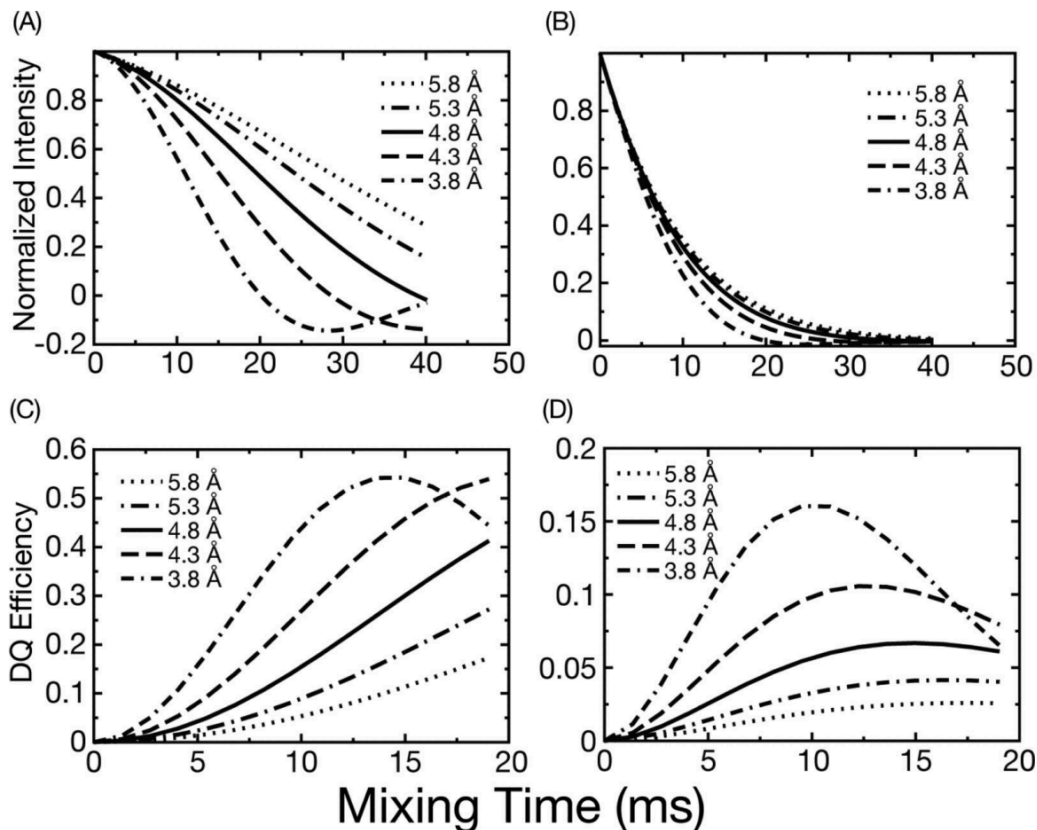


Figure 2.27. Comparaison de courbes de déphasage DRAWS sans et avec relaxation, respectivement (A) et (B), et de courbes DQF-DRAWS de croissance sans et avec relaxation, respectivement (C) et (D). Les simulations sont conduites sur un modèle de 4 spins représentatifs de feuillets- β parallèles. Figure reprise de Caporini *et al.*⁸⁰ avec permission, Copyright © 2010, American Chemical Society.

Comme il est possible de voir à la figure 2.27, la séquence DQF-DRAWS limite grandement l'influence des phénomènes de relaxation transverse, contrairement à la séquence DRAWS, qui, en présence d'importants phénomènes de relaxation transversale, ne permet pas de discerner sans ambiguïté une distance de 3,8 Å d'une distance de 5,8 Å. Or, dans le cas de systèmes amyloïdes, de telles incertitudes ne permettent pas de décrire précisément la structure, c'est pourquoi la séquence DQF-DRAWS est plus appropriée, et permet d'obtenir une résolution pouvant aller jusqu'à 0,02 Å. La séquence DQF-DRAWS est illustrée à la figure 2.28.

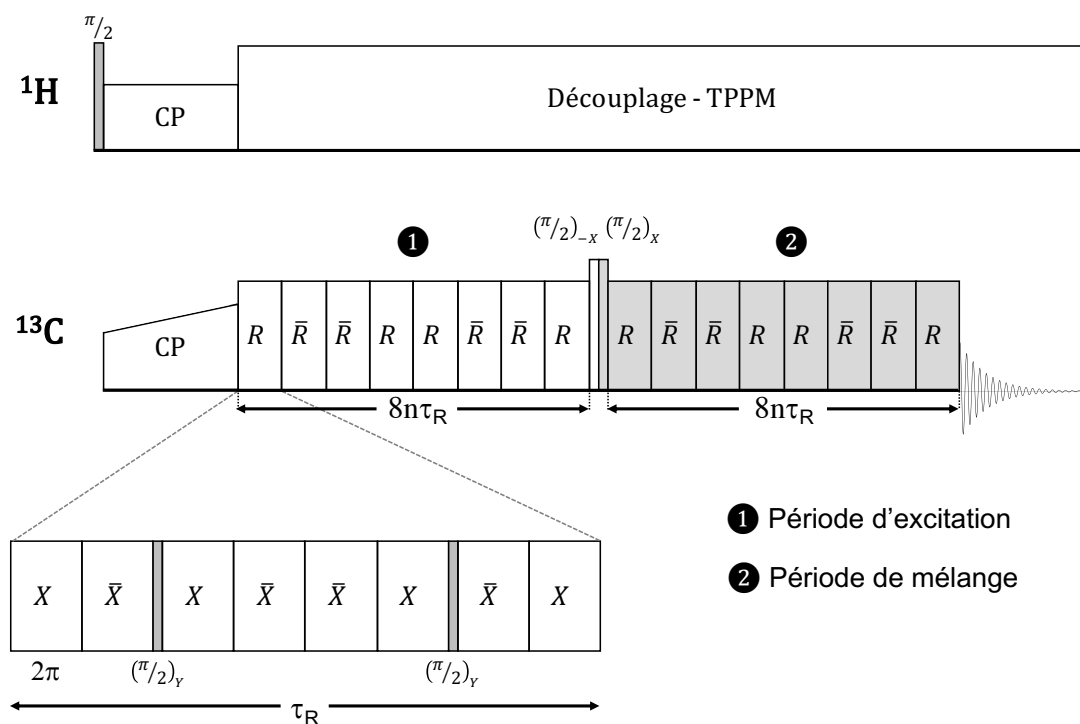


Figure 2.28. Séquence d'impulsions DQF-DRAWS. Figure modifiée à partir de Caporini *et al.*⁸⁰ avec permission, Copyright © 2010, American Chemical Society.

Cette séquence a pour but, comme son nom l'indique, de filtrer et conserver uniquement les interactions de double-quanta, et ne sonde donc pas tout ce qui provient de l'abondance naturelle, permettant ainsi de travailler en présence de phospholipides, sans besoin de procéder à des soustractions spectrales. Un exemple de ce filtrage d'interactions simple-quanta est donné à la figure 2.29, qui présente un spectre obtenu en CP-MAS (*cross-polarization magic-angle spinning*), et un spectre DQF-DRAWS du même échantillon (peptide de la protéine M2 dans des membranes POPC:DOPA (dioléoylglycérophosphate):Chol). Le spectre filtré présente donc uniquement la bande associée au signal ^{13}C de l'interaction double-quanta, ainsi que les bandes latérales de rotation.

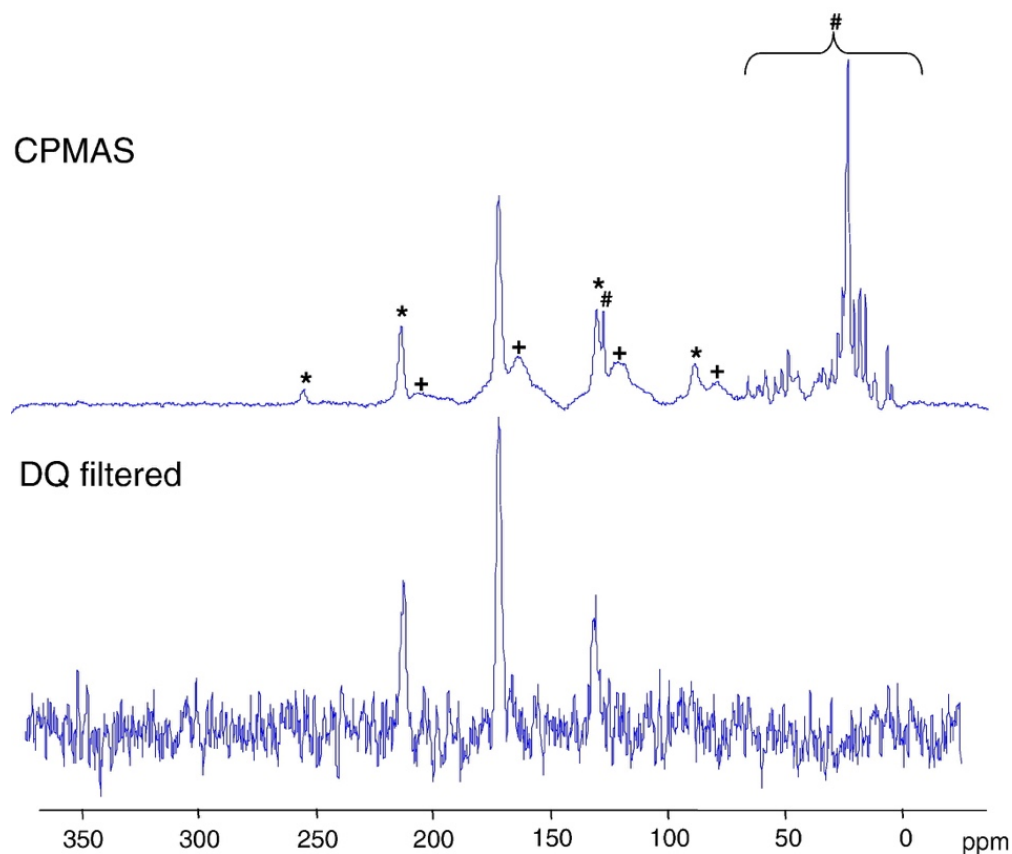


Figure 2.29. Comparaison de spectres ^{13}C d'un peptide de la protéine M2 dans des membranes POPC:DOPA:Chol à un rapport peptide:lipide 1:33 obtenu par CP-MAS (haut) et DQ-DRAWS (bas) ($\nu_{\text{MAS}} = 5000 \text{ Hz}$). Sur le spectre CP-MAS sont identifiés les bandes associées au rotor (+), aux lipides (#) et à la rotation à l'angle magique (*). Figure reprise de Long *et al.*⁸¹ avec permission, Copyright © 2007, Elsevier.

Bien que la séquence DQF-DRAWS présente de nombreux avantages comparativement à la séquence DRAWS, il demeure important de prendre en considération le temps de relaxation T_2^{DQ} étant donné son impact sur l'allure des courbes de croissance (figure 2.27). Ainsi, grâce au logiciel de simulation SIMPSON⁸², il est possible de comparer les points expérimentaux à des points simulés, en prenant en compte les deux paramètres de couplage dipolaire internucléaire (i.e. la distance) et le temps de relaxation T_2^{DQ} . Le logiciel permet de calculer des points simulés en prenant en compte ces deux variables en vue de faire converger la simulation. De plus, en se fiant aux paramètres trouvés dans la littérature, nous avons utilisé un système de boucle infinie (*infinite-loop*) à 3 spins pour simuler le feuillet- β parallèle des protofibrilles⁸³. Le fichier de simulation utilisé est donné en annexe, ainsi que le fichier d'optimisation des paramètres de couplage dipolaire et de temps de relaxation.

2.4 Synthèse peptidique

La synthèse du peptide AS₇₁₋₈₂ a été réalisée à l'aide de la méthode de synthèse peptidique sur support solide. Cette technique fut proposée pour la première fois en 1963⁸⁴. Alors qu'une synthèse en solution demande une isolation puis une purification du produit après chaque étape, la synthèse sur support solide, où le peptide est attaché à un support insoluble, nécessite uniquement une série de filtration puis de lavages pour retirer les produits secondaires après chaque étape. La synthèse peptidique est un processus très répétitif, avec des séries de déprotection, lavage, couplage, déprotection (...). L'utilisation d'un support insoluble dans une seule pièce de verrerie (une seringue en l'occurrence), permet par ailleurs une certaine automatisation de la synthèse.

De nombreuses résines (support insoluble) sont disponibles pour mener à bien une synthèse peptidique. Dans notre cas nous nous sommes servis de résine de Wang, et d'acides aminés protégés au N-terminal pour un groupement 9-fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc). Ce groupement permet une protection orthogonale des chaînes latérales en utilisant des groupements protecteurs labiles à pH acide. Un acide aminé est déprotégé de son groupement Fmoc en milieu basique en présence de pipéridine. Toute la synthèse a donc lieu en milieu basique, tandis que le clivage du peptide et la déprotection des chaînes latérales se fait en milieu acide, avec 95% d'acide trifluoroacétique (TFA). L'utilisation de cette résine et méthode de synthèse résulte en des peptides ayant une fonction acide au C-terminal.

Pour greffer un acide aminé sur la résine déjà fonctionnalisée par un premier acide aminé, il faut d'abord déprotéger l'acide aminé déjà greffé, à l'aide d'une solution de pipéridine à 20% dans le DMF. Le schéma réactionnel de la déprotection est décrit à la figure 2.30.

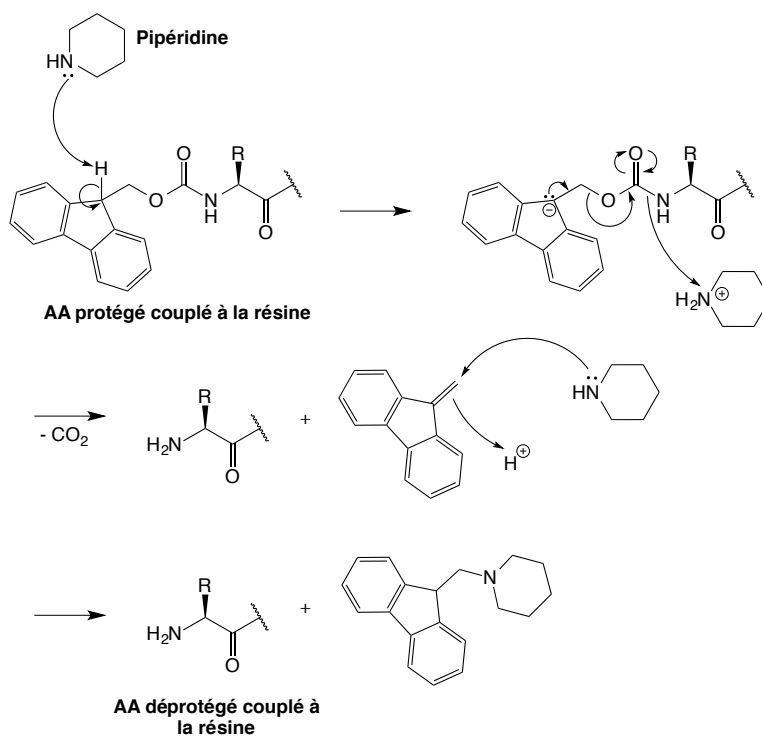


Figure 2.30. Mécanisme de déprotection du groupement Fmoc d'un acide aminé couplé à la résine de Wang.

Il faut ensuite activer l'acide aminé que l'on souhaite greffer à l'aide de HBTU (*hexafluorophosphate benzotriazole tetramethyl uronium*), suivant le mécanisme présenté à la figure 2.31.

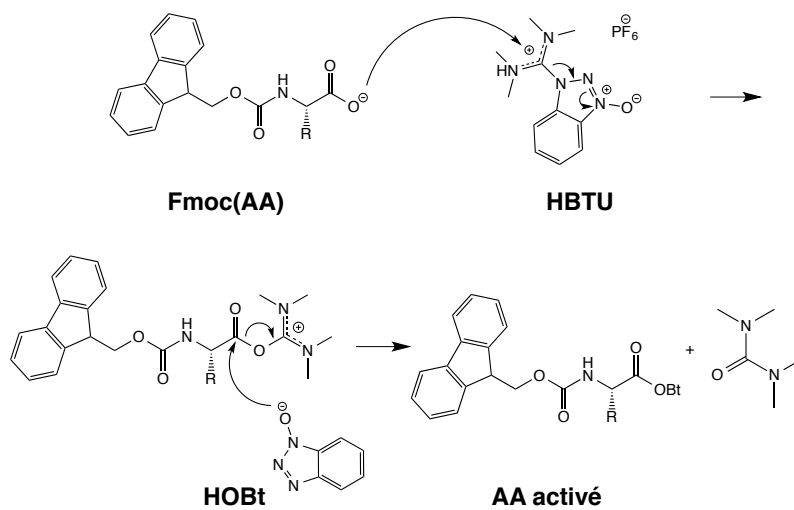


Figure 2.31. Mécanisme d'activation d'acide aminé.

Le couplage entre l'acide aminé greffé et l'acide aminé activé peut ensuite avoir lieu, suivant le mécanisme présenté à la figure 2.32.

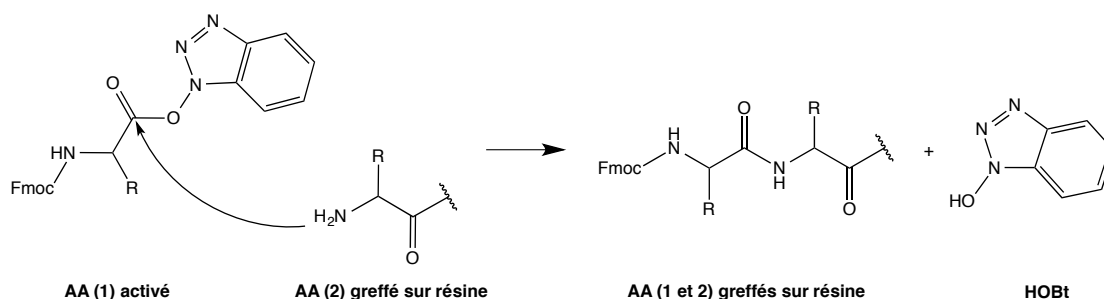


Figure 2.32. Mécanisme de couplage.

Finalement, une fois ce processus répété jusqu'à l'obtention du peptide complet toujours greffé, il faut venir cliver la résine de Wang en milieu acide (95% TFA, 2,5% DIC et 2,5% H₂O). Le mécanisme du clivage de la résine est donné à la figure 2.33.

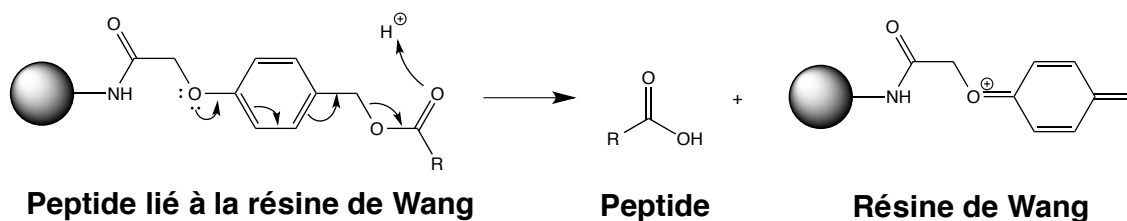


Figure 2.33. Mécanisme de clivage.

Finalement, le maximum de TFA possible est enlevé à l'évaporateur rotatif, puis le peptide est trituré dans l'éther glacial à trois reprises. Le TFA ayant un signal très intense dans la région de la bande amide I, les restes sont retirés par trois lyophilisations du peptide dans du HCl 10 mM pour venir substituer le TFA. Une fois ces étapes terminées, le peptide est analysé par spectrométrie de masse pour déterminer sa masse exacte et vérifier ainsi que la synthèse est réussie, puis la pureté est vérifiée par HPLC analytique (*high performance liquid chromatography*).

La synthèse de l'AS₇₁₋₈₂ marquée au ¹³C sur le carbonyle du résidu glycine-73 a nécessité la synthèse du résidu protégé par le groupement Fmoc, à partir de l'acide aminé

marqué. Cette synthèse de greffage de groupement Fmoc s'est faite suivant un protocole trouvé dans la littérature⁸⁵.

2.5 Microscopie électronique en transmission⁸⁶

La microscopie électronique est une technique permettant la visualisation de structures grâce à l'émission d'électrons. Elle permet d'observer des structures qu'un microscope normal ne permet pas, la résolution étant nettement plus élevée. La résolution est fonction de la longueur d'onde de radiation selon la formule :

$$d = \frac{0,61\lambda}{n \sin(\alpha)}, \quad (2.32)$$

où d est la résolution, λ la longueur d'onde, α l'ouverture du faisceau et n un coefficient dépendant du milieu de transmission de la radiation. Quand la résolution maximale d'un microscope optique est de $0,2 \mu\text{m}$, celle d'un microscope électronique en transmission (TEM, *transmission electron microscopy*) peut atteindre une résolution sub-angström ($< 0,5 \text{ \AA}$) dans les meilleurs cas⁸⁷.

Le principe de la TEM repose sur des électrons traversant un échantillon très mince, et dont les interactions avec la matière vont donner lieu à une image. En microscopie électronique, la résolution n'est pas limitée par les électrons en eux-mêmes, mais par les aberrations géométriques (sphériques et astigmatiques), chromatiques et de charges d'espace. Sans ces aberrations, la résolution de la microscopie électronique pourrait théoriquement atteindre le picomètre (10^{-12} m).

Le principe de la TEM consiste à placer un échantillon mince dans une chambre à vide, sous un faisceau d'électrons focalisés sur l'échantillon. L'image est ensuite projetée sur un écran fluorescent à l'aide de lentilles magnétiques qui dirigent le faisceau d'électrons, tel qu'illustré à la figure 2.34, schéma d'un TEM. L'image recueillie sur l'écran fluorescent est ensuite traitée pour donner lieu à une image optique.

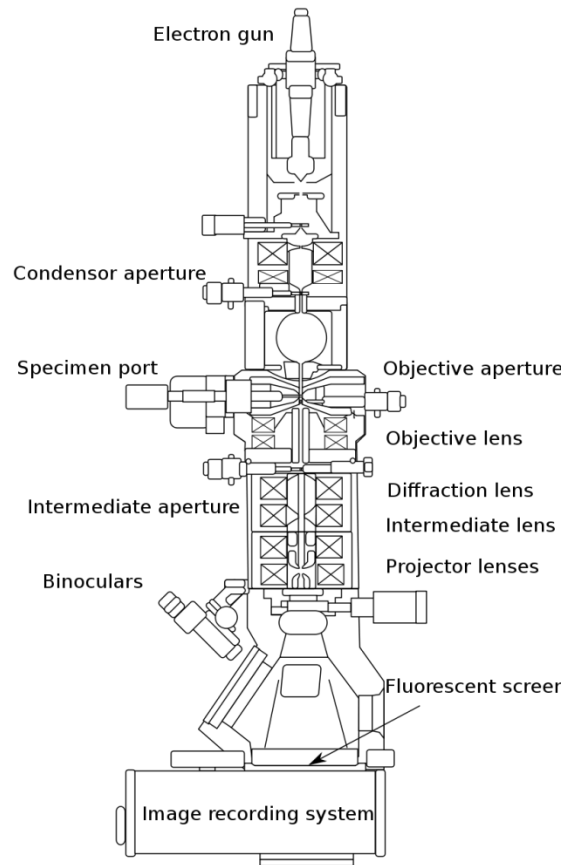


Figure 2.34. Schéma en coupe d'un microscope électronique en transmission présentant les différentes composantes de celui-ci. Image provenant de Wikipedia.

Différentes interactions entre les électrons et la matière ont lieu et donnent naissance à différents phénomènes : électrons rétrodiffusés, électrons Auger, électrons secondaires et rayons X principalement. En TEM, nous nous intéressons au faisceau transmis, qui a traversé l'échantillon, et dans certains cas à la diffusion inélastique à petits angles pour obtenir de l'information sur la matière. Le voltage du faisceau d'électrons peut être réglé. Plus il est haut, plus le faisceau sera fin et cohérent (meilleure résolution), plus pénétrant, mais par la même occasion, plus destructeur. Ainsi, pour des échantillons biologiques, la tension est réglée entre 60 et 120 kV (80 kV dans notre cas). Puisque la colonne du microscope est placée sous vide, de sorte qu'il n'y ait pas de collision entre les électrons et des molécules gazeuses, il est impossible d'étudier des échantillons hydratés. Les échantillons étudiés sont donc séchés avant de pouvoir être analysés.

2.6 Références

1. Madine, J.; Doig, A. J.; Kitmitto, A.; Middleton, D. A., Studies of the aggregation of an amyloidogenic α -synuclein peptide fragment. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 1113-1115.
2. Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., Design of an N-methylated peptide inhibitor of α -synuclein aggregation guided by solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7873-7881.
3. Park, S.-B.; Yoon, J.-S.; Jang, S.-M.; Lee, K.-H.; Shin, S.-M., Computational study on oligomer formation of fibril-forming peptide of α -synuclein. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, *33*, 848-854.
4. Giasson, B. I.; Murray, I. V. J.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y., A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α -synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2380-2386.
5. Madine, J.; Hughes, E.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., The effects of α -synuclein on phospholipid vesicle integrity: a study using ^{31}P NMR and electron microscopy. *Mol. Membr. Biol.* **2008**, *25*, 518-527.
6. Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., The aggregation and membrane-binding properties of an α -synuclein peptide fragment. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 1127-1129.
7. McHale, J. L., *Molecular spectroscopy*. CRC Press: 2017; p 457.
8. Mantsch, H. H.; McElhaney, R. N., Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 213-226.
9. Stair, R.; Coblenz, W., Infrared absorption spectra of plant and animal tissue and of various other substances. *J. Res. Nat. Bur. Stand.* **1935**, *15*, 295-316.
10. Klotz, I. M.; Griswold, P.; Gruen, D. M., Infrared spectra of some proteins and related substances. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 1615-1620.
11. Buswell, A.; Krebs, K. F.; Rodebush, W. H., The infrared absorption of proteins in the 3μ region. XII. *J. Phys. Chem.* **1940**, *44*, 1126-1137.
12. Bath, J. D.; Ellis, J. W., Some features and implications of the near infrared absorption spectra of various proteins: Gelatin, silk fibroin, and zinc insulinate. *J. Phys. Chem.* **1941**, *45*, 204-209.
13. Barth, A., Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073-1101.
14. Gerwert, K., Molecular reaction mechanisms of proteins as monitored by time-resolved FTIR spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 769-773.
15. Lórenz-Fonfría, V. A.; Heberle, J., Proton transfer and protein conformation dynamics in photosensitive proteins by time-resolved step-scan Fourier-transform infrared spectroscopy. *J. Vis. Exp.* **2014**, e51622-e51622.
16. Maeda, A., Application of FTIR spectroscopy to the structural study on the function of bacteriorhodopsin. *Isr. J. Chem.* **1995**, *35*, 387-400.
17. Breton, J., Fourier transform infrared spectroscopy of primary electron donors in type I photosynthetic reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1507*, 180-193.
18. Barth, A.; Kreutz, W.; Mäntele, W., Ca^{2+} release from the phosphorylated and the unphosphorylated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase results in parallel structural changes: An infrared spectroscopic study. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25507-25510.
19. von Germar, F.; Barth, A.; Mäntele, W., Structural changes of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase upon nucleotide binding studied by fourier transform infrared spectroscopy. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1531-1540.
20. Barth, A.; Mäntele, W., ATP-Induced phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase: Molecular interpretation of infrared difference spectra. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 538-544.

21. Barth, A., Phosphoenzyme conversion of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: Molecular interpretation of infrared difference spectra. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22170-22175.
22. Kong, J.; Yu, S., Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 549-559.
23. Brielle, E. S.; Arkin, I. T., Site-specific hydrogen exchange in a membrane environment analyzed by infrared spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 4059-4065.
24. Ma, J.; Pazos, I. M.; Zhang, W.; Culik, R. M.; Gai, F., Site-specific infrared probes of proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2015**, *66*, 357-377.
25. Mendelsohn, R.; Mantsch, H. H. In *Progress in protein-lipid interactions*; Watts, A.; De Pont, J. J. H. H. M., Eds.; Elsevier: 1986; Vol. 2, pp 103-146.
26. Lewis, R. N.; McElhaney, R. N.; Pohle, W.; Mantsch, H. H., Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 2367-2375.
27. Blume, A.; Huebner, W.; Messner, G., Fourier transform infrared spectroscopy of ¹³C=O labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8239-8249.
28. Milosevic, M., Internal reflection and ATR spectroscopy. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2004**, *39*, 365-384.
29. Mantsch, H. H.; Casal, H. L., Biological applications of infrared spectrometry. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1986**, *324*, 655-661.
30. Nafie, L. A.; Cheng, J. C.; Stephens, P. J., Vibrational circular dichroism of 2,2,2-trifluoro-1-phenylethanol. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3842-3843.
31. Hsu, E. C.; Holzwarth, G., Vibrational circular dichroism observed in crystalline α -NiSO₄ · 6H₂O and α -ZnSeO₄ · 6H₂O between 1900 and 5000 cm⁻¹. *J. Chem. Phys.* **1973**, *59*, 4678-4685.
32. Buffeteau, T.; Lagugné-Labarthe, F.; Sourisseau, C., Vibrational circular dichroism in general anisotropic thin solid films: Measurement and theoretical approach. *Appl. Spectrosc.* **2005**, *59*, 732-745.
33. Nafie, L. A., Vibrational optical activity. *Appl. Spectrosc.* **1996**, *50*, 14A-26A.
34. Drake, A. F., Polarisation modulation-the measurement of linear and circular dichroism. *J. Phys. E Sci. Instrum.* **1986**, *19*, 170-181.
35. Polavarapu, P. L. In *Fourier Transform Infrared Spectra*; Ferraro, J. R.; Basile, L. J., Eds.; Academic Press: San Diego, 1985; pp 61-96.
36. Holzwarth, G.; Hsu, E. C.; Mosher, H. S.; Faulkner, T. R.; Moscovitz, A., Infrared circular dichroism of carbon-hydrogen and carbon-deuterium stretching modes. Observations. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 251-252.
37. Polyanichko, A. M.; Andrushchenko, V. V.; Chikhirzhina, E. V.; Vorob'ev, V. I.; Wieser, H., The effect of manganese(II) on DNA structure: electronic and vibrational circular dichroism studies. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 989-996.
38. Zhong, W.; Gulotta, M.; Goss, D. J.; Diem, M., DNA solution conformation via infrared circular dichroism: experimental and theoretical results for B-family polymers. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7485-7491.
39. Wang, L.; Keiderling, T. A., Vibrational circular dichroism studies of the A-to-B conformational transition in DNA. *Biochemistry* **1992**, *31*, 10265-10271.
40. Kypr, J.; Kejnovská, I.; Renčíuk, D.; Vorlíčková, M., Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1713-1725.
41. Nový, J.; Urbanová, M., Vibrational and electronic circular dichroism study of the interactions of cationic porphyrins with (dG-dC)₁₀ and (dA-dT)₁₀. *Biopolymers* **2007**, *85*, 349-358.

42. Tsankov, D.; Krasteva, M.; Andrushchenko, V.; van de Sande, J. H.; Wieser, H., Vibrational circular dichroism signature of hemiprotonated intercalated four-stranded i-DNA. *Biophys. Chem.* **2006**, *119*, 1-6.
43. Birke, S. S.; Moses, M.; Kagalovsky, B.; Jano, D.; Gulotta, M.; Diem, M., Infrared CD of deoxy oligonucleotides. Conformational studies of 5'd(GCGC)3', 5'd(CGCG)3', 5'd(CCGG)3', and 5'd(GGCC)3' in low and high salt aqueous solution. *Biophys. J.* **1993**, *65*, 1262-1271.
44. Bochicchio, B.; Tamburro Antonio, M., Polyproline II structure in proteins: Identification by chiroptical spectroscopies, stability, and functions. *Chirality* **2002**, *14*, 782-792.
45. Dukor, R. K.; Keiderling, T. A., Reassessment of the random coil conformation: vibrational CD study of proline oligopeptides and related polypeptides. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1747-1761.
46. Keiderling, T. A., Protein and peptide secondary structure and conformational determination with vibrational circular dichroism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 682-688.
47. Kurouski, D., Advances of vibrational circular dichroism (VCD) in bioanalytical chemistry. A review. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *990*, 54-66.
48. Paterlini, M. G.; Freedman, T. B.; Nafie, L. A., Vibrational circular dichroism spectra of three conformationally distinct states and an unordered state of poly(L-lysine) in deuterated aqueous solution. *Biopolymers* **1986**, *25*, 1751-1765.
49. McBride, W. G., Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* **1961**, *2*, 90927-90928.
50. He, Y.; Wang, B.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A., Determination of Absolute Configuration of Chiral Molecules Using Vibrational Optical Activity: A Review. *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65*, 699-723.
51. Secondary structure of proteins and peptides. <https://www.bruker.com/applications/pharma-biopharma/quality-assurance/vibrational-circular-dichroism/secondary-structure-of-proteins-and-peptides.html> (accessed 10/10/2019).
52. Ma, S.; Cao, X.; Mak, M.; Sadik, A.; Walkner, C.; Freedman, T. B.; Lednev, I. K.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A., Vibrational circular dichroism shows unusual sensitivity to protein fibril formation and development in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12364-12365.
53. Bloch, F., Nuclear induction. *Phys. Rev.* **1946**, *70*, 460-474.
54. Bloch, F.; Nordsieck, A., Note on the radiation field of the electron. *Phys. Rev.* **1937**, *52*, 54-59.
55. Bloembergen, N.; Purcell, E. M.; Pound, R. V., Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. *Phys. Rev.* **1948**, *73*, 679-712.
56. Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V., Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 37-38.
57. Hester, R. K.; Ackerman, J. L.; Cross, V. R.; Waugh, J. S., Resolved dipolar coupling spectra of dilute nuclear spins in solids. *Phys. Rev. Lett.* **1975**, *34*, 993-995.
58. Hester, R. K.; Ackerman, J. L.; Neff, B. L.; Waugh, J. S., Separated local field spectra in NMR: Determination of structure of solids. *Phys. Rev. Lett.* **1976**, *36*, 1081-1083.
59. Rybaczewski, E. F.; Neff, B. L.; Waugh, J. S.; Sherfinski, J. S., High resolution ¹³C NMR in solids: ¹³C local fields of CH, CH₂, and CH₃. *J. Chem. Phys.* **1977**, *67*, 1231-1236.
60. Waugh, J. S., Uncoupling of local field spectra in nuclear magnetic resonance: determination of atomic positions in solids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1976**, *73*, 1394-1397.
61. Waugh, J. S.; Huber, L. M.; Haeberlen, U., Approach to high-resolution NMR in solids. *Phys. Rev. Lett.* **1968**, *20*, 180-182.
62. Atta-Ur-Rahman, T., *Nuclear magnetic resonance: basic principles*. Springer Science & Business Media: 2012.
63. Teng, Q., *Structural biology: practical NMR applications*. Springer Science & Business Media: 2012.

64. Levitt, M. H., *Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance*. John Wiley & Sons: 2001.
65. Cavanagh, J.; Fairbrother, W. J.; Palmer III, A. G.; Skelton, N. J., *Protein NMR spectroscopy: principles and practice*. Elsevier: 1995.
66. Jelinski, L. W.; Melchior, M. T., High-resolution NMR of solids. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2004**, *35*, 25-93.
67. Gagnon, M.-C.; Auger, M.; Paquin, J.-F., Progress in the synthesis of fluorinated phosphatidylcholines for biological applications. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 4925-4941.
68. Berden, J. A.; Cullis, P. R.; Hoult, D. I.; McLaughlin, A. C.; Radda, G. K.; Richards, R. E., Frequency dependence of ³¹P NMR linewidths in sonicated phospholipid vesicles: Effects of chemical shift anisotropy. *FEBS Lett.* **1974**, *46*, 55-58.
69. McLaughlin, A. C.; Cullis, P. R.; Berden, J. A.; Richards, R. E., ³¹P NMR of phospholipid membranes: Effects of chemical and anisotropy at high magnetic field strengths. *J. Magn. Reson.* **1975**, *20*, 146-165.
70. McLaughlin, A. C.; Cullis, P. R.; Hemminga, M. A.; Hoult, D. I.; Radda, G. K.; Ritchie, G. A.; Seeley, P. J.; Richards, R. E., Application of ³¹P NMR to model and biological membrane systems. *FEBS Lett.* **1975**, *57*, 213-218.
71. Hahn, E. L., Spin echoes. *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 580-594.
72. Warschawski, D. E.; Arnold, A. A.; Marcotte, I., A new method of assessing lipid mixtures by ³¹P magic-angle spinning NMR. *Biophys. J.* **2018**, *114*, 1368-1376.
73. Lee, Y. K.; Kurur, N. D.; Helmle, M.; Johannessen, O. G.; Nielsen, N. C.; Levitt, M. H., Efficient dipolar recoupling in the NMR of rotating solids. A sevenfold symmetric radiofrequency pulse sequence. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *242*, 304-309.
74. Edén, M.; Levitt, M. H., Pulse sequence symmetries in the nuclear magnetic resonance of spinning solids: Application to heteronuclear decoupling. *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 1511-1519.
75. Brinkmann, A.; Edén, M.; Levitt, M. H., Synchronous helical pulse sequences in magic-angle spinning nuclear magnetic resonance: Double quantum recoupling of multiple-spin systems. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 8539-8554.
76. Chan, J. C. C.; Tycko, R., Recoupling of chemical shift anisotropies in solid-state NMR under high-speed magic-angle spinning and in uniformly ¹³C-labeled systems. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 8378-8389.
77. Hartmann, S. R.; Hahn, E. L., Nuclear double resonance in the rotating frame. *Phys. Rev.* **1962**, *128*, 2042-2053.
78. Tycko, R.; Dabbagh, G., Measurement of nuclear magnetic dipole—dipole couplings in magic angle spinning NMR. *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *173*, 461-465.
79. Gregory, D. M.; Mitchell, D. J.; Stringer, J. A.; Kiihne, S.; Shiels, J. C.; Callahan, J.; Mehta, M. A.; Drobny, G. P., Windowless dipolar recoupling: the detection of weak dipolar couplings between spin 1/2 nuclei with large chemical shift anisotropies. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *246*, 654-663.
80. Caporini, M. A.; Bajaj, V. S.; Veshtort, M.; Fitzpatrick, A.; MacPhee, C. E.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G., Accurate determination of interstrand distances and alignment in amyloid fibrils by magic angle spinning NMR. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 13555-13561.
81. Long, J. R.; Mills, F. D.; Raucci, F., A high resolution structure of the putative hinge region in M2 channel-lining segments of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2007**, *1768*, 2961-2970.
82. Bak, M.; Rasmussen, J. T.; Nielsen, N. C., SIMPSON: A general simulation program for solid-state NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 296-330.

83. Benzinger, T. L. S.; Gregory, D. M.; Burkoth, T. S.; Miller-Auer, H.; Lynn, D. G.; Botto, R. E.; Meredith, S. C., Propagating structure of Alzheimer's β -amyloid(10–35) is parallel β -sheet with residues in exact register. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 13407-13412.
84. Merrifield, R. B., Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
85. Ten Kortenaar, P. B. W.; Van Dijk, B. G.; Peeters, J. M.; Raaben, B. J.; Adams, P. J. H. M.; Tesser, G. I., Rapid and efficient method for the preparation of Fmoc-amino acids starting from 9-fluorenylmethanol. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27*, 398-400.
86. Buseck, P.; Cowley, J.; Eyring, L., *High-resolution transmission electron microscopy: and associated techniques*. Oxford University Press: 1989; p 670.
87. Jiang, Y.; Chen, Z.; Han, Y.; Deb, P.; Gao, H.; Xie, S.; Purohit, P.; Tate, M. W.; Park, J.; Gruner, S. M., et al., Electron ptychography of 2D materials to deep sub-ångström resolution. *Nature* **2018**, *559*, 343-349.

Chapitre 3 : Understanding amyloid fibril formation using protein fragments: structural investigations via vibrational spectroscopy and solid-state NMR

(2018) *Biophysical Reviews*, **10**, 1133-1149

Retranscrit avec permission, Copyright © 2018, Springer Nature

Benjamin Martial, Thierry Lefèvre and Michèle Auger

Department of Chemistry, Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), Centre québécois sur les matériaux fonctionnels (CQMF), Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada

3.1 Résumé

Les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et la maladie de Creutzfeldt-Jakob font partie d'une large famille de pathologies toutes reliées à une agrégation de protéines amyloïdes. Bien qu'extrêmement étudiée, beaucoup d'aspects de cette fibrillation restent incompris, ce qui a pour conséquence de freiner les avancées vers le traitement de ces amyloïdoses. Beaucoup de groupes de recherche ont alors choisi de porter leurs études sur de courtes séquences importantes lors de la fibrillation et pouvant fournir des éléments relatifs à des segments critiques des protéines, nécessitant alors des outils biophysiques de pointe. Nous abordons ici des techniques spectroscopiques ayant prouvé leur capacité à fournir une meilleure compréhension atomique et moléculaire du processus de fibrillation amyloïdogénique. Cette revue a pour objectif de souligner les avantages de ces techniques lorsqu'il est question d'étudier des fragments de protéines amyloïdes. Des exemples probants et complémentaires de la littérature sont présentés pour chaque technique.

3.2 Abstract

It is well established that amyloid proteins play a primary role in neurodegenerative diseases. Alzheimer's, Parkinson's, type II diabetes, and Creutzfeldt-Jakob's diseases are part of a wider family encompassing more than 50 human pathologies related to aggregation of proteins. Although this field of research is thoroughly investigated, several aspects of

fibrillization remain misunderstood, which in turn slows down, or even impedes, advances in treating and curing amyloidoses. To solve this problem, several research groups have chosen to focus on short fragments of amyloid proteins, sequences that have been found to be of great importance for the amyloid formation process. Studying short peptides allows bypassing the complexity of working with full-length proteins and may provide important information relative to critical segments of amyloid proteins. To this end, efficient biophysical tools are required. In this review, we focus on two essential types of spectroscopic techniques, i.e., vibrational spectroscopy and its derivatives (conventional Raman scattering, deep-UV resonance Raman (DUVRR), Raman optical activity (ROA), surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS), infrared (IR) absorption spectroscopy, vibrational circular dichroism (VCD)) and solid-state nuclear magnetic resonance (ssNMR). These techniques revealed powerful to provide a better atomic and molecular comprehension of the amyloidogenic process and fibril structure. This review aims at underlining the information that these techniques can provide and at highlighting their strengths and weaknesses when studying amyloid fragments. Meaningful examples from the literature are provided for each technique, and their complementarity is stressed for the kinetic and structural characterization of amyloid fibril formation.

3.3 Introduction

Although amyloid diseases have been studied for a long time, a lot remains to be understood. A tremendous amount of work is done to try and eradicate these diseases from modern societies, where longer life expectancies directly correlate with more diseased persons¹. The first descriptions of Parkinson's (PD) and Alzheimer's (AD) diseases, the two most widespread amyloid pathologies, go back to 1817 and 1906, respectively²⁻³, and to date there is still no cure for these diseases. With more than 50 amyloid-related diseases affecting and killing millions of people around the world and with several unanswered questions⁴, finding ways of either preventing or curing them is amongst the most urgent challenges of the twenty-first century.

The common point between these diseases is an abnormal misfolding of a specific protein. A majority of the proteins involved in these diseases exist in a globular form in their non-pathological state, but today no consensus exists regarding how, nor why, these proteins

start to misfold, aggregate, and eventually form amyloid fibrils. This issue is particularly complex as the causes of aggregation may be multiple. For sporadic forms, the impairment of protein functions and subsequent cellular death can be explained by number of chemical, biological, and physiological reactions, such as the presence of reactive oxidative species, post-translational modifications, protein over-expression, membrane modifications, protein clearance impairment, and intra- and extra-cellular environment modifications.

Whereas amyloid diseases are most often sporadic, familial forms related to genetic factors and protein mutations also exist, notably in AD⁵ and PD⁶, while Huntington's disease (HD) is a hereditary-only disease⁷. Selkoe and Hardy recently reviewed the advancements over the last 25 years in the knowledge and comprehension of AD. Amongst the remaining questions are the following: which forms of A β are toxic and what is its spreading mechanism⁸. These questions extend to other amyloid proteins.

Several avenues of therapeutic development of amyloidoses are being explored, as the pathways of toxicity leading to cellular death are most certainly proper to each disease. Some think that accelerating fibril formation past early-stage toxic oligomers and stabilizing them could be a strategy to prevent the formation of more toxic species⁹ while others propose that destabilizing fibrils could solve the problem¹⁰. Another aspect of the research focuses on molecules able to maintain proteins in their globular or monomeric form, thus preventing the disease simply from appearing¹¹⁻¹². More generally, Eisele *et al.* reviewed novel therapeutic approaches which are at different stages of development for several amyloid diseases, and discussed the potential of these disease-modifying strategies for mitigating these amyloidoses¹³.

Amyloid fibrils have been assumed to be the putative species responsible of amyloid diseases but oligomers have been identified as an element of the fibrillization pathway that is also cytotoxic, and possibly more deleterious than fibrils¹³. Protein aggregation leads to the appearance of oligomers, protofibrils, and mature fibrils, a hallmark of amyloid diseases. A precise molecular characterization of each peptide and protein at various steps along the fibrillization process is needed to eventually consider a possible cure or to synthesize biomarkers for early-stage disease identification.

Study of amyloid peptides and proteins has revealed to be complicated by the fibrillary polymorphism that most of them exhibit. This issue, combined with the high molecular weight of most amyloid peptides and proteins, complicates spectroscopic investigations. A remedy consists in studying fragments of these amyloid peptides and proteins. Peptides with short amino acid sequences corresponding to amyloidogenic stretches of their parent protein can be used to bypass the complexity of working with the full-length proteins, and has proven to be useful for spectroscopic investigations and to better understand pathological fibrillization. Short peptides can be synthesized in large quantities and can selectively be isotopically labeled during synthesis. Moreover, certain amino acid regions of pathological proteins exhibit particular properties, propensities, and/or pathogenicities, so that the study of protein fragments represents a research avenue able to provide insightful information regarding amyloidoses. For example, the segment 71–82 of α -synuclein (AS) has revealed to be of great importance regarding its pathogenicity in PD¹⁴, which justified structural studies carried out on the peptide AS_{71–82}¹⁵. Another example is the identification of the fragment 106–126 of the prion protein (PrP) as a key stretch for fibrillization in Gerstmann-Sträussler-Scheinker's disease¹⁶.

Amongst the multitude of techniques suited for the study of amyloid peptides and proteins, two families of techniques are particularly adapted for a morphological, structural, and dynamical description of amyloid fibrils: vibrational spectroscopy (Raman spectroscopy, infrared spectroscopy (IR), vibrational circular dichroism (VCD)) and solid-state NMR (ssNMR). Combined, these techniques allow a detailed structural characterization, from atomic level to quaternary structure, through intermediary hierarchical steps. This review highlights the advantages of these techniques, as well as their inherent limitations, for the study of amyloid peptides and proteins. Their complementarity is also discussed. Examples of the contemporary literature using these particular techniques for the study of amyloid peptides and protein fragments are given. It should be mentioned that X-ray diffraction (XRD) and microelectron diffraction are also very relevant techniques for the study of amyloid crystals, providing crucial structural characterizations of amyloid fragments¹⁷⁻¹⁹. XRD has even been used early on to uncover structural details of fibers²⁰. These techniques are however not in the scope of the present article and excellent reviews exist on this subject^{4,21}.

3.4 Morphology and challenges to overcome

3.4.1 Morphology

Almost all peptides and proteins can form amyloid fibrils in appropriate conditions. Therefore, a great diversity of amino acid sequences share common amyloid structural features. The fibril diameter and length are around 10 nm and a few hundreds of nanometers, respectively. They assemble with a cross β -sheet core: β -strands run perpendicularly to the fibril long axis, with an interstrand distance of $\sim 4.7 \text{ \AA}$, a structure described for the first time in 1935²⁰. Amyloid fibrils are highly favorable energetically and extremely stable. β -strands are hydrogen-bonded and the protofilaments formed are held together mostly via sidechain-sidechain interactions, resulting in a highly dense and interdigitated packing. Depending on the amino acids, the nature of these interactions varies: they can be of hydrophobic, electrostatic, or even of aromatic (π -stacking) nature. Some residues containing an amide group, such as glutamine and asparagine, are able to stabilize the fibril via the formation of hydrogen bonds with the sidechain of the alike neighboring residue, a characteristic most often observed in in-register parallel configuration of the β -sheets⁴.

3.4.2 Polymorphism

Many amyloid peptides and proteins exhibit polymorphism, which complicates structural analyses and comprehension of amyloid formation. Nonetheless, attempts to formalize and classify fibrillar morphologies allow finding common features and redundant properties. For instance, the three-dimensional description of fibrils lead to classify cross β -sheet cores as steric zippers²¹.

Several parameters account for amyloid fibril polymorphism, including concentration, temperature, mechanical agitation, and pH. Studies have even proven the existence of polymorphs grown simultaneously in the exact same conditions²²⁻²³. This characteristic adds a level of complexity, since even the smallest molecular variations may have an impact all along the amyloid formation cascade, as illustrated in Fig. 3.1. Polymorphism has been, and still is, a source of problems, from both structural characterization and biological relevance points of view²⁴⁻²⁵. For example, amyloid- β_{1-40} ($A\beta_{1-40}$) and AS polymorphs, involved in AD and PD, respectively, displayed different

toxicity towards cell lineages^{23,26-27}. For structural characterization, a tight control of the incubation conditions is of primary importance in order to obtain a unique type of fibril polymorph, to facilitate analysis and result interpretation.

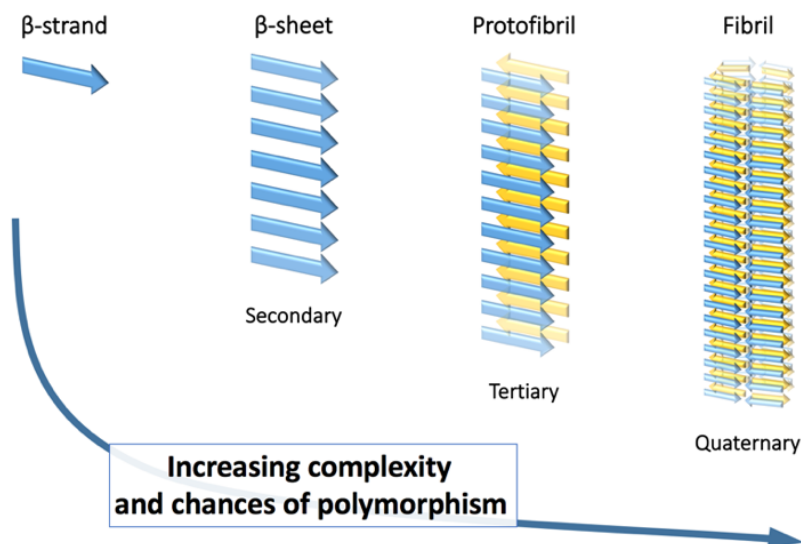


Figure 3.1. Typical hierarchical description of the amyloid formation steps, from the single β -strand to the mature fibril (from secondary to quaternary structure). Molecular variations occurring at any level affect all the subsequent formation steps and thus are sources of fibril polymorphism. Figure based on a similar figure reported by Fitzpatrick *et al.*²⁸

3.5 Vibrational techniques

Vibrational techniques can be divided into two fundamental families: those based on Raman scattering and those based on the absorption of mid-IR light. The former techniques include conventional Raman spectroscopy, deep-UV resonance Raman (DUVRR), surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS), and Raman optical activity (ROA). The latter techniques encompass conventional IR (transmission, attenuated total reflection (ATR) and reflection-absorption spectroscopy), VCD, and two-dimensional IR (2D-IR). These tools can provide dynamical and structural description of amyloid fibrillogenesis and fibrils. Whereas Raman spectroscopy is based on inelastic scattering resulting from changes in bond polarizability, IR spectroscopy relies on the absorption of light due to changes in molecular dipole moments. This difference makes these two types of techniques complementary since some vibrations may be only active or may be reasonably intense in one of the two techniques, and not in the other. This traditional

picture is however challenged due to the rise of more recent, derived techniques since each one may enhance specific vibrational modes and may have its own specific application, with its advantages and drawbacks.

3.5.1 Raman spectroscopy

Conventional Raman spectroscopy is not much used to investigate the secondary structure of amyloid proteins. Although the spectral contribution due to water is smaller than in IR spectroscopy, it still overlaps and obscures the amide I region so that solvation in D₂O may be necessary. Even in this case, higher concentrations are required to obtain reasonable signal-to-noise ratios, especially for amide bands. Then, a few works have been dealing with the backbone conformation of amyloid proteins. An interesting example is however provided by the study of AS in several media that proved the strength of conventional Raman for secondary structure determination of unfolded proteins²⁹. Nevertheless, conventional Raman cannot discriminate without ambiguity parallel from antiparallel β -sheets, a limitation that represents a pitfall for the investigation of amyloid peptides.

By contrast, vibrations due to amino acid sidechains are particularly apparent, so that Raman scattering can fruitfully be used to investigate specific and localized interactions. As an example, the effect of Cu(II) on the N-terminal part of the PrP was investigated using the octapeptide PHGGGWGQ. Upon pH modification from a neutral to a weakly acidic state, the Cu(II) binding site would be modified to form His-Cu-His bridges that in turn would be responsible for protein aggregation³⁰. Miura *et al.* also studied the A β ₁₋₁₆ fragment, corresponding to the N-terminal part of A β , to probe interactions with Fe(III), a known aggregation inducer. A preferential interaction of Fe(III) with Tyr10 was observed in both A β ₁₋₁₆ and A β ₁₋₄₀, and to a lesser extent with Asp/Glu residues³¹. Such studies are part of the global issue of the role played by metal ions in amyloid diseases³². In this context, being able to probe the role of specific residues when coordinating to metal ions via Raman spectroscopy is obviously an asset.

Raman spectroscopy has been derived in a variety of techniques, such as DUVRR, ROA, SERS, and TERS. DUVRR is based on a different physical principle than conventional Raman: rather than being in the visible domain, the laser has a wavelength in the UV domain

(typically ~ 200 nm), which causes resonant electronic transitions³³. DUVRR is then particularly efficient to probe amide chromophore vibration modes^{34,35}, and provides a signal enhancement between 10^6 and 10^8 when compared to conventional Raman spectroscopy³³. An excellent review recently compiled studies on full-length amyloid peptides and proteins using Raman techniques³⁶.

In contrast to conventional Raman, DUVRR can discriminate parallel from antiparallel β -sheets. As a matter of fact, the group of Asher developed a semi-empirical equation based on the amide III band frequency allowing the determination of the dihedral angle ψ of protein and peptide amide groups³⁷. Popova *et al.* applied this method to $A\beta_{1-40}$ and to the $A\beta_{34-42}$ fragment. As their secondary structure was known to be parallel and antiparallel, respectively, this study supported the reliability of Asher's group formula to determine secondary structure elements³⁸ and to distinguish parallel and antiparallel β -sheets by their torsion angle ψ . Moreover, the combination of DUVRR with hydrogen/deuterium (H/D) exchange made it possible to distinguish the structure of exchangeable (water-accessible or exposed) and non-exchangeable (solvent-inaccessible, then located in the amyloid core) amide groups.

Asher's group focused on polyglutamine (polyQ) fibrils formed by the peptide $D_2Q_{10}K_2$. This peptide can adopt different forms in solution: NDQ10, a β -hairpin-like structure and DQ10, a PPII-like (polyproline II) structure. By combining different deuteration schemes of both fibrils and fibril preparation, various Raman bands were distinguished and assigned. Notably, H/D exchange of fibrils prepared in H_2O allowed identification of the rigid cross- β core of the fibrils, while D/H exchange of fibrils prepared in D_2O removed the amide III band of any component associated with rigid structures, thus highlighting the flexible/unordered structure components. Using their method developed earlier³⁷ in conjunction with molecular dynamics, they showed that NDQ10 and DQ10 peptides preferentially adopt an antiparallel β -sheet structure that seemed thermodynamically more stable than the usual parallel arrangement commonly found in amyloid fibrils. Moreover, the authors determined the χ_3 dihedral angle of Gln sidechains using a similar method than for ψ . The results indicated that Gln sidechains would be planar and highly interdigitated, thus forming a stable steric zipper³⁹.

Raman optical activity (ROA) relies on the variation in the intensity of the scattered light between left- and right-circularly polarized incident light by optically active molecules⁴⁰. ROA has mainly been used to probe the prefibrillar states of amyloid proteins, more particularly disordered structures. This conformational state was often (inadequately) referred to random coil. As a matter of fact, ROA is sensitive to 3_1 -helix structure, also called PPII helix. This structure, which is considered as a regular secondary structure, actually appeared to be an essential component of “random coil” proteins. This structural element also appeared as an essential structure in amyloidogenesis. Blanch *et al.* witnessed a high content of PPII helix in amyloid prefibrillar intermediates of a fragment of the N-terminal part of the ovine prion protein, and discussed its amyloidogenic potential⁴¹. The in-solution structure of the amyloid fragment A β ₁₋₂₈ has also been described as adopting a PPII conformation via a combination of IR, and isotropic and anisotropic Raman spectroscopy⁴².

The aim of SERS is to enhance the Raman signal by placing molecules in the vicinity of metal nanoparticles or on a metal surface, which induce plasmonic resonance and strong signal enhancement when interacting with the incident light⁴³. This technique was applied to study the influence of Cu(II) on the A β ₁₋₁₆ fragment using a combination of SERS, electronic circular dichroism and scanning tunneling microscopy (STM). The data lead to conclude that Cu(II) stabilizes A β ₁₋₁₆, induces a change of conformation from PPII to β -sheet, and a stabilization of β -sheets through binding to the imidazole rings of His13 and His14 of adjacent β -strands⁴⁴. TERS is similar to SERS, but offers a typical ~ 10 – 15 nm spatial resolution thanks to the coupling with a scanning probe microscope (atomic force microscope (AFM) or STM). TERS has been used to study the fragments A β ₁₆₋₂₂ and CGNNQQNY of yeast prion protein Sup35⁴⁵⁻⁴⁶. In the latter study, analysis of the amide III bands demonstrates that fibrils formed at pH 2.0 were composed of parallel β -sheets, while fibrils formed at pH 5.6 displayed an antiparallel β -sheet structure, along with some random coil and α -helix. Moreover, TERS allowed identification of variations in the exposed secondary structures along the axis of the fibrils, with a lateral resolution of 7 nm. To date, SERS and TERS have only been sparsely used to investigate amyloid fibrils.

3.5.2 IR and VCD: Amide I band

The region of main interest of IR techniques is the amide I band (also named amide I' band when the backbone amide groups are deuterated) which extends from 1700 to 1600 cm^{-1} . This band enables the determination of peptide and protein global secondary structures, as more or less narrow frequency ranges correspond to specific secondary structures. The amide I band arises mostly from the stretching vibration of the peptide bond C=O, combined with the out-of-phase CN stretching vibration, the CCN deformation and the NH in-plane bend. Deuterium oxide is often used as solvent to avoid the overlap between the amide I band and the O–H bending vibration of water. Deuteration of the backbone NH results in a slight shift ($\sim 5\text{--}10 \text{ cm}^{-1}$) of the amide I band. In the case of amyloid peptides and proteins, the secondary structure of interest is most often, but not only, the β -sheet. IR is particularly sensitive to this structure and is efficient to follow the kinetics of aggregation. β -Sheets resulting from aggregation/amyloidogenesis are often associated with two narrow and well-separated spectral components, an intense one at low wavenumbers (1615–1635 cm^{-1}) and a small one at higher wavenumbers (1655–1695 cm^{-1}). This splitting of the amide I β -sheet band is due to transition dipole coupling (TDC): the resonance interaction of adjacent amide groups (oscillators) depends on the distance that separates them and on their relative orientation. These spectral components correspond to out-of-phase and in-phase vibrations of β -sheet-coupled oscillators⁴⁷. The arrangement of β -sheets in an antiparallel configuration leads to a large splitting of $\sim 60 \text{ cm}^{-1}$, and can reach up to 70 cm^{-1} . For a parallel conformation of the strands, a smaller splitting of 30–40 cm^{-1} is observed⁴⁸. The spectral difference in the two types of β -sheets is illustrated in Fig. 3.2. For a given arrangement (parallel or antiparallel), the β -sheet components exhibit a certain position variability. The reason lies in the fact that the amide I vibration depends on many parameters: in-register or out-of-register ordering, length, number and twist of β -strands⁴⁹. The number of possible configurations, coupled with the complexity of the three-dimensional arrangement of amyloid fibrils, adds to the overall structural diversity of amyloid fibrils.

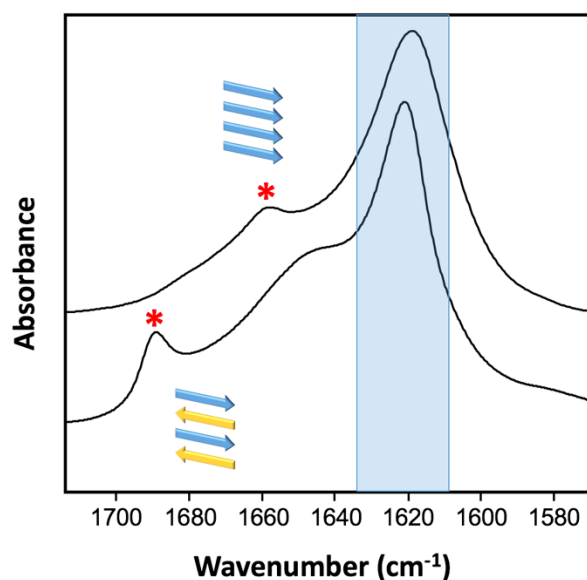


Figure 3.2. Typical IR spectra of parallel (upper spectrum) and antiparallel (lower spectrum) intermolecular β -sheets. The major component is at low wavenumbers (blue-shaded area) and the less intense one at higher wavenumbers (red asterisks). Figure based on a similar figure reported by Sarroukh *et al.*⁵⁰

3.5.3 Infrared spectroscopy-IR

Conventional IR spectroscopy was used concomitantly with the advances on different amyloid proteins and peptides. Works on amyloid proteins and fibrils using conventional IR then go back to the 70s⁵¹⁻⁵². They precede molecular analyses of amyloid deposits obtained *ex vivo*, showing that they are mostly composed of a single type of protein⁵³⁻⁵⁴. Then, the sequencing of amyloid proteins allowed the study of specific fragments, notably of A β and IAPP (islet amyloid polypeptide, then-called amylin) in the group of Lansbury in the early 90s. They assessed the structure of two fragments derived from the A β peptide (A β_{26-33} and A β_{34-42}) in aqueous and organic solvents and concluded that while both peptides form antiparallel β -sheets with a cross- β core in the solid-state, A β_{34-42} seemed to play a more important role in the amyloidogenic process⁵⁵.

In the same group, a study paved the way to a very detailed characterization of amyloid structures using ¹³C-labeled amino acids on the fragments A β_{34-42} and IAPP₂₀₋₂₉. This method makes it possible to precisely probe which amino acids are included in the β -sheets, thanks to characteristic bandshifts of ¹³C-labeled amide I groups. Usually, three spectra are acquired for each labeled position: (i) a spectrum of the unlabeled peptide, (ii) a spectrum

with labeled-only peptide and (iii) a spectrum with isotopically diluted labeled peptides (dilution between 1:2 and 1:5 labeled/unlabeled). The difference in the position of the ^{13}C component between spectra (ii) and (iii) can indicate a specific secondary structure. Also, the shift of the ^{13}C component to lower frequencies is accompanied with a decoupling between amide bonds which results in a shift of the ^{12}C amide I band to higher frequencies. This type of study allows the characterization of specific segment(s) involved in the β -sheets⁵⁶⁻⁵⁷. ^{13}C -labeling was also used to study the dynamical rearrangement of β -sheets during the nucleation process of PrP₁₀₉₋₁₂₂, a peptide from the PrP involved in Creutzfeldt-Jakob's disease and "mad cow" disease⁵⁸. For a review highlighting the possibilities offered by this type of experiment and for theoretical considerations, see Decatur⁵⁹ and Welch *et al.*⁶⁰.

Isotopic labeling can be exploited even further, with the use of doubly labeled carbonyls $^{13}\text{C}=\text{O}$, as it induces an even larger redshift and the disappearance of spectral overlap issue. This method has been applied to study the effect of deamidation on specific residues of human IAPP (hIAPP) by 2D-IR spectroscopy⁶¹. Recent experimental and computational studies of A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ highlighted the strength of this technique for distinguishing fibrillar oligomers from fibrils, thanks to spectral features hidden in standard IR. More particularly, the presence of a low-wavenumber component at 1610 cm^{-1} , persistent to disaggregation by sodium dodecyl sulfate micelles, unlike the 1625 cm^{-1} component, led the authors to the conclusion that the 1610 cm^{-1} band corresponds to fibrils while the one at 1625 cm^{-1} would correspond to fibrillar oligomers⁶². We can regret that 2D-IR is not as commonly used as standard IR yet, given its strength in revealing structural details, as demonstrated in existing studies.

Nonetheless, standard IR is also a powerful technique on its own, the main advantages of which are (i) the possibility of working with either protein solutions or suspensions of membranes and proteins (in a wide range of pH and ionic strength), (ii) rapidity of acquisition, allowing investigation of kinetic experiments, (iii) and the possibility to record spectra as a function of temperature. IR might be considered quite demanding regarding sample quantity, as protein and peptide concentrations may be above 2.5 mg mL^{-1} . Therefore, working with synthetic peptides may be an advantage as they may be more easily available in higher amount than recombinant proteins. One of the major drawbacks of IR is the overlap

of secondary structure band components in the amide I region, but this problem can be overcome by isotopic labeling and/or 2D-IR as explained above. However, β -sheets are amongst the easiest structures to observe, due to their band narrowness, position at lower wavenumbers than other structures and their high absorption coefficient, thus facilitating the study of amyloid peptides and proteins. IR is then a powerful technique to investigate aggregation kinetics. Other secondary structures may be more difficult to analyze as they may overlap, exhibit spectral variations depending on the aqueous environment and because their assignment is less ascertained⁶³.

Conventional IR can probe insoluble samples, which is quite common amongst amyloids, by using attenuated total reflection IR (ATR-IR). Solid samples could be probed as well. ATR-IR was used by Berthelot *et al.* to study the kinetics of the yeast amyloid HET-s₂₁₈₋₂₈₉ and one of its mutant. ATR-IR allowed the identification of secondary structure changes when pH increased from 2 to 7.4: for HET-s₂₁₈₋₂₈₉, a transition from random coil to parallel β -sheets was observed, while its mutant M8 instantly changes from a random coil conformation to antiparallel β -sheets⁶⁴. For a thorough review on ATR-IR applied to amyloid proteins, see Sarroukh *et al.*⁵⁰.

Variations of pH are accounted to be amongst the possible causes inducing protein misfolding. Perálvarez-Marín *et al.* probed the effect of photoinduced pH jumps (from 8.5 to < 6.0) on the aggregation rate of A β ₁₋₂₈. An antiparallel arrangement of the β -sheets was observed, with a transition state corresponding to oligomers with the same antiparallel structure⁶⁵. Guo *et al.* also explored the effect of pH on the structure of A β fragments (A β ₁₋₂₅, A β ₂₅₋₃₅, and A β ₃₃₋₄₂). While A β ₁₋₂₅ forms antiparallel β -sheets at pH 4.6 and 7.4, A β ₃₃₋₄₂ adopts a parallel arrangement, with also some antiparallel β -sheets at pH 7.4. The particularity of these two fragments is their ability to adopt, along with β -sheets, a rather high proportion of random coil conformation at pH 7.4 (38 and 28% for A β ₁₋₂₅ and A β ₃₃₋₄₂, respectively). By contrast, the structure of A β ₂₅₋₃₅ is somehow pH-independent, and conserves the same highly ordered parallel β -sheet structure regardless of pH. The authors cautiously conclude that A β ₂₅₋₃₅ can form fibrils on its own, while the other fragments would form oligomeric structures. Therefore, perspective regarding the full-length peptide would

be that the presence of antiparallel β -sheets is synonym of oligomers while a parallel β -sheet structure would lead to amyloid fibrils⁶⁶.

The parallel β -sheet structure of $A\beta_{25-35}$ has been confirmed using IR, this configuration being also adopted in the presence of anionic model membranes⁶⁷. IR has indeed the potential to allow structural studies of amyloid proteins and peptides in a more physiological relevant membrane context. Another example is the above-mentioned peptide AS_{71-82} , that also adopts a parallel β -sheet structure upon interactions with negatively charged model membranes¹⁵. Its conformation is mainly disordered in the absence of membranes or in the presence of neutral (zwitterionic) membranes although some β -sheets are also detected¹⁵. The parallel β -sheet structure of AS_{71-82} looks similar to the one of fibrils formed by the parent protein AS ⁶⁸⁻⁶⁹.

Even if the structural characterization of amyloid peptides/proteins upon interactions with model membranes lies beyond the scope of the present review, it is noteworthy that it is also of primary importance, as membranes are thought to influence and accelerate the oligomerization and fibrillization in several diseases⁷⁰⁻⁷¹. Membranes are also important for their effect on the local concentration of amyloid polypeptides (molecular crowding)⁷².

Spectral overlap of secondary structures is often mentioned as a problem in IR studies. However, this drawback can be partly overcome by cautious analyses^{63,73}. Spectral deconvolution is most often used to quantify secondary structures, while the calculation of second derivatives allows identification of the different peak contributions, and thus the secondary structures present, in the overlapped spectra⁷⁴. Juszczak *et al.* highlighted the structural insights provided by second derivatives applied to the study of $A\beta_{11-28}$ and its clinically relevant variants to identify helix-containing structures of would-be monomeric species in the aggregation process of all the mutants studied. Here, the problems caused by spectral overlap, and especially in the α -helix/ 3_{10} -helix region, were overcome with a better peak identification provided by second derivatives⁷⁵.

IR has also the advantage of being sensitive to H/D exchanges, notably in the amide I/I' and amide II/II' regions. This kind of experiment allows kinetics analysis of fibrillogenesis, when undeuterated peptides or proteins are allowed to fibrillate in a

deuterated solvent. Although, to the best of our knowledge, it has not been applied to amyloid fragments, a study demonstrating the capacity of such experiments has been carried on the protein insulin⁷⁶.

3.5.4 IR perspectives

It should be noted that new techniques employing IR for the study of amyloid peptides and proteins were recently developed. Lately, nano-IR (also called infrared nanospectroscopy) emerged, and represents to IR what TERS is to Raman spectroscopy: it combines an IR spectrometer with an AFM and appears to be a valuable tool to characterize precise molecular variations with a 30-nm lateral resolution (unique amyloid fibrils)⁷⁷⁻⁷⁸. Also, in-cell IR is now made possible by coupling an IR microscope with a microfluidic live-cell incubator, and could be applied to the study of amyloids⁷⁹. Moreover, in situ IR microspectroscopy of patients-retrieved cells seems a promising way of establishing early diagnostics of amyloid diseases⁸⁰.

3.5.5 Vibrational circular dichroism - VCD

VCD differs from conventional IR spectroscopy in that VCD is sensitive to the chiral property of biomolecules. It is homolog of ROA for IR spectroscopy. The signal corresponds to the difference in absorbance of a left- and a right-circularly polarized light ($\Delta A = A_L - A_R$). The ΔA signal is however approximatively five orders of magnitude smaller than the corresponding “unpolarized” absorbance A , and thus requires quite longer acquisition times in order to obtain a good signal-to-noise ratio⁸¹. For the same reason, VCD requires rather high minimal sample concentrations ($\sim 20 \text{ mg mL}^{-1}$)⁸¹. However, amyloid fibrils display an intense signal in the amide I region, compared to “regular” secondary structures of globular proteins. This peculiar feature was first underlined in the group of Nafie a decade ago⁸², with experiments conducted on the fibrillization of insulin. This study highlighted the high sensitivity of VCD for this type of structure, which then sparked the interest of the “amyloid community” for VCD.

Explanations for this unusual high intensity reside in the intrinsic morphology of amyloid fibrils: their high structural order induces a stacking of amide groups along a same axis, thus making intrasheet vibrational couplings very strong and thereby inducing an

intense VCD signal. The most favorable parameters enhancing the signal are an in-register parallel orientation of the β -strands, along with a twisted morphology of the fibril⁸³.

VCD spectroscopy has almost the same advantages as standard IR (possibility of kinetics and temperature-controlled experiments) but the foremost advantage of VCD over IR is that the signal relies on the chirality of molecules. When applied to amyloid peptide and protein fibrils, two types of signals are most often observed: almost-symmetrical couplets of opposite direction, one with a negative-positive couplet (“normal” signal), and another with a positive-negative couplet (“reversed” signal) corresponding to left- and right-twisted fibril morphologies, respectively (Fig. 3.3). Left-twisted structures are usually more common than right-twisted ones, due to the natural chirality of amino acids inducing a slight left-twist along β -strands⁸⁴.

VCD is particularly appropriate to examine amyloid fibrillization and has thus been used extensively for kinetics study. VCD can in turn apprehend the polymorphism of amyloid fibrils as exemplified by the changes of supramolecular chirality of insulin and the peptide HET-S₂₁₈₋₂₈₉ upon pH modification⁸⁵⁻⁸⁶. In these two cases, the signal completely reverses upon increase in pH, demonstrating an inversion of the fibril twist, probably due to protonation/deprotonation of sidechains, thus rearranging to a more energetically favorable configuration. Chirality inversion of HET-S₂₁₈₋₂₈₉ upon pH elevation is illustrated in Fig. 3.3. Nonetheless, the core structure of the fibrils remains the same upon this pH modification, as revealed by the highly similar DUVRR spectra at pH 2.0 and 6.0⁸⁶.

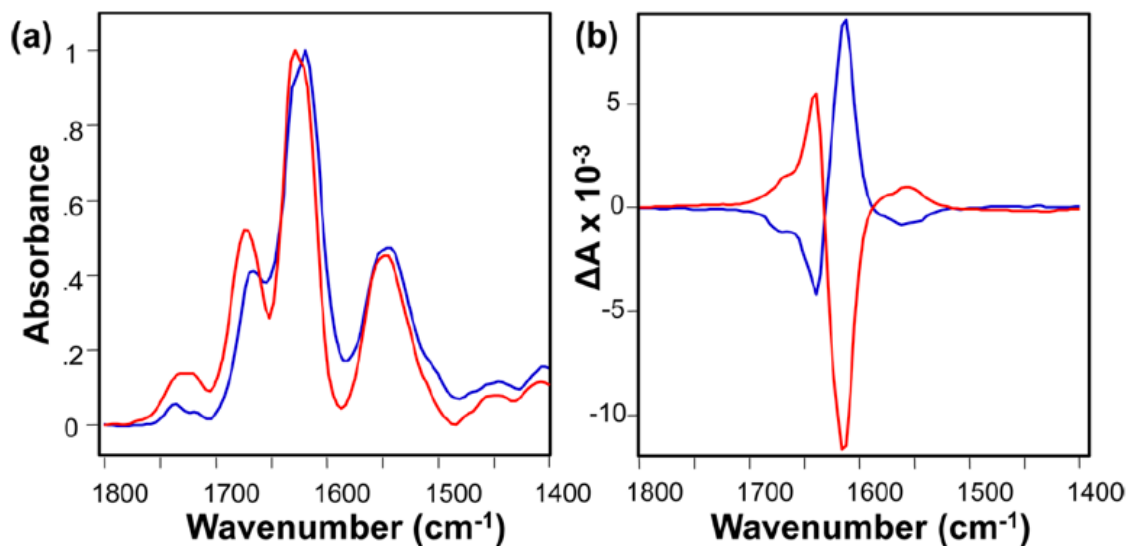


Figure 3.3. IR amide I bands (a) and corresponding VCD spectra (b) of HETs_{218–289} amyloid fibrils at pH 2.0 (red) and pH 6.0 (blue). Fibrils initially formed at pH 2.0 exhibited a left-handed twist, and when the pH was increased to 6.0, the chirality of the fibrils reversed, as proved by the inversion of the VCD signal. This example highlights the complementarity of VCD to IR, where spectra at both pHs look very alike. Reprinted with permission from Shanmugasundaram *et al.*⁸⁶. Copyright © 2015 American Chemical Society.

A more extensive study has been conducted with the aim of linking supramolecular chirality, VCD signal and polymorphism in amyloids⁸⁷. The comparison of the VCD signals of five proteins and peptides at different pHs: insulin, lysozyme, apo- α -lactalbumin, HET-s_{218–289} and transthyretin_{105–115} (TTR_{105–115}) allowed assigning morphology to the different spectral features. In almost all cases, the normal VCD spectra correspond to left-twisted fibrils, while ‘reversed’ signals correspond to flat tape-like fibrils. The correlation between spectra and morphology was assessed by scanning electron microscopy (SEM) and AFM. The authors proposed pathways of fibrillary assembly for both signals: for left-twisted fibrils to form, left-twisted protofilaments would braid together, while the fibrils at the origin of the reversed signal would be constituted of laterally associated right-twisted protofilaments. The authors concluded that VCD probes chirality at the filament level, and not at the fibril level, and that this pH-controlled polymorphism could be a general feature of amyloid proteins and peptides.

Aggregates of polyQ stretches are known to be related to several neurodegenerative diseases, including HD⁸⁸⁻⁸⁹. Kurouski *et al.* studied polyQ peptides of different lengths in order to identify the critical sequence length responsible for aberrant aggregation. While the IR spectra of Q18 (stretch of 18 glutamine residues), Q25, Q26 and Q41 are almost identical and characteristic of a β -sheet-rich secondary structure, the corresponding VCD spectra vary dramatically between Q18, Q25 and Q26 on one side, and Q41 on the other. The latter peptide, despite exhibiting the same peaks as the formers, has an intensity one order of magnitude higher. The authors, after experiments conducted with Q30, Q35 and Q40 peptides, concluded that a threshold exists between Q30 and Q35, a critical length responsible for a change in the supramolecular chirality, causing a large increase in the VCD signal. It remains however to be confirmed whether this change in supramolecular structure is somehow related to pathogenicity. The authors also used DUVRR to gain insights into the core structure of polyQ fibrils. The DUVRR spectra obtained in water for Q18, Q26 and Q41 fibrils are almost identical, consistently with the IR spectra. However, upon H/D exchange, the DUVRR spectrum of Q41 fibrils displays a more intense amide II' band than for Q26 fibrils. This difference suggested that despite being more stable, the twist along Q41 fibrils makes them particularly prone to H/D exchange⁹⁰.

VCD has also been used to study two fragments of the IAPP peptide, namely IAPP₂₁₋₂₇ and IAPP₂₈₋₃₃, and to compare the results of solution-formed fibrils and microcrystals of the same sequences⁹¹. The main goal was to assess and validate the structures obtained previously via X-ray diffraction in the group of Eisenberg⁹². For each peptide, IR and VCD spectra of both the fibrils and the microcrystals were very similar (aside from sign and magnitude), validating the steric zipper models previously described, and confirming that the interaction most responsible for the enhanced VCD signal is the parallel orientation of β -sheets.

Aside from working in different aqueous conditions (ionic strength, concentration, pH), VCD also allows working in different media other than aqueous solutions. It is noteworthy that it is also possible to work with dry amyloid films or suspensions in organic solvents. For example, Shanmugam and Polavarapu worked on A β ₂₅₋₃₅ in various organic solvents and in different physical states (liquids, gels and films) to unravel the different

structures $A\beta_{25-35}$ can adopt in specific environments: methanol for membrane-like environment, acidic conditions to study the aggregated form, and dimethyl sulfoxide for the solution form of $A\beta_{25-35}$ ⁹³. Their results highlight the different structures accessible for $A\beta_{25-35}$, and maybe more importantly, provide insights into the polymorphism of a short 11-residue long peptide. One can thus imagine the problem caused by full-length amyloid protein polymorphism for their characterization.

As for IR, isotopic labeling for VCD is useful to decrease spectral overlap. The physical basis is the same as for IR, where two types of experiments are needed, a first one (i) with isotopic dilution, usually between a 1:2 and 1:4 ratio (isotopically labeled/unlabeled), and another one (ii) with uniquely isotopically labeled peptides. The comparison of the two corresponding $^{13}\text{C}=\text{O}$ (or $^{13}\text{C}=\text{O}^{18}$) bands in (i) and (ii) allows one to determine the secondary structure of the labeled residue. If a large shift is observed, it indicates a strong coupling of the ^{13}C -labeled carbonyls, as predicted for highly ordered structures such as β -sheets. Shanmugam and Polavarapu demonstrated the usefulness of isotopic labeling by applying it to the structural investigation of amyloid fragment $A\beta_{16-22}$. Using a set of four peptides with ^{13}C -labeled carbonyls positioned at residues 17 and 21 ($A\beta_{16-22}$, $A\beta_{16-22}:^{13}\text{C-17}$, $A\beta_{16-22}:^{13}\text{C-21}$, $A\beta_{16-22}:^{13}\text{C-17/21}$), they managed to describe precisely the structure of $A\beta_{16-22}$ as antiparallel β -sheets. In this case, VCD served as a more structure-sensitive tool than IR for validating their model⁹⁴. For a more extensive description of ^{13}C -labeling aiming at the structural characterization of amyloid fibrils, see Welch *et al.*, where they compare experimental and DFT-based (density functional theory) results for four different peptides, including the above-mentioned example⁶⁰. Since VCD is not yet a commonly used technique, DFT has revealed to be a valuable tool for result interpretation. As VCD is sensitive to several structural features (mostly the degree of twist, β -strand length and number of protofilament in the fibril), DFT was used to probe the effect of their interplay on VCD signal^{49,60,83}. VCD has revealed to be a powerful tool to study amyloid peptides and proteins, especially in fibrillary form. It is noteworthy that VCD, more than being an efficient technique capable of probing fibrillogenesis and chiral features, highlights the chiral facet of polymorphism and is undoubtedly the most adapted technique to study this aspect. As demonstrated by Kurouski *et al.*, VCD is able to detect supramolecular chirality features that lie below the direct limit of detection of imaging techniques such as SEM or AFM⁸⁷. The attractiveness of VCD is

rather recent and consequently, it is not as widespread as conventional IR, but one can imagine that progressively more laboratories will acquire VCD spectrometers and expertise, given the strength demonstrated by this technique for amyloid studies. Like ROA, VCD is also very sensitive to PPII structure. It is actually the only technique that can distinguish true random coil from PPII⁹⁵⁻⁹⁶.

3.6 Solid-state nuclear magnetic resonance – ssNMR

Of the techniques presented herein, ssNMR is indubitably the most powerful, but it also comes with its drawbacks: ssNMR is a costly technique due to the necessary isotopic labeling of residues, and the high sample quantities required. Several pulse sequences of different complexity can be applied to the study of amyloid peptides and proteins, from one-dimensional (1D) spectra (e.g., ¹³C spectra) to multidimensional spectra with several nuclei involved (chemical shifts and/or dipolar couplings of ¹³C, ¹⁵N and ¹H usually). The structural features revealed by ssNMR mainly consist of secondary structure information, intra- and intermolecular distance and dihedral angle measurements, which combined altogether allow the determination of tertiary and quaternary structures. The use of fragments is particularly suited for ssNMR where selectively labeled peptides greatly facilitate the interpretation of 1D and multi-dimensional spectra.

In ssNMR, the distribution of molecular orientations due to the lack of isotropic tumbling leads to spectra with broad and often overlapped peaks, due to a phenomenon called chemical shift anisotropy (CSA). While CSA can be a way to obtain structural and dynamical information on the sample, most ssNMR pulse sequences tend to cancel the CSA interaction via magic-angle spinning (MAS). Since MAS tends to cancel homo- and heteronuclear couplings, ssNMR pulse sequences are generally designed to reintroduce specific dipolar couplings, which contain the internuclear distance information.

Technological advances such as higher magnetic fields and higher MAS frequencies allowed the elaboration of more complex pulse sequences leading to more advanced structural characterizations. Recently, a study demonstrated the possibility of working with 0.7 mm probes and sample quantity < 500 µg at spinning rates over 100 kHz in high magnetic fields with the aim of assigning alpha protons in fully protonated and ¹³C, ¹⁵N-labeled

proteins. This method, which aims at facilitating structural studies of biomolecular assemblies, has been applied to five proteins in different forms, and notably to HET_{s218–289}, to establish a proof of concept⁹⁷. To illustrate the high-resolution obtained with these proton-detected pulse sequences, Fig. 3.4 displays representative 2D cross-sections of ¹⁵N- and ¹³C'-linked H_α-detected spectra of four proteins, including HET-s_{218–289}.

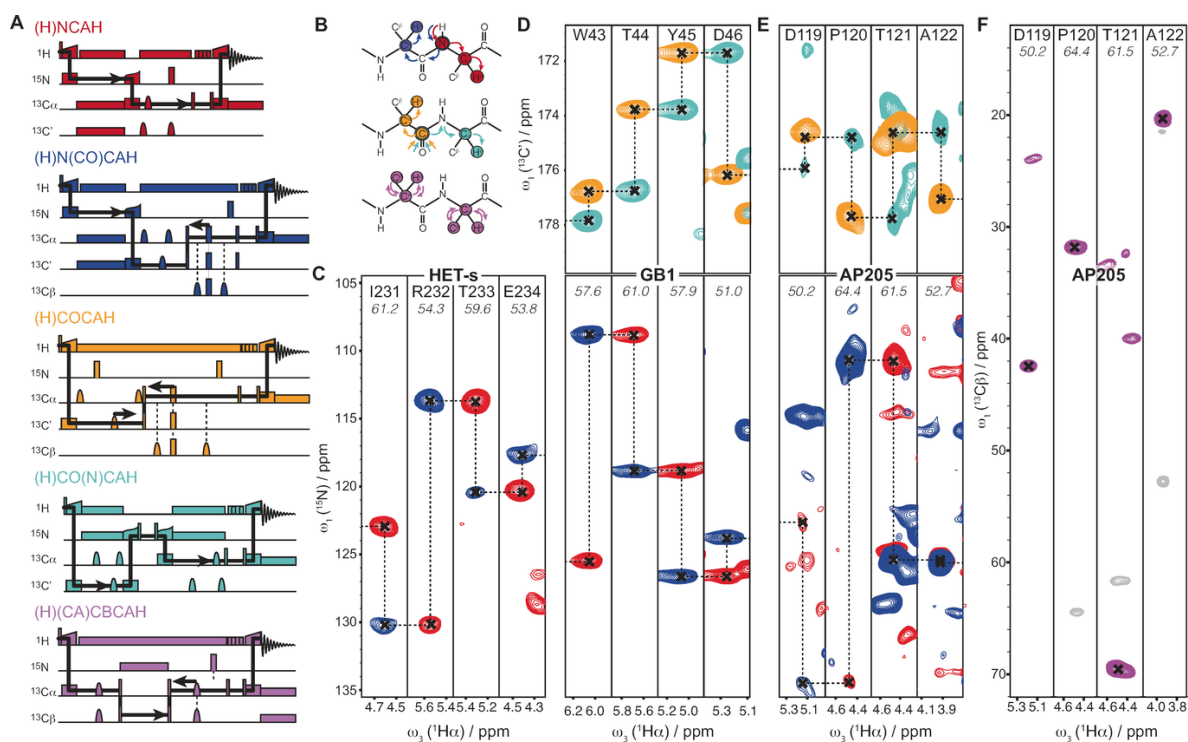


Figure 3.4. (A) Simplified correlation pulse sequence schemes, with indirect chemical shift evolution periods indicated by black arrows. (B) Intramolecular magnetization flows corresponding to the colormatching correlation pulse sequences presented in (A). 2D cross-sections of ¹⁵N- (blue and red) and ¹³C'-linked (orange and cyan) H_α-detected spectra of (C) HET-s_{218–289}, (D) GB1, (E) AP205CP and the respective intra-residue C^β-C^α-H_α correlations for AP205 (F). Reprinted with permission from Stanek *et al.*⁹⁷. Copyright © 2016 by John Wiley & Sons, Inc.

Recently, Smith *et al.* also used similar proton-detected (2D and 3D) pulse sequences and fast MAS (60 kHz) to assign H_N and H_α of HET-s_{218–289}⁹⁸. In order to increase spectral resolution, a set of differently-deuterated samples was used. These H_N and H_α assignments were facilitated by the use of previously-obtained C_α, C_β, C', and N assignments used for the determination of the three-dimensional structure of HET-s_{218–289}, in the same group. Their results indicate that HET-s_{218–289} adopts a left-handed β-solenoid conformation with β-strands

parallel to each other⁹⁹. However, corrections due to deuterium effects must have been applied for C_α, C_β and N resonances. Such assignments of H_N and H_α allowed a better and more precise structural and dynamical description of HET-S₂₁₈₋₂₈₉.

As for IR, the first ssNMR studies of amyloid peptides and proteins began concomitantly with the progressive identification and sequencing of the polypeptides and proteins responsible for amyloid diseases. Amongst the early studies of amyloid fragments, ssNMR was used alongside IR for the study of IAPP₂₀₋₂₉⁵⁶. Besides the structural information provided by IR ¹³C amide bands (see the IR section), the carbonyl ¹³C chemical shifts obtained for each peptide are indicative of the structural rigidity and allowed the identification of the β-sheet-only stretch, reaching similar conclusions as those obtained by IR. The structural model proposed for IAPP₂₀₋₂₉ was later refined with intercarbon distance measurements via rotational resonance (R²) experiments, thus allowing a two-dimensional description of the β-sheet pleated peptide IAPP₂₀₋₂₉¹⁰⁰. Rotational resonance is a MAS ssNMR technique that uses specific dipolar recoupling to obtain internuclear distances. Since the discovery of the R² effect¹⁰¹, several pulse sequences have been implemented in order to extend the distance measurement possibilities: to name a few, the REDOR (rotational-echo double-resonance) pulse sequence and its close cousin TEDOR (transferred-echo double-resonance) were both designed to measure distances between unlike nuclei such as ¹³C and ¹⁵N¹⁰²⁻¹⁰³, while R² is generally a technique for alike nuclei (¹³C-¹³C typically). A greater diversity of complementary pulse sequences means a better structural characterization thanks to a wider range of measurable distances, such as intra- and interstrand as well as intra- and interprotofilaments distance measurements.

Similarly, the peptide Aβ₃₄₋₄₂ was described with an unusual cis amide bond conformation via R² measurements¹⁰⁴, and later with a refined antiparallel β-sheet structure thanks to a combination of R² measurements and ¹³C chemical shifts of carbonyl carbons and α-carbons¹⁰⁵. Aβ₁₆₋₂₂ was also studied by ssNMR, and forms antiparallel β-sheets all along the seven residues¹⁰⁶. However, the fragment Aβ₁₀₋₃₅ has been described with a parallel in-register structure with ¹³C-¹³C distances measured by the DRAWS (dipolar recoupling in a windowless sequence) pulse sequence, and has been found to be more representative of the parent Aβ peptides¹⁰⁷, the parallel configuration of the β-sheets having later been found in

several polymorphs of the full A β peptides^{23,108-111}. A β peptides being indubitably the most studied amyloid peptides, it is to be noted that a recent review compiled the latest structural characterization studies carried on A β ₁₋₄₂. Notably, the authors underlie the encouraging similarities in the structures obtained in different laboratories, thereby emphasizing the strength of ssNMR for the study of amyloid fibrils, and more specifically the reliability of such studies. However, amongst the issues addressed in this review, the importance of the sample preparation control in order to work on monomorphs is particularly stressed²⁴.

ssNMR was also used to determine the structure of a fragment of the amyloid protein transthyretin, responsible for several neuropathies: TTR₁₀₅₋₁₁₅. The authors used a combination of 2D and 3D spectra to obtain a total of 76 constraints on dihedral angles (41 constraints for 19 dihedral angles) and ¹³C-¹⁵N distance measurements (35 distances between 3 and 6 Å)¹¹². To obtain such precise measurements, MAS ssNMR was used on uniformly ¹³C-¹⁵N-labeled peptides in consecutive stretches of four amino acids. Most of the ¹³C-¹⁵N distances were obtained with the pulse sequence 3D zf-TEDOR (3D z-filtered-TEDOR)¹¹³. This pioneering work showed early on the strength of MAS ssNMR for precise amyloid fibril structural characterization. Prior to this refinement study, the same authors had used a large set of chemical shifts of ¹⁵N, ¹³CO, ¹³C α , and ¹³C β to predict quantitatively the backbone torsion angles, as well as backbone atom distances (¹³C-¹⁵N) with the REDOR pulse sequence¹¹⁴.

The peptide IAPP₂₀₋₂₉ was also characterized by ssNMR in two research groups that obtained different results. While Nielsen *et al.* described an antiparallel structure for IAPP₂₀₋₂₉ with face-to-back contacts¹¹⁵, Madine *et al.*, almost at the same time, identified two forms of the same peptide, a parallel and an antiparallel configuration¹¹⁶. Madine *et al.* used the DARR pulse sequence (dipolar-assisted rotational resonance¹¹⁷) to identify ¹³C-¹³C cross-peaks that allowed, when combined with R², the assignment of chemical shifts to certain residues in the antiparallel form. Similarly, Nielsen *et al.* used the DARR pulse sequence to determine long-range contacts between several amino acids, which allowed them to refine, along with the symmetry information obtained via R², their model of IAPP₂₀₋₂₉. These two studies underline the complexity brought to structural studies by amyloid fibril

polymorphism, and particularly to ssNMR studies where result interpretation can be prone to ambiguities.

A fragment of the yeast protein Sup35 (GNNQQNY₇₋₁₃) has also been studied via ssNMR. This fragment is of interest mainly because it can be perceived as a model peptide of the amyloidogenic process. van der Wel *et al.* used the DARR pulse sequence to identify and assign ¹³C chemical shifts in 2D spectra, and R² width to measure intermolecular ¹³C=O/¹³C=O distances. ¹³C-¹⁵N distances were determined with 1D REDOR and 2D TEDOR pulse sequences. The authors identified three fibril conformers, each of which displayed in-register parallel β-sheets, but with variations along the strand backbone, revealed by differences in their ¹³C and ¹⁵N chemical shifts¹¹⁸.

The group of Sharpe is particularly interested in the prion protein (PrP). They developed models for three fragments of this protein: PrP₁₀₆₋₁₂₆, PrP₂₄₄₋₂₄₉ and PrP₂₄₅₋₂₅₀¹¹⁹⁻¹²⁰. PrP₁₀₆₋₁₂₆ is a peptide that shares many features with its parent protein, and is able to turn cellular PrP (PrP_c) into its scrapie form (PrP_{Sc}), and perhaps the best argument to study this peptide is the ability of monoclonal antibodies to recognize both fibrils formed by PrP₁₀₆₋₁₂₆ and PrP_{Sc} fibrils¹²¹. PrP₁₀₆₋₁₂₆ has been described as adopting a class 1 steric zipper configuration, with parallel β-strands stacking along the fibril long axis and protofilaments oriented in an antiparallel manner. ¹³C-¹³C distances were obtained via PITHIRDS (constant-time recoupling with π-pulses lasting one-third of the MAS rotation period¹²²) for alike ¹³C atoms (interstrand distance) while long-range ¹³C-¹³C interactions (up to 6 Å) were probed with ¹³C 2D correlation spectra with long spin diffusion times, and complemented with R² distance measurements to determine the tertiary and quaternary structures. Similarly, the structures of the two cytotoxic peptides PrP₂₄₄₋₂₄₉ and PrP₂₄₅₋₂₅₀ were determined with the use of basically the same pulse sequences (¹³C spin diffusion, R², PITHIRDS and TEDOR) and found to adopt a class 1 steric zipper configuration for PrP₂₄₄₋₂₄₉ and classes 2 and 3 for PrP₂₄₅₋₂₅₀.

In the structural determinations presented herein, most of them used the chemical shift difference between the ¹³C chemical shifts of carbonyl, α- and β-carbons and the ¹³C chemical shift of an unordered peptide for secondary structure determination¹²³. Moreover, most of the

backbone angular constraints were predicted with the TALOS program algorithm based on the backbone ^{13}C and ^{15}N chemical shifts¹²⁴.

3.6.1 Future developments in ssNMR

ssNMR studies are often time-consuming but higher magnetic fields increase spectral resolution and sensitivity, and so decrease the acquisition time. Higher MAS frequencies also increase the resolution, but then the sample quantity is limited due to the need to work with smaller rotors (i.e., 0.7 mm), which can be convenient to reduce the costs of labeled peptides/proteins required. A third possibility is the use of dynamic nuclear polarization (DNP). This technique uses the large polarization of biradical molecule electrons which is transferred by microwave irradiation to the nuclei of interest at low temperatures (90–100 K)¹²⁵. A probing study showing the efficiency of DNP-enhanced ssNMR was carried out on the amyloid fragment TTR_{105–115}, in the laboratory of Griffin¹²⁶. The authors reached the same conclusions as a decade earlier¹¹² but obtained a total of 111 constraints against 76 previously. This study highlights more particularly the time saved by the use of DNP: when a buildup curve for a ^{13}C - ^{13}C distance measurement (via DQF-DRAWS, double-quantum filtered DRAWS) takes 3.5 days without DNP at room temperature, the DNP-enhanced acquisition time is lowered to 1.5 h. Moreover, this article compiles the major distance measurements and the associated pulse sequences necessary for an amyloid fibril structural description: intrasheet contacts (parallel/antiparallel, in- or out-of-register), intersheet contacts (head-to-head or head-to-tail) and protofilament arrangement. An example of structural reconstruction at the protofilament level is displayed in Fig. 3.5.

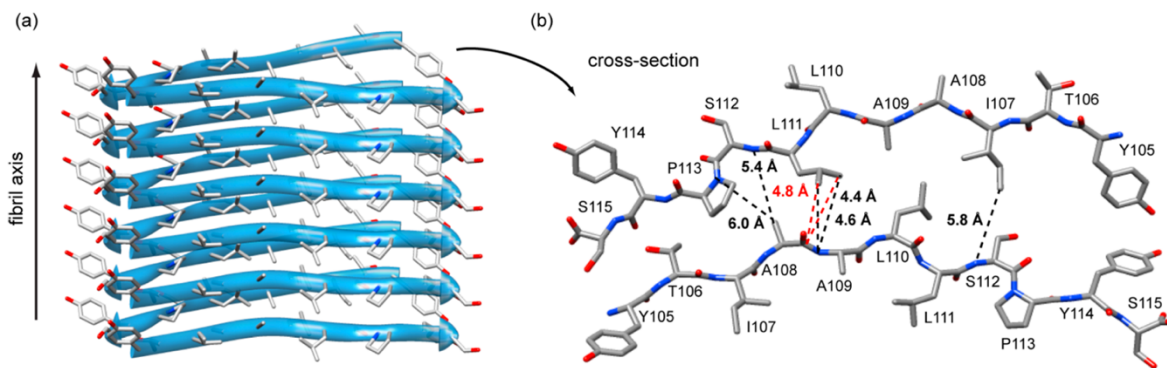


Figure 3.5. Lateral view (a) and cross-section (b) of TTR₁₀₅₋₁₁₅ protofilament. β -Sheets are parallel and in-register along the fibril axis (a) and stacked in an antiparallel manner at the protofilament interface (b). Distances indicated in (b) were obtained via TEDOR measurements (black) and R²TRW (red). Reprinted with permission from Debelouchina *et al.*¹²⁶. Copyright © 2013 American Chemical Society.

For a more extensive review of amyloid protein studies conducted by ssNMR, see Tycko¹²⁷.

3.7 Concluding remarks

Fragments of amyloid peptides and proteins have revealed to be valuable tools to study the amyloidogenic process. While they do not always reflect the exact behavior of their parent protein, fragments have proven to be very useful when it comes to structural and dynamical description of amyloid fibrils. The stretches chosen often constitute the amyloidogenic core of the protein fibrils, and their study thus gives insight into the amyloidogenic process, the folding dynamics, and more specifically precise interactions between residues. Raman, IR, VCD, and ssNMR are versatile biophysical tools adapted for the structural characterization of amyloids. Each of them presents advantages and completes each other. Specific residue interactions and conformational elements may be probed using Raman scattering. IR and VCD are useful for fast secondary structure analysis, and supramolecular chirality in the case of VCD. More extensive and precise structural characterizations can be conducted by IR and VCD with the help of isotopic labeling of specific residues. ssNMR on the other hand is more complex but a lot more structural information can be obtained. ssNMR also stands out from the other techniques by its ability to detect polymorphs formed simultaneously. Modern multi-dimensional pulse sequences,

coupled with technological advances, allow precise structural characterization, such as torsional angles, short- and long-range interactions, and distances in the 1–10 Å range.

Although not the main object of the present review, it is noteworthy to briefly mention the usefulness of imaging techniques and their added value in most studies. Even though high-resolution AFM can be used as a stand-alone technique, as for the description of the morphological inversion of insulin fibrils¹²⁸, it is most often used complementarily to other biophysical tools⁸⁷. Transmission electron microscopy (TEM) is probably the most widespread technique to routinely assess amyloid fibril morphologies alongside structural characterization, and was used in the majority of the works presented herein. Cryo-EM and STEM (cryo-electron microscopy and scanning transmission electron microscopy) are probably the most powerful imaging techniques, as they can be used for fibril reconstruction and mass-per-length measurements, respectively¹²⁹⁻¹³⁰. Used together, these techniques (AFM, STEM and cryo-EM), and coupled with ssNMR, have allowed the full structural characterization and reconstruction of TTR_{105–115}²⁸.

Altogether, these biophysical tools, when applied to appropriate and relevant amyloid peptides, can provide insights into the molecular interactions taking place in amyloid fibrils and during amyloidogenesis. Such insights and a better “global” comprehension of these phenomena constitute an invaluable cornerstone to bring our knowledge of amyloid diseases to the next level, and thereby might offer new avenues of research for a currently-lacking efficient medication. Moreover, this type of research helps in better understanding the process of peptide assembly and the structures formed, which in turn may contribute to the development of new rationally-designed nanostructured materials for biomedical, optoelectronic, food science or other purposes.

3.8 References

1. Selkoe, D. J. In *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease (Fifth Edition)*; Pascual, J. M., Ed.; Academic Press: Boston, 2015; pp 753-768.
2. Alzheimer, A., Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt* **1906**, *23*, 1129-1136.
3. Parkinson, J., An essay on the shaking palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **2002**, *14*, 223-236.
4. Eisenberg, D.; Jucker, M., The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* **2012**, *148*, 1188-1203.

5. Sherrington, R.; Rogaev, E. I.; Liang, Y.; Rogaeva, E. A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Chi, H.; Lin, C.; Li, G.; Holman, K., et al., Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **1995**, *375*, 754-760.
6. Valente, E. M.; Abou-Sleiman, P. M.; Caputo, V.; Muqit, M. M. K.; Harvey, K.; Gispert, S.; Ali, Z.; Del Turco, D.; Bentivoglio, A. R.; Healy, D. G., et al., Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **2004**, *304*, 1158-1160.
7. Walker, F. O., Huntington's disease. *The Lancet* **2007**, *369*, 218-228.
8. Selkoe, D. J.; Hardy, J., The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 595-608.
9. Chen, J.; Armstrong, A. H.; Koehler, A. N.; Hecht, M. H., Small molecule microarrays enable the discovery of compounds that bind the Alzheimer's A β peptide and reduce its cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17015-17022.
10. Johnson, S. M.; Connelly, S.; Fearn, C.; Powers, E. T.; Kelly, J. W., The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug. *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 185-203.
11. Collier, T. J.; Srivastava, K. R.; Justman, C.; Grammatopoulos, T.; Hutter-Paier, B.; Prokesh, M.; Havas, D.; Rochet, J.-C.; Liu, F.; Jock, K., et al., Nortriptyline inhibits aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein by enhancing reconfiguration of the monomeric form. *Neurobiol. Dis.* **2017**, *106*, 191-204.
12. Hoyer, W.; Grönwall, C.; Jonsson, A.; Ståhl, S.; Härd, T., Stabilization of a β -hairpin in monomeric Alzheimer's amyloid- β peptide inhibits amyloid formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 5099-5104.
13. Eisele, Y. S.; Monteiro, C.; Fearn, C.; Encalada, S. E.; Wiseman, R. L.; Powers, E. T.; Kelly, J. W., Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2015**, *14*, 759-780.
14. Giasson, B. I.; Murray, I. V. J.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y., A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α -synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2380-2386.
15. Bédard, L.; Lefèvre, T.; Morin-Michaud, É.; Auger, M., Besides fibrillization: Putative role of the peptide fragment 71-82 on the structural and assembly behavior of α -synuclein. *Biochemistry* **2014**, *53*, 6463-6472.
16. Tagliavini, F.; Prelli, F.; Verga, L.; Giaccone, G.; Sarma, R.; Gorevic, P.; Ghetti, B.; Passerini, F.; Ghibaudi, E.; Forloni, G., Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 9678-9682.
17. Guenther, E. L.; Ge, P.; Trinh, H.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Boyer, D. R.; Gonen, T.; Zhou, Z. H.; Eisenberg, D. S., Atomic-level evidence for packing and positional amyloid polymorphism by segment from TDP-43 RRM2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 311-319.
18. Rodriguez, J. A.; Ivanova, M. I.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Reyes, F. E.; Shi, D.; Sangwan, S.; Guenther, E. L.; Johnson, L. M.; Zhang, M., et al., Structure of the toxic core of α -synuclein from invisible crystals. *Nature* **2015**, *525*, 486-490.
19. Soriaga, A. B.; Sangwan, S.; Macdonald, R.; Sawaya, M. R.; Eisenberg, D., Crystal structures of IAPP amyloidogenic segments reveal a novel packing motif of out-of-register beta sheets. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 5810-5816.
20. Astbury, W. T.; Dickinson, S.; Bailey, K., The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *Biochem. J.* **1935**, *29*, 2351-2360.
21. Eisenberg, D. S.; Sawaya, M. R., Structural studies of amyloid proteins at the molecular level. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 69-95.
22. Hoyer, W.; Antony, T.; Cherny, D.; Heim, G.; Jovin, T. M.; Subramaniam, V., Dependence of α -synuclein aggregate morphology on solution conditions. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 383-393.

23. Petkova, A. T.; Leapman, R. D.; Guo, Z.; Yau, W.-M.; Mattson, M. P.; Tycko, R., Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Science* **2005**, *307*, 262-265.
24. Meier, B. H.; Riek, R.; Böckmann, A., Emerging structural understanding of amyloid fibrils by solid-state NMR. *Trends Biochem. Sci.* **2017**, *42*, 777-787.
25. Tycko, R., Amyloid polymorphism: Structural basis and neurobiological relevance. *Neuron* **2015**, *86*, 632-645.
26. Bousset, L.; Pieri, L.; Ruiz-Arlandis, G.; Gath, J.; Jensen, P. H.; Habenstein, B.; Madiona, K.; Olieric, V.; Böckmann, A.; Meier, B. H., et al., Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2575.
27. Gath, J.; Bousset, L.; Habenstein, B.; Melki, R.; Böckmann, A.; Meier, B. H., Unlike twins: an NMR comparison of two α -synuclein polymorphs featuring different toxicity. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e90659.
28. Fitzpatrick, A. W. P.; Debelouchina, G. T.; Bayro, M. J.; Clare, D. K.; Caporini, M. A.; Bajaj, V. S.; Jaroniec, C. P.; Wang, L.; Ladizhansky, V.; Müller, S. A., et al., Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 5468-5473.
29. Maiti, N. C.; Apetri, M. M.; Zagorski, M. G.; Carey, P. R.; Anderson, V. E., Raman spectroscopic characterization of secondary structure in natively unfolded proteins: α -synuclein. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2399-2408.
30. Miura, T.; Hori-i, A.; Mototani, H.; Takeuchi, H., Raman spectroscopic study on the copper(II) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence. *Biochemistry* **1999**, *38*, 11560-11569.
31. Miura, T.; Suzuki, K.; Takeuchi, H., Binding of iron(III) to the single tyrosine residue of amyloid β -peptide probed by Raman spectroscopy. *J. Mol. Struct.* **2001**, *598*, 79-84.
32. Viles, J. H., Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases. Copper, zinc and iron in Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2271-2284.
33. Oladepo, S. A.; Xiong, K.; Hong, Z.; Asher, S. A.; Handen, J.; Lednev, I. K., UV resonance Raman investigations of peptide and protein structure and dynamics. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2604-2628.
34. Chi, Z.; Chen, X. G.; Holtz, J. S. W.; Asher, S. A., UV Resonance Raman-selective amide vibrational enhancement: quantitative methodology for determining protein secondary structure. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2854-2864.
35. Lednev, I. K.; Ermolenkov, V. V.; He, W.; Xu, M., Deep-UV Raman spectrometer tunable between 193 and 205 nm for structural characterization of proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 431-437.
36. Kourouski, D.; Van Duyne, R. P.; Lednev, I. K., Exploring the structure and formation mechanism of amyloid fibrils by Raman spectroscopy: a review. *Analyst* **2015**, *140*, 4967-4980.
37. Mikhonin, A. V.; Bykov, S. V.; Myshakina, N. S.; Asher, S. A., Peptide secondary structure folding reaction coordinate: correlation between UV Raman amide III frequency, Ψ Ramachandran angle, and hydrogen bonding. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 1928-1943.
38. Popova, L. A.; Kodali, R.; Wetzel, R.; Lednev, I. K., Structural variations in the cross- β core of amyloid β fibrils revealed by deep UV resonance Raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6324-6328.
39. Punihale, D.; Workman, R. J.; Hong, Z.; Madura, J. D.; Asher, S. A., Polyglutamine fibrils: new insights into antiparallel β -sheet conformational preference and side chain structure. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 3012-3026.
40. Barron, L. D.; Hecht, L.; Blanch, E. W.; Bell, A. F., Solution structure and dynamics of biomolecules from Raman optical activity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2000**, *73*, 1-49.

41. Blanch, E. W.; Gill, A. C.; Rhie, A. G. O.; Hope, J.; Hecht, L.; Nielsen, K.; Barron, L. D., Raman optical activity demonstrates poly(L-proline) II helix in the N-terminal region of the ovine prion protein: implications for function and misfunction. *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 467-476.
42. Eker, F.; Griebenow, K.; Schweitzer-Stenner, R., A β_{1-28} fragment of the amyloid peptide predominantly adopts a polyproline II conformation in an acidic solution. *Biochemistry* **2004**, *43*, 6893-6898.
43. Dornhaus, R.; Benner, R. E.; Chang, R. K.; Chabay, I., Surface plasmon contribution to SERS. *Surf. Sci.* **1980**, *101*, 367-373.
44. Yugay, D.; Goronzy, D. P.; Kawakami, L. M.; Claridge, S. A.; Song, T.-B.; Yan, Z.; Xie, Y.-H.; Gilles, J.; Yang, Y.; Weiss, P. S., Copper ion binding site in β -amyloid peptide. *Nano Lett.* **2016**, *16*, 6282-6289.
45. Krasnoslobodtsev, A. V.; Deckert-Gaudig, T.; Zhang, Y.; Deckert, V.; Lyubchenko, Y. L., Polymorphism of amyloid fibrils formed by a peptide from the yeast prion protein Sup35: AFM and Tip-Enhanced Raman Scattering studies. *Ultramicroscopy* **2016**, *165*, 26-33.
46. Paulite, M.; Blum, C.; Schmid, T.; Opilik, L.; Eyer, K.; Walker, G. C.; Zenobi, R., Full spectroscopic tip-enhanced Raman imaging of single nanotapes formed from β -amyloid(1-40) peptide fragments. *ACS Nano* **2013**, *7*, 911-920.
47. Krimm, S.; Bandekar, J. In *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C. B.; Edsall, J. T.; Richards, F. M., Eds.; Academic Press: 1986; Vol. 38, pp 181-364.
48. Schweitzer-Stenner, R.; Measey, T. J., Simulation of IR, Raman and VCD amide I band profiles of self-assembled peptides. *Spectroscopy* **2010**, *24*, 25-36.
49. Welch, W. R. W.; Kubelka, J.; Keiderling, T. A., Infrared, vibrational circular dichroism, and Raman spectral simulations for β -sheet structures with various isotopic labels, interstrand, and stacking arrangements using density functional theory. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 10343-10358.
50. Sarroukh, R.; Goormaghtigh, E.; Ruyschaert, J.-M.; Raussens, V., ATR-FTIR: a "rejuvenated" tool to investigate amyloid proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2013**, *1828*, 2328-2338.
51. Glenner, G. G.; Eanes, E. D.; Bladen, H. A.; Linke, R. P.; Termine, J. D., β -Pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. *J. Histochem. Cytochem.* **1974**, *22*, 1141-1158.
52. Termine, J. D.; Eanes, E. D.; Ein, D.; Glenner, G. G., Infrared spectroscopy of human amyloid fibrils and immunoglobulin proteins. *Biopolymers* **1972**, *11*, 1103-1113.
53. Glenner, G. G.; Wong, C. W., Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *120*, 885-890.
54. Prusiner, S. B.; Groth, D. F.; Bolton, D. C.; Kent, S. B.; Hood, L. E., Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* **1984**, *38*, 127-134.
55. Halverson, K.; Fraser, P. E.; Kirschner, D. A.; Lansbury, P. T., Molecular determinants of amyloid deposition in Alzheimer's disease: conformational studies of synthetic β -protein fragments. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2639-2644.
56. Ashburn, T. T.; Auger, M.; Lansbury, P. T., The structural basis of pancreatic amyloid formation: isotope-edited spectroscopy in the solid state. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 790-791.
57. Halverson, K. J.; Sucholeiki, I.; Ashburn, T. T.; Lansbury, P. T., Location of β -sheet-forming sequences in amyloid proteins by FTIR. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6701-6703.
58. Petty, S. A.; Decatur, S. M., Intersheet rearrangement of polypeptides during nucleation of β -sheet aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 14272-14277.
59. Decatur, S. M., Elucidation of residue-level structure and dynamics of polypeptides via isotope-edited infrared spectroscopy. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 169-175.

60. Welch, W. R. W.; Keiderling, T. A.; Kubelka, J., Structural analyses of experimental ^{13}C edited amide I' IR and VCD for peptide β -sheet aggregates and fibrils using DFT-based spectral simulations. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 10359-10369.
61. Dunkelberger, E. B.; Buchanan, L. E.; Marek, P.; Cao, P.; Raleigh, D. P.; Zanni, M. T., Deamidation accelerates amyloid formation and alters amylin fiber structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12658-12667.
62. Lomont, J. P.; Rich, K. L.; Maj, M.; Ho, J.-J.; Ostrander, J. S.; Zanni, M. T., Spectroscopic signature for stable β -amyloid fibrils versus β -sheet-rich oligomers. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 144-153.
63. Jackson, M.; Mantsch, H. H., The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *30*, 95-120.
64. Berthelot, K.; Lecomte, S.; Géan, J.; Immel, F.; Cullin, C., A yeast toxic mutant of HET-S₍₂₁₈₋₂₈₉₎ prion displays alternative intermediates of amyloidogenesis. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 1239-1246.
65. Perálvarez-Marín, A.; Barth, A.; Gräslund, A., Time-resolved infrared spectroscopy of pH-induced aggregation of the Alzheimer A β_{1-28} peptide. *J. Mol. Biol.* **2008**, *379*, 589-596.
66. Guo, Y.; Wang, J., Spectroscopic evidence for polymorphic aggregates formed by amyloid- β fragments. *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 3901-3908.
67. Labbé, J.-F.; Lefèvre, T.; Guay-Bégin, A.-A.; Auger, M., Structure and membrane interactions of the β -amyloid fragment 25-35 as viewed using spectroscopic approaches. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 7228-7239.
68. Conway, K. A.; Harper, J. D.; Lansbury, P. T., Fibrils formed in vitro from α -synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* **2000**, *39*, 2552-2563.
69. Uversky, V. N.; Li, J.; Fink, A. L., Evidence for a partially folded intermediate in α -synuclein fibril formation. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10737-10744.
70. Galvagnion, C., The role of lipids interacting with alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Parkinson's Dis.* **2017**, *7*, 433-450.
71. Murphy, R. M., Kinetics of amyloid formation and membrane interaction with amyloidogenic proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2007**, *1768*, 1923-1934.
72. Andreasen, M.; Lorenzen, N.; Otzen, D., Interactions between misfolded protein oligomers and membranes: A central topic in neurodegenerative diseases? *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2015**, *1848*, 1897-1907.
73. Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Chapman, D., Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* **1993**, *32*, 389-394.
74. Kong, J.; Yu, S., Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 549-559.
75. Juszczak, P.; Kołodziejczyk, A. S.; Grzonka, Z., FTIR spectroscopic studies on aggregation process of the β -amyloid 11-28 fragment and its variants. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 23-29.
76. Dzwolak, W.; Lokszejn, A.; Smirnovas, V., New insights into the self-assembly of insulin amyloid fibrils: an H-D exchange FT-IR study. *Biochemistry* **2006**, *45*, 8143-8151.
77. Amenabar, I.; Poly, S.; Nuansing, W.; Hubrich, E. H.; Govyadinov, A. A.; Huth, F.; Krutokhvostov, R.; Zhang, L.; Knez, M.; Heberle, J., et al., Structural analysis and mapping of individual protein complexes by infrared nanospectroscopy. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2890.
78. Henry, S.; Bercu, N. B.; Bobo, C.; Cullin, C.; Molinari, M.; Lecomte, S., Interaction of A β_{1-42} peptide or their variant with model membrane of different composition probed by infrared nanospectroscopy. *Nanoscale* **2018**, *10*, 936-940.
79. Gelfand, P.; Smith, R. J.; Stavitski, E.; Borchelt, D. R.; Miller, L. M., Characterization of protein structural changes in living cells using time-lapsed FTIR imaging. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6025-6031.

80. Ami, D.; Lavatelli, F.; Rognoni, P.; Palladini, G.; Raimondi, S.; Giorgetti, S.; Monti, L.; Doglia, S. M.; Natalello, A.; Merlini, G., In situ characterization of protein aggregates in human tissues affected by light chain amyloidosis: a FTIR microspectroscopy study. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29096.
81. Polyanichko, A. M. In *Methods in protein structure and stability analysis: vibrational spectroscopy*; Uversky, V. N.; Permyakov, E. A., Eds.; Nova Science Publishers, Inc.: 2007; pp 267-302.
82. Ma, S.; Cao, X.; Mak, M.; Sadik, A.; Walkner, C.; Freedman, T. B.; Lednev, I. K.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A., Vibrational circular dichroism shows unusual sensitivity to protein fibril formation and development in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12364-12365.
83. Measey, T. J.; Schweitzer-Stenner, R., Vibrational circular dichroism as a probe of fibrillogenesis: The origin of the anomalous intensity enhancement of amyloid-like fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1066-1076.
84. Volpatti, L. R.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J., A clear view of polymorphism, twist, and chirality in amyloid fibril formation. *ACS Nano* **2013**, *7*, 10443-10448.
85. Kurouski, D.; Dukor, R. K.; Lu, X.; Nafie, L. A.; Lednev, I. K., Spontaneous inter-conversion of insulin fibril chirality. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2837-2839.
86. Shanmugasundaram, M.; Kurouski, D.; Wan, W.; Stubbs, G.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A.; Lednev, I. K., Rapid filament supramolecular chirality reversal of HET-s (218–289) prion fibrils driven by pH elevation. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 8521-8525.
87. Kurouski, D.; Lu, X.; Popova, L.; Wan, W.; Shanmugasundaram, M.; Stubbs, G.; Dukor, R. K.; Lednev, I. K.; Nafie, L. A., Is supramolecular filament chirality the underlying cause of major morphology differences in amyloid fibrils? *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2302-2312.
88. Bates, G., Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *The Lancet* **2003**, *361*, 1642-1644.
89. Ross, C. A., Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron* **2002**, *35*, 819-822.
90. Kurouski, D.; Kar, K.; Wetzell, R.; Dukor, R. K.; Lednev, I. K.; Nafie, L. A., Levels of supramolecular chirality of polyglutamine aggregates revealed by vibrational circular dichroism. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1638-1643.
91. Kurouski, D.; Handen, J. D.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A.; Lednev, I. K., Supramolecular chirality in peptide microcrystals. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 89-92.
92. Wiltzius, J. J. W.; Sievers, S. A.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Popov, D.; Riek, C.; Eisenberg, D., Atomic structure of the cross- β spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein Sci.* **2008**, *17*, 1467-1474.
93. Shanmugam, G.; Polavarapu, P. L., Structure of A β (25-35) peptide in different environments. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 622-630.
94. Shanmugam, G.; Polavarapu, P. L., Isotope-assisted vibrational circular dichroism investigations of amyloid β peptide fragment, A β (16–22). *J. Struct. Biol.* **2011**, *176*, 212-219.
95. Dukor, R. K.; Keiderling, T. A., Reassessment of the random coil conformation: vibrational CD study of proline oligopeptides and related polypeptides. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1747-1761.
96. Paterlini, M. G.; Freedman Teresa, B.; Nafie Laurence, A., Vibrational circular dichroism spectra of three conformationally distinct states and an unordered state of poly(L-lysine) in deuterated aqueous solution. *Biopolymers* **1986**, *25*, 1751-1765.
97. Stanek, J.; Andreas, L. B.; Jaudzems, K.; Cala, D.; Lalli, D.; Bertarello, A.; Schubeis, T.; Akopjana, I.; Kotelovica, S.; Tars, K., et al., NMR spectroscopic assignment of backbone and side-chain protons in fully protonated proteins: microcrystals, sedimented assemblies, and amyloid fibrils. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 15504-15509.

98. Smith, A. A.; Ravotti, F.; Testori, E.; Cadalbert, R.; Ernst, M.; Böckmann, A.; Meier, B. H., Partially-deuterated samples of HET-s(218–289) fibrils: assignment and deuterium isotope effect. *J. Biomol. NMR* **2017**, *67*, 109-119.
99. Van Melckebeke, H.; Wasmer, C.; Lange, A.; AB, E.; Loquet, A.; Böckmann, A.; Meier, B. H., Atomic-resolution three-dimensional structure of HET-s(218–289) amyloid fibrils by solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13765-13775.
100. Griffiths, J. M.; Ashburn, T. T.; Auger, M.; Costa, P. R.; Griffin, R. G.; Lansbury, P. T., Rotational resonance solid-state NMR elucidates a structural model of pancreatic amyloid. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3539-3546.
101. Andrew, E. R.; Clough, S.; Farnell, L. F.; Gledhill, T. D.; Roberts, I., Resonant rotational broadening of nuclear magnetic resonance spectra. *Phys. Lett.* **1966**, *21*, 505-506.
102. Gullion, T.; Schaefer, J., Rotational-echo double-resonance NMR. *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 196-200.
103. Hing, A. W.; Vega, S.; Schaefer, J., Transferred-echo double-resonance NMR. *J. Magn. Reson.* **1992**, *96*, 205-209.
104. Spencer, R. G. S.; Halverson, K. J.; Auger, M.; McDermott, A. E.; Griffin, R. G.; Lansbury, P. T., An unusual peptide conformation may precipitate amyloid formation in Alzheimer's disease: application of solid-state NMR to the determination of protein secondary structure. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10382-10387.
105. Lansbury Jr, P. T.; Costa, P. R.; Griffiths, J. M.; Simon, E. J.; Auger, M.; Halverson, K. J.; Kocisko, D. A.; Hendsch, Z. S.; Ashburn, T. T.; Spencer, R. G. S., et al., Structural model for the β -amyloid fibril based on interstrand alignment of an antiparallel-sheet comprising a C-terminal peptide. *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 990-998.
106. Balbach, J. J.; Ishii, Y.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Rizzo, N. W.; Dyda, F.; Reed, J.; Tycko, R., Amyloid fibril formation by A β ₁₆₋₂₂, a seven-residue fragment of the Alzheimer's β -amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR. *Biochemistry* **2000**, *39*, 13748-13759.
107. Benzinger, T. L. S.; Gregory, D. M.; Burkoth, T. S.; Miller-Auer, H.; Lynn, D. G.; Botto, R. E.; Meredith, S. C., Propagating structure of Alzheimer's β -amyloid(10–35) is parallel β -sheet with residues in exact register. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 13407-13412.
108. Colvin, M. T.; Silvers, R.; Ni, Q. Z.; Can, T. V.; Sergeev, I.; Rosay, M.; Donovan, K. J.; Michael, B.; Wall, J.; Linse, S., et al., Atomic resolution structure of monomorphic A β ₄₂ amyloid fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9663-9674.
109. Ravotti, F.; Wälti, M. A.; Güntert, P.; Riek, R.; Böckmann, A.; Meier, B. H., Solid-state NMR sequential assignment of an Amyloid- β (1–42) fibril polymorph. *Biomol. NMR Assignments* **2016**, *10*, 269-276.
110. Wälti, M. A.; Ravotti, F.; Arai, H.; Glabe, C. G.; Wall, J. S.; Böckmann, A.; Güntert, P.; Meier, B. H.; Riek, R., Atomic-resolution structure of a disease-relevant A β (1–42) amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E4976-E4984.
111. Xiao, Y.; Ma, B.; McElheny, D.; Parthasarathy, S.; Long, F.; Hoshi, M.; Nussinov, R.; Ishii, Y., A β (1–42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer's disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 499-505.
112. Jaroniec, C. P.; MacPhee, C. E.; Bajaj, V. S.; McMahon, M. T.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G., High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 711-716.
113. Jaroniec, C. P.; Filip, C.; Griffin, R. G., 3D TEDOR NMR experiments for the simultaneous measurement of multiple carbon–nitrogen distances in uniformly ¹³C,¹⁵N-labeled solids. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10728-10742.
114. Jaroniec, C. P.; MacPhee, C. E.; Astrof, N. S.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G., Molecular conformation of a peptide fragment of transthyretin in an amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 16748-16753.

115. Nielsen, J. T.; Bjerring, M.; Jeppesen, M. D.; Pedersen, R. O.; Pedersen, J. M.; Hein, K. L.; Vosegaard, T.; Skrydstrup, T.; Otzen, D. E.; Nielsen, N. C., Unique identification of supramolecular structures in amyloid fibrils by solid-state NMR spectroscopy. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 2118-2121.
116. 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. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14990-15001.
117. Takegoshi, K.; Nakamura, S.; Terao, T., ¹³C–¹H dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *344*, 631-637.
118. van der Wel, P. C. A.; Lewandowski, J. R.; Griffin, R. G., Structural characterization of GNNQQNY amyloid fibrils by magic angle spinning NMR. *Biochemistry* **2010**, *49*, 9457-9469.
119. Walsh, P.; Simonetti, K.; Sharpe, S., Core structure of amyloid fibrils formed by residues 106-126 of the human prion protein. *Structure* **2009**, *17*, 417-426.
120. Yau, J.; Sharpe, S., Structures of amyloid fibrils formed by the prion protein derived peptides PrP(244–249) and PrP(245–250). *J. Struct. Biol.* **2012**, *180*, 290-302.
121. Jones, M.; Wight, D.; McLoughlin, V.; Norrby, K.; Ironside, J. W.; Connolly, J. G.; Farquhar, C. F.; MacGregor, I. R.; Head, M. W., An antibody to the aggregated synthetic prion protein peptide (PrP106–126) selectively recognizes disease-associated prion protein (PrP^{Sc}) from human brain specimens. *Brain Pathol.* **2009**, *19*, 293-302.
122. Tycko, R., Symmetry-based constant-time homonuclear dipolar recoupling in solid state NMR. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 064506.
123. Wishart, D. S.; Sykes, B. D., The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 171-180.
124. Cornilescu, G.; Delaglio, F.; Bax, A., Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 289-302.
125. Maly, T.; Debelouchina, G. T.; Bajaj, V. S.; Hu, K.-N.; Joo, C.-G.; Mak–Jurkauskas, M. L.; Sirigiri, J. R.; van der Wel, P. C. A.; Herzfeld, J.; Temkin, R. J., et al., Dynamic nuclear polarization at high magnetic fields. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 052211.
126. Debelouchina, G. T.; Bayro, M. J.; Fitzpatrick, A. W.; Ladizhansky, V.; Colvin, M. T.; Caporini, M. A.; Jaroniec, C. P.; Bajaj, V. S.; Rosay, M.; MacPhee, C. E., et al., Higher order amyloid fibril structure by MAS NMR and DNP spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19237-19247.
127. Tycko, R., Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR. *Q. Rev. Biophys.* **2006**, *39*, 1-55.
128. Usov, I.; Adamcik, J.; Mezzenga, R., Polymorphism complexity and handedness inversion in serum albumin amyloid fibrils. *ACS Nano* **2013**, *7*, 10465-10474.
129. Goldsbury, C.; Baxa, U.; Simon, M. N.; Steven, A. C.; Engel, A.; Wall, J. S.; Aebi, U.; Müller, S. A., Amyloid structure and assembly: insights from scanning transmission electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **2011**, *173*, 1-13.
130. Jiménez, J. L.; Nettleton, E. J.; Bouchard, M.; Robinson, C. V.; Dobson, C. M.; Saibil, H. R., The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 9196-9201.

Chapitre 4 : Structures de l'AS₇₁₋₈₂ en solution

4.1 AS₇₁₋₈₂ dans un tampon deutéré

Durant ces travaux de doctorat, nous nous sommes particulièrement intéressés aux interactions entre AS₇₁₋₈₂ et des membranes modèles, pour faire en sorte de s'approcher des conditions physiologiques de la protéine parent AS au contact des membranes neuronales. Cependant, il est également important de s'intéresser à la structure de l'AS₇₁₋₈₂ en solution, de manière à pouvoir envisager les structures formées en présence de membranes comme étant directement provoquées par les interactions avec ces dernières. Ici nous nous sommes donc intéressés à cette structure.

4.1.1 Effet de la concentration de l'AS₇₁₋₈₂

Tel qu'indiqué dans l'introduction, l'agrégation de l'AS peut avoir lieu soit en solution, soit en présence de membranes neuronales. Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de la concentration de l'AS₇₁₋₈₂ sur sa structure. L'idée derrière cette expérience est de sonder l'importance de l'accumulation protéique qui peut être engendrée par un dysfonctionnement de recyclage protéique dans une situation pathologique. Les spectres infrarouges correspondant à des solutions allant de 10 à 30 mM sont présentés à la figure 4.1.

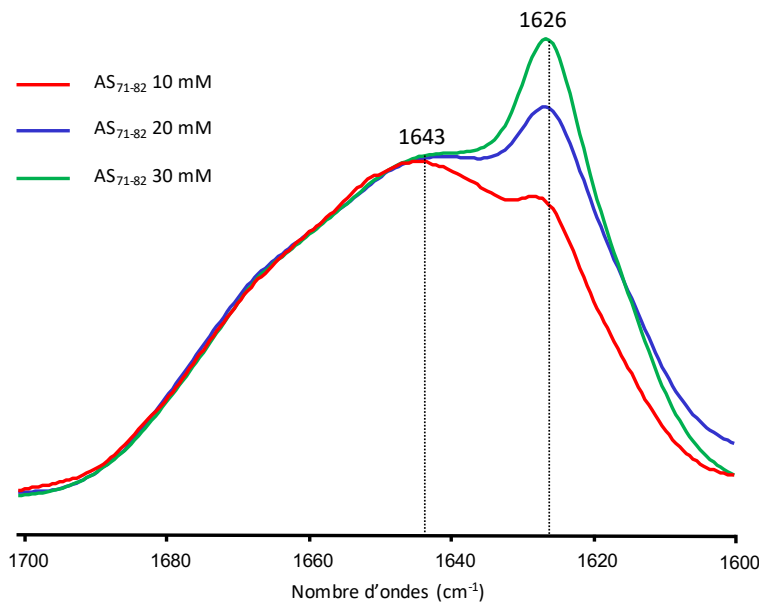


Figure 4.1. IR Spectres infrarouges en transmission de solutions de l'AS₇₁₋₈₂ (10, 20 et 30 mM; tampon phosphate 20 mM, pD 7) à 35°C, normalisés en hauteur à 1643 cm⁻¹.

Les spectres ne changent pas radicalement en fonction de la concentration en AS₇₁₋₈₂, ils présentent tous une bande très large centrée autour de 1643 cm⁻¹, ainsi qu'une bande, plus étroite à 10 mM, située à 1626 cm⁻¹, qui devient prédominante à plus hautes concentrations. La composante à 1643 cm⁻¹ est associée à des structures désordonnées et semble correspondre à la forme monomérique du peptide. Comme son nom l'indique, les structures désordonnées n'adoptent pas de structures définies, mais forment une multitude de structures correspondant à de multiples valeurs d'angles dièdres (φ , ψ). Cependant il faut être prudent car le terme de structures désordonnées est un peu inadapté, puisque le VCD est la seule technique pouvant distinguer sans ambiguïté une conformation désordonnée d'une structure en pelote statistique (*random coil*)¹⁻³. La structure en pelote statistique revêt une importance particulière dans le monde des protéines intrinsèquement désordonnées, en vue de comprendre le repliement que certaines peuvent subir dans des cas pathologiques⁴. Cette structure, souvent associée à une structure purement désordonnée, a la particularité de contenir des hélices polyproline II (PPII)^{1,5-7}. Puisque le VCD est une technique basée sur la chiralité des structures moléculaires, une absence totale de structure (totalement désordonnée) donnerait alors lieu à un spectre VCD totalement plat ($\Delta A=0$). La structure en pelote statistique peut s'apparenter à une pelote de laine, enroulée dans une même direction, mais avec du désordre dans la direction du fil. Une hélice PPII est illustrée à la figure 4.2. La composante à 1623 cm⁻¹ correspond à une structure en feuillet- β adoptée par une minorité de peptides en solution, étant donnée sa faible intensité. Comme nous le verrons ci-dessous, cette composante est associée à une forme oligomérique du peptide.

Par ailleurs, tous les spectres de la figure 4.1 présentent un léger épaulement à 1665 cm⁻¹. Cette composante est attribuée à la vibration de la chaîne latérale du résidu Q₇₉ (glutamine)⁸⁻⁹. Cet épaulement étant toujours présent dans la suite de ce chapitre (entre 1665 et 1658 cm⁻¹), et correspondant toujours à la même vibration, celui-ci ne sera plus mentionné par souci de concision.



Figure 4.2. Vue latérale et de dessus d'une illustration de la structure d'une hélice PPII, hélice gauche aux angles dièdres $\phi = -75^\circ$ et $\psi = 146^\circ$. Figure modifiée à partir de Moradi *et al.*¹⁰ avec permission, Copyright 2010 © AIP Publishing.

La conformation désordonnée caractérisée en transmission s'est avérée correspondre à une structure de pelote statistique grâce à une expérience VCD, dont le spectre correspondant est donné à la figure 4.3.

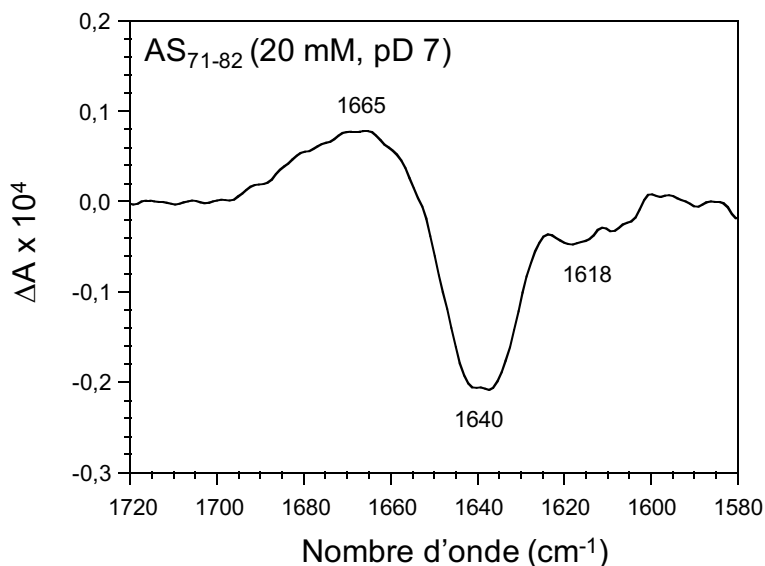


Figure 4.3. Spectre VCD d'une solution d'AS₇₁₋₈₂ à 20 mM dans un tampon phosphate deutéré 20 mM (pD 7). Le spectre correspond à la somme de 20 acquisitions de 6000 scans (40h d'acquisition). Figure modifiée à partir de Martial *et al.*¹¹ avec permission, Copyright © 2019, American Chemical Society.

Le spectre VCD présente trois composantes, à 1665, 1640 et 1618 cm^{-1} . Les deux premières ont été caractérisées dans la littérature comme correspondant à une structure de pelote statistique¹⁻³ et associée ici à l'espèce monomérique du peptide. La dernière composante à 1618 cm^{-1} prouve que la bande caractérisée à 1626 cm^{-1} sur les spectres infrarouges en transmission correspond bien à du feuillet- β . L'intensité de cette composante de feuillet- β (1626 cm^{-1}) laisse à penser qu'il ne s'agit pas d'une véritable structure amyloïde, telle que des protofibrilles ou des fibrilles, dont le signal est beaucoup plus intense et prédomine généralement tout le spectre, mais plutôt à des espèces oligomériques. En effet, l'augmentation de la proportion de ces structures en feuillet- β avec l'augmentation de la concentration en AS₇₁₋₈₂ est compatible avec cette hypothèse : le déplacement des espèces monomériques de protéines/peptides vers les espèces les plus larges -oligomères- avec l'augmentation de la concentration est un phénomène bien connu qui résulte de leur caractère amphiphile¹². Par ailleurs, le phénomène d'encombrement moléculaire est connu pour entraîner la formation de structures ordonnées à partir de peptides ou protéines désordonnées en solution¹³⁻¹⁷.

4.1.2 Effets de la température et du temps

Pour confirmer ou infirmer l'hypothèse des oligomères, nous avons procédé à une étude en température, puisque les structures amyloïdes sont très stables dans de nombreuses conditions (pH, force ionique et température notamment). Les spectres du chauffage d'une solution d'AS₇₁₋₈₂ à 30 mM sont montrés à la figure 4.4.

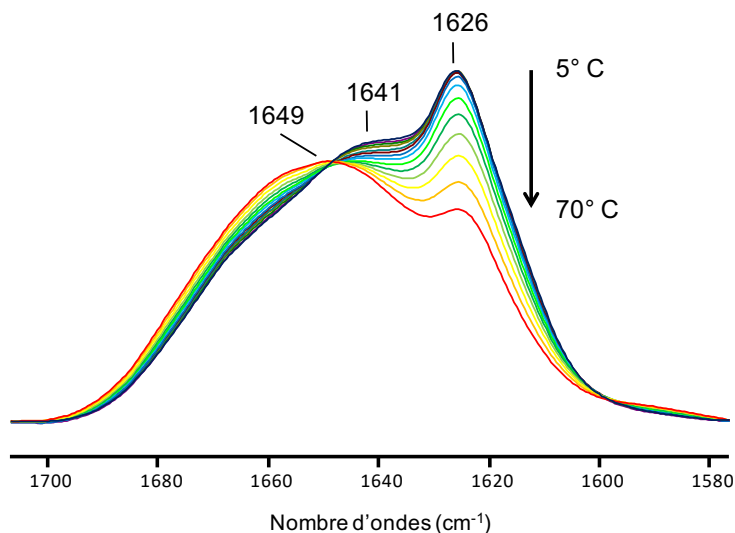


Figure 4.4. Spectres infrarouges en transmission d'une solution d'AS₇₁₋₈₂ à 30 mM en fonction de la température (entre 5 et 70° C).

Comme il est possible de voir à la figure 4.4, la composante spectrale à 1626 cm⁻¹ diminue avec la température. La proportion de feuillet- β augmente très légèrement jusqu'à la température de 40° C, puis décroît progressivement jusqu'à ne devenir qu'un épaulement à 70° C. Comme attendu pour des molécules amphiphiles, les monomères sont favorisés aux plus hautes températures et les oligomères à plus basse température. Ce comportement des oligomères est très différent de celui des fibrilles amyloïdes formées par AS₇₁₋₈₂ qui sont particulièrement stables thermiquement (en présence de membranes anioniques) comme on le verra plus bas. Ces résultats montrent que, bien qu'ils soient formés de feuillets- β , les oligomères de AS₇₁₋₈₂ sont structurellement très différents des fibrilles que le peptide forme et beaucoup moins stables. Cette stabilité thermique réduite semble indiquer que selon les circonstances rencontrées, les oligomères auront tendance à se transformer facilement en d'autres espèces (monomères ou fibrilles). Les oligomères de protéines/peptides amyloïdes, qu'ils soient pré-fibrillaires ou non, sont d'ailleurs des espèces peu stables de manière générale¹⁸⁻¹⁹. Cette faible stabilité est cohérente avec le fait que les oligomères ne sont qu'un intermédiaire du processus d'agrégation des protéines amyloïdes. Bien qu'ils soient régulièrement mis en cause dans le processus de toxicité des pathologies amyloïdes, leur étude s'avère complexe, que ce soit au niveau de leur formation ou de leur isolation. Ici, il semble exister une température au-delà de laquelle les oligomères mènent à la reformation

de monomères en solution. D'autres peptides et protéines amyloïdes présentent une fenêtre de température à l'intérieur de laquelle la formation d'oligomères et de fibrilles est possible, voire accélérée, et stable²⁰. Au-delà de cette fenêtre cependant, tout passage d'une forme monomérique à une forme oligomérique ou fibrillaire est bloqué²¹. De la même manière, dans notre cas, il semble exister une fenêtre de température au-delà de laquelle les oligomères ne sont plus stables et se désassemblent. Par ailleurs, il est à noter que le décalage de la composante initialement à 1646 cm⁻¹ lors du chauffage n'est pas révélateur d'un changement de structure, mais correspond à un changement des propriétés diélectriques du solvant²².

Les structures adoptées par AS₇₁₋₈₂ en solution semblent donc être régies par un équilibre thermodynamique, étant donné que les oligomères paraissent être favorisés par une augmentation de la concentration, mais défavorisés par l'augmentation de la température. Ce comportement d'auto-assemblage dans certaines conditions, comme il a été observé pour l'Aβ(1-42)²³, est à l'opposé de la plupart des protéines dénaturées par la température qui finissent par agréger²⁴⁻²⁵. Il est à noter enfin que les oligomères ne correspondent pas nécessairement à une espèce bien définie mais à un ensemble de différentes espèces (dimères, trimères, tétramères, etc.), les feuillets-β formés pouvant être très similaires dans tous les cas.

Cependant, nous avons souhaité étudier de manière cinétique cette structure, et cela à une température où les oligomères sont favorisés, soit à 40° C, température choisie car elle semble donner lieu à un maximum d'oligomères. Comme les variations des spectres sont faibles, nous présentons les spectres de différences à la figure 4.5A. Pour ce faire, le spectre initial, c'est-à-dire le spectre de référence au temps zéro, est soustrait de tous les autres spectres. L'aire de la bande des oligomères à 1626 cm⁻¹ est ensuite reportée en fonction du temps (figure 4.5B).

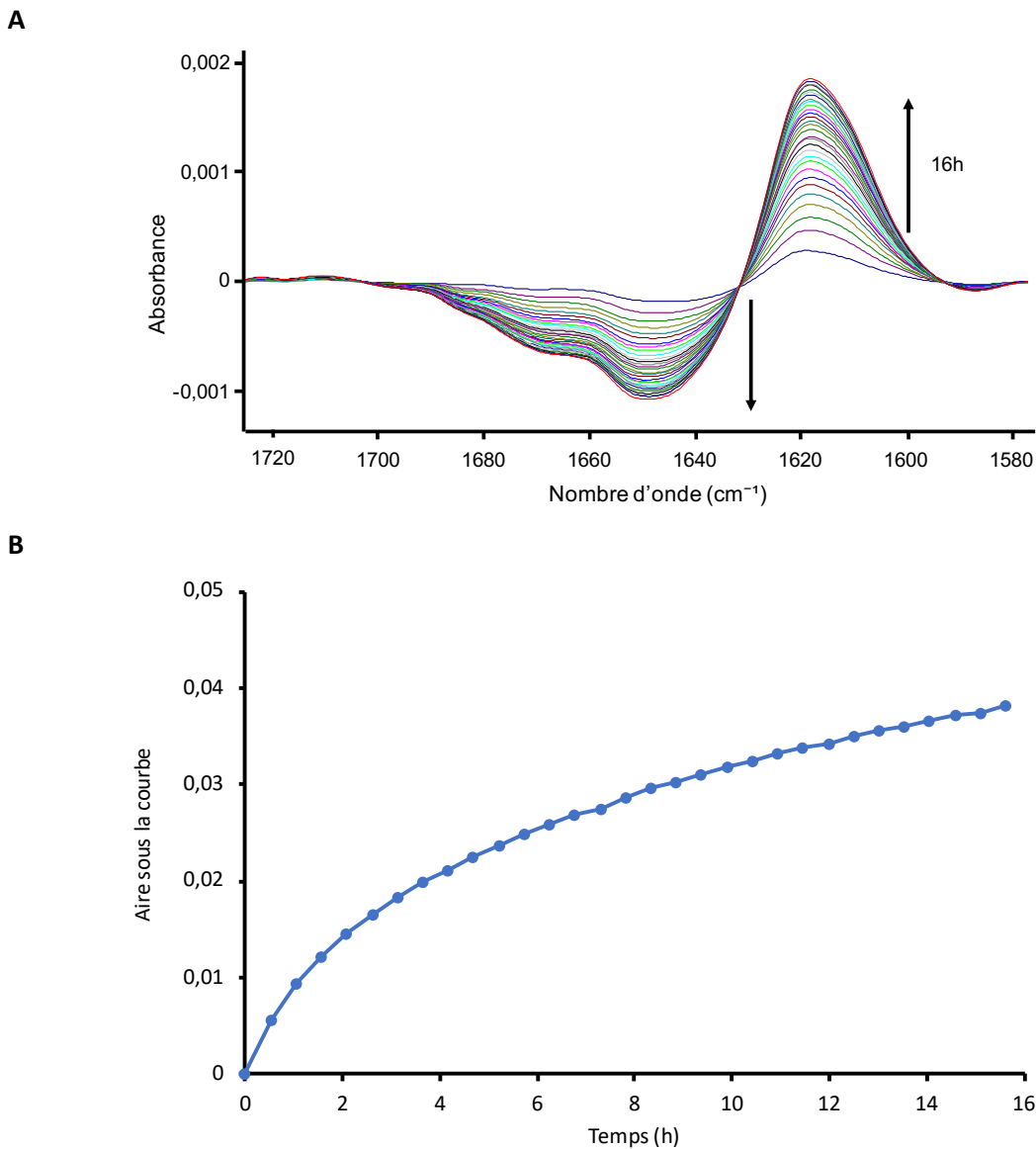


Figure 4.5. (A) Spectres de différence d'une solution AS₇₁₋₈₂ 30 mM (tampon phosphate 20 mM, pD 7) obtenus sur une période de 16h. (B) Tracé de l'aire positive sous la courbe de la figure 4.5A (essentiellement, l'aire intégrée de la bande à 1626 cm⁻¹), en fonction du temps.

Comme on peut le voir aux figures 4.5A et 4.5B, la proportion d'oligomères augmente graduellement avec le temps à température constante. Cette augmentation du nombre d'oligomères en solution se fait au dépend de structures en pelote statistique (monomères). Le point isobestique à 1630 cm⁻¹ traduit une transformation structurale à deux états, sans espèce intermédiaire : les structures en pelote statistique se transforment directement en oligomères. Deux régimes sont identifiables, un premier, qui s'étale du début de l'expérience

jusqu'à 4h, qui est un régime exponentiel, à la croissance très rapide; puis un second régime, au-delà de 4h, linéaire, où la croissance se fait à une vitesse constante. D'après les variations d'intensité mises en jeu, le phénomène ne semble impliquer qu'une variation approximative de 10 % des oligomères. L'évolution en fonction du temps indique donc que l'équilibre à une température donnée prend un certain temps et que la proportion monomères/oligomères revêt un certain caractère cinétique.

4.1.3 Effet de la force ionique

La force ionique est un paramètre pouvant grandement influencer la cinétique d'agrégation de protéines amyloïdes, ainsi que la morphologie des fibrilles résultantes, et cela soit via le choix des espèces ioniques (NaCl, Na₂HPO₄, NaF, NaBr ...), soit par la concentration en sel²⁶⁻²⁹. Toujours dans l'optique de sonder le caractère amyloïdogénique du peptide AS₇₁₋₈₂, nous avons étudié l'effet de la concentration en NaCl sur la structure de ce dernier (figure 4.6). En procédant de cette manière il est possible de déterminer si les ions présents en conditions physiologiques pourraient avoir une quelconque influence sur l'agrégation de l'AS.

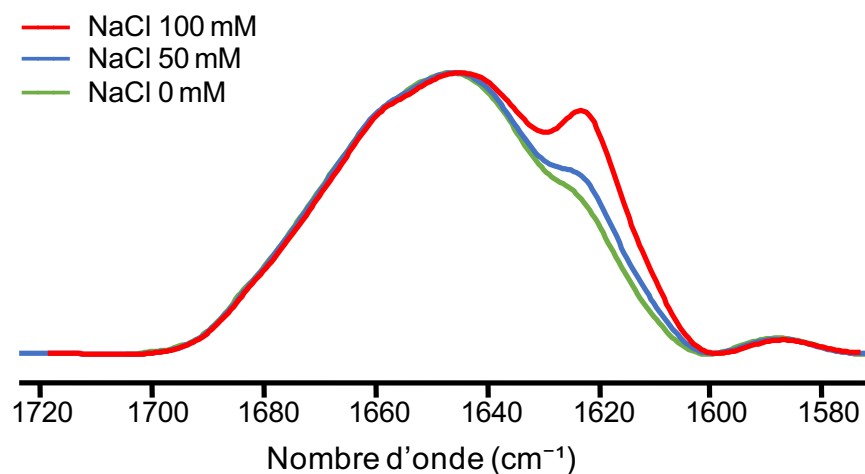


Figure 4.6. Effet de la concentration en NaCl (0, 50 et 100 mM) sur une solution d'AS₇₁₋₈₂ 10 mM à 35° C (tampon phosphate 20 mM, pD 7).

Les ions (Na⁺, Cl⁻) ont pour effet d'augmenter l'intensité de la composante à 1623 cm⁻¹, correspondant ainsi à une augmentation de la proportion d'oligomères (figure 4.6). Cet

effet provient de la compensation des charges portées par AS₇₁₋₈₂ (N-terminal, C-terminal et K₈₀ (lysine)), favorisant ainsi les interactions inter-monomères du fait d'une réduction des répulsions électrostatiques. Plus précisément, deux phénomènes rentrent en jeu pour expliquer les effets de sels. Premièrement, l'effet Debye-Hückel, selon lequel des sels en solutions se dissocient totalement, pour former une paire d'ions, résultant en un effet d'écrantage de charges portées par certains groupes du peptide, par association non spécifique de charges opposées^{27,30}. De cette manière, les forces gouvernant l'auto-association peuvent prédominer. Deuxièmement, l'effet Hofmeister, laisse place à des interactions plus spécifiques, modifiant ainsi les propriétés de l'association protéine/peptide et solvant^{27,31-32}.

4.1.4 Structure des oligomères

Les spectres présentés à la figure 4.6 sont très similaires à ceux présentés à la figure 4.1. De manière à analyser plus précisément ces spectres, nous avons procédé à la dérivée seconde du spectre correspondant à une solution d'AS₇₁₋₈₂ (100 mM NaCl) de la figure 4.6, celle-ci est présentée à la figure 4.7. Des résultats similaires sont obtenus dans les autres conditions aqueuses présentées précédemment.

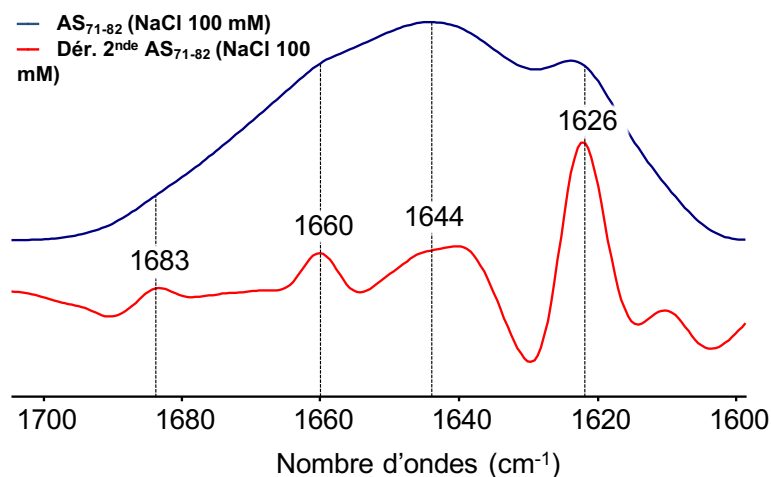


Figure 4.7. Spectre d'une solution d'AS₇₁₋₈₂ 10 mM (100 mM NaCl) à 35° C (tampon phosphate 20 mM, pD 7), et sa dérivée seconde, qui révèle 4 composantes à 1626, 1644, 1660 et 1683 cm⁻¹.

Il est intéressant de voir qu'en fait quatre composantes sont identifiables : 1626, 1644, 1660 et 1683 cm⁻¹. Les trois premiers ont été identifiés plus haut, et correspondent à du

feuillet- β , des structures de pelote statistique et la vibration de la chaîne latérale du résidu glutamine, respectivement. La composante à 1683 cm^{-1} est très faible et difficile à mettre en évidence. Sa présence est intéressante car elle indique que le feuillet- β des oligomères adopte une géométrie anti-parallèle⁹. L'écart entre la composante à bas (1683 cm^{-1}) et à haut (1626 cm^{-1}) nombre d'ondes du feuillet- β provient du couplage de transition dipolaire (TDC). Le TDC est à l'origine de la sensibilité de la bande amide I aux structures secondaires. Il s'agit d'une interaction entre des dipôles oscillants (groupements amide), qui dépend de leur orientation relative et de leur proximité. Dans le cas du feuillet- β antiparallèle, le phénomène de séparation de bande a lieu (*band splitting*) : en plus de dépendre de l'orientation relative et de la distance entre deux dipôles voisins couplés, le TDC est sensible au déphasage relatif entre les vibrations, ce qui donne lieu à une séparation de bande dans le cas de feuillet- β antiparallèle⁹. Le fait que ces oligomères adoptent une structure antiparallèle corrobore des études de modélisation moléculaire (par *replica exchange molecular dynamics*, REMD) prédisant cette même structure pour le peptide AS₇₁₋₈₂, et prédisant que les oligomères s'organisent sous forme de dimères, trimères et tétramères³³⁻³⁴, tel qu'illustrés à la figure 4.8.

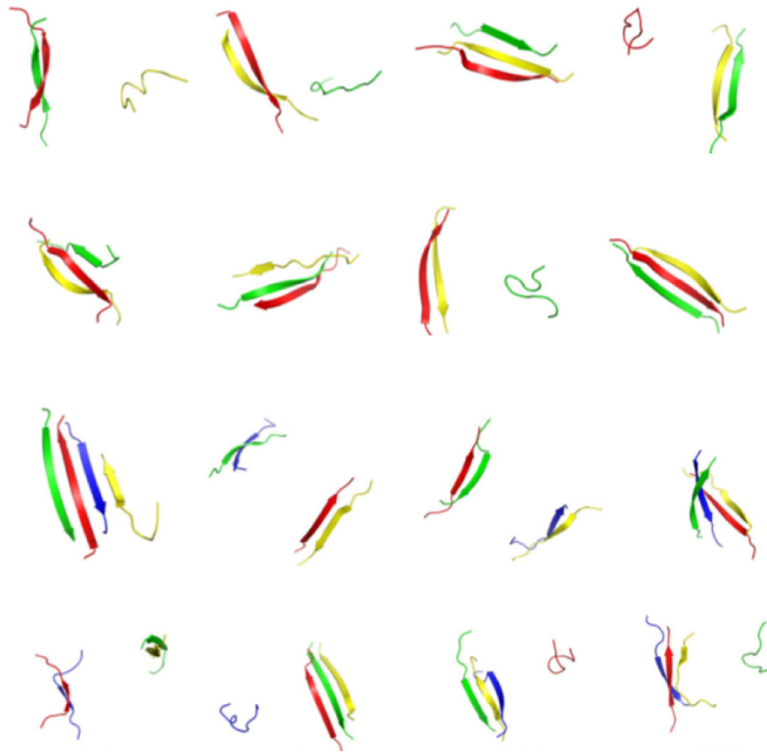


Figure 4.8. Structures oligomériques (dimères, trimères et tétramères) de l'AS₇₁₋₈₂ calculées par REMD. Figure modifiée à partir de Park *et al.*³³

Les tétramères représentent la forme oligomérique mettant le plus de temps à se former, mais également la plus stable, avec une stabilité croissante du dimère au tétramère.

4.2 Conclusions

Réussir à caractériser le peptide AS₇₁₋₈₂ en solution revêt une grande importance avant de pouvoir s'intéresser aux structures que celui-ci adopte lors d'interactions avec des membranes modèles. Cette particularité de l'AS₇₁₋₈₂, d'être soluble dans l'eau, permet d'affirmer que les changements structuraux observés en présence de membranes modèles, et détaillés dans les chapitres suivants, sont bien provoqués par ces interactions. La conformation désordonnée de l'AS₇₁₋₈₂ en solution rappelle celle de sa protéine parent, AS³⁵⁻³⁷. De plus, la plasticité structurale de l'AS₇₁₋₈₂ est un argument supplémentaire en faveur du fait qu'il représente un bon modèle³⁸.

La structure oligomérique en feuillet- β antiparallèle caractérisée en solution ainsi qu'en présence de sels a elle aussi été utilisée pour décrire la structure de l'AS par certains

groupes de recherche³⁹⁻⁴², venant là encore renforcer l'idée qu'AS₇₁₋₈₂ constitue un bon modèle pour appréhender les comportements structuraux et dynamiques de l'AS.

4.3 Références

1. Bochicchio, B.; Tamburro Antonio, M., Polyproline II structure in proteins: Identification by chiroptical spectroscopies, stability, and functions. *Chirality* **2002**, *14*, 782-792.
2. Dukor, R. K.; Keiderling, T. A., Reassessment of the random coil conformation: vibrational CD study of proline oligopeptides and related polypeptides. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1747-1761.
3. Paterlini, M. G.; Freedman, T. B.; Nafie, L. A., Vibrational circular dichroism spectra of three conformationally distinct states and an unordered state of poly(L-lysine) in deuterated aqueous solution. *Biopolymers* **1986**, *25*, 1751-1765.
4. Smith, L. J.; Fiebig, K. M.; Schwalbe, H.; Dobson, C. M., The concept of a random coil: Residual structure in peptides and denatured proteins. *Folding and Design* **1996**, *1*, R95-R106.
5. Shi, Z.; Olson, C. A.; Rose, G. D.; Baldwin, R. L.; Kallenbach, N. R., Polyproline II structure in a sequence of seven alanine residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 9190.
6. Whittington, S. J.; Chellgren, B. W.; Hermann, V. M.; Creamer, T. P., Urea promotes polyproline II helix formation: Implications for protein denatured states. *Biochemistry* **2005**, *44*, 6269-6275.
7. Kentsis, A.; Mezei, M.; Gindin, T.; Osman, R., Unfolded state of polyalanine is a segmented polyproline II helix. *Proteins* **2004**, *55*, 493-501.
8. Kurouski, D.; Kar, K.; Wetzel, R.; Dukor, R. K.; Lednev, I. K.; Nafie, L. A., Levels of supramolecular chirality of polyglutamine aggregates revealed by vibrational circular dichroism. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1638-1643.
9. Barth, A., Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073-1101.
10. Moradi, M.; Babin, V.; Roland, C.; Sagui, C., A classical molecular dynamics investigation of the free energy and structure of short polyproline conformers. *J. Chem. Phys.* **2010**, *133*, 125104.
11. Martial, B.; Lefèvre, T.; Buffeteau, T.; Auger, M., Vibrational circular dichroism reveals supramolecular chirality inversion of α -synuclein peptide assemblies upon interactions with anionic membranes. *ACS Nano* **2019**, *13*, 3232-3242.
12. Dehsorkhi, A.; Castelletto, V.; Hamley, I. W., Self-assembling amphiphilic peptides. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 453-467.
13. Shtilerman, M. D.; Ding, T. T.; Lansbury, P. T., Molecular crowding accelerates fibrillization of α -synuclein: Could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry* **2002**, *41*, 3855-3860.
14. Aggeli, A.; Nyrkova, I. A.; Bell, M.; Harding, R.; Carrick, L.; McLeish, T. C. B.; Semenov, A. N.; Boden, N., Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide β -sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 11857.
15. Baujard-Lamotte, L.; Noinville, S.; Goubard, F.; Marque, P.; Pauthe, E., Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces. *Colloids Surf. B* **2008**, *63*, 129-137.

16. Buell, A. K.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J., The physical chemistry of the amyloid phenomenon: thermodynamics and kinetics of filamentous protein aggregation. *Essays Biochem.* **2014**, *56*, 11-39.
17. Ikenoue, T.; Lee, Y.-H.; Kardos, J.; Yagi, H.; Ikegami, T.; Naiki, H.; Goto, Y., Heat of supersaturation-limited amyloid burst directly monitored by isothermal titration calorimetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 6654-6659.
18. De Simone, A.; Esposito, L.; Pedone, C.; Vitagliano, L., Insights into stability and toxicity of amyloid-like oligomers by replica exchange molecular dynamics analyses. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 1965-1973.
19. Berhanu, W. M.; Hansmann, U. H. E. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Karabencheva-Christova, T., Ed.; Academic Press: 2014; Vol. 96, pp 113-141.
20. Paslawski, W.; Andreasen, M.; Nielsen, S. B.; Lorenzen, N.; Thomsen, K.; Kaspersen, J. D.; Pedersen, J. S.; Otzen, D. E., High stability and cooperative unfolding of α -synuclein oligomers. *Biochemistry* **2014**, *53*, 6252-6263.
21. Arora, A.; Ha, C.; Park, C. B., Insulin amyloid fibrillation at above 100°C: New insights into protein folding under extreme temperatures. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 2429-2436.
22. Amunson, K. E.; Kubelka, J., On the temperature dependence of amide I frequencies of peptides in solution. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 9993-9998.
23. Novo, M.; Freire, S.; Al-Soufi, W., Critical aggregation concentration for the formation of early Amyloid- β (1-42) oligomers. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1783.
24. Clark, A. H.; Judge, F. J.; Richards, J. B.; Stubbs, J. M.; Suggett, A., Electron microscopy of network structures in thermally-induced globular protein gels. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1981**, *17*, 380-392.
25. Casal, H. L.; Köhler, U.; Mantsch, H. H., Structural and conformational changes of β -lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Struc. Mol. Enzymol.* **1988**, *957*, 11-20.
26. Adamcik, J.; Mezzenga, R., Adjustable twisting periodic pitch of amyloid fibrils. *Soft Matter* **2011**, *7*, 5437-5443.
27. 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*, 8478-8490.
28. Sikkink, L. A.; Ramirez-Alvarado, M., Salts enhance both protein stability and amyloid formation of an immunoglobulin light chain. *Biophys. Chem.* **2008**, *135*, 25-31.
29. Zurdo, J.; Guijarro, J. I.; Jiménez, J. L.; Saibil, H. R.; Dobson, C. M., Dependence on solution conditions of aggregation and amyloid formation by an SH3 domain. *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 325-340.
30. Ullner, M.; Woodward, C. E.; Jönsson, B., A Debye-Hückel theory for electrostatic interactions in proteins. *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 2056-2065.
31. Baldwin, R. L., How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2056-2063.
32. Collins, K. D., Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods* **2004**, *34*, 300-311.
33. Park, S.-B.; Yoon, J.-S.; Jang, S.-M.; Lee, K.-H.; Shin, S.-M., Computational study on oligomer formation of fibril-forming peptide of α -synuclein. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, *33*, 848-854.
34. Yoon, J.; Jang, S.; Lee, K.; Shin, S., Dimerization of fibril-forming segments of α -synuclein. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2009**, *30*, 1845-1850.
35. Fauvet, B.; Mbefo, M. K.; Fares, M.-B.; Desobry, C.; Michael, S.; Ardah, M. T.; Tsika, E.; Coune, P.; Prudent, M.; Lion, N., et al., α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15345-15364.

36. Davidson, W. S.; Jonas, A.; Clayton, D. F.; George, J. M., Stabilization of α -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9443-9449.
37. Eliezer, D.; Kutluay, E.; Bussell Jr, R.; Browne, G., Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 1061-1073.
38. Deleersnijder, A.; Gerard, M.; Debyser, Z.; Baekelandt, V., The remarkable conformational plasticity of alpha-synuclein: blessing or curse? *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 368-377.
39. Celej, María S.; Sarroukh, R.; Goormaghtigh, E.; Fidelio, Gerardo D.; Ruyschaert, J.-M.; Raussens, V., Toxic prefibrillar α -synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel β -sheet structure. *Biochem. J.* **2012**, *443*, 719-726.
40. Klucken, J.; Outeiro, T. F.; Nguyen, P.; McLean, P. J.; Hyman, B. T., Detection of novel intracellular α -synuclein oligomeric species by fluorescence lifetime imaging. *FASEB J.* **2006**, *20*, 2050-2057.
41. Roberts, H. L.; Brown, D. R., Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α -synuclein. *Biomolecules* **2015**, *5*, 282-305.
42. Gallea, J. I.; Celej, M. S., Structural insights into amyloid oligomers of the Parkinson disease-related protein α -synuclein. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 26733-26742.

Chapitre 5 : Vibrational Circular Dichroism Reveals Supramolecular Chirality Inversion of α -Synuclein Peptide Assemblies upon Interactions with Anionic Membranes

(2019) *ACS Nano*, **13**, 3232-3242

Retranscrit avec permission, Copyright © 2019, American Chemical Society

Benjamin Martial¹, Thierry Lefèvre¹, Thierry Buffeteau² and Michèle Auger¹

¹ Department of Chemistry, Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), Centre québécois sur les matériaux fonctionnels (CQMF), Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada

² Université Bordeaux, Institut des Sciences Moléculaires, CNRS UMR 5255, 33405 Talence, France

5.1 Résumé

Le dichroïsme circulaire vibrationnel, avec la microscopie électronique, a révélé ici qu'AS₇₁₋₈₂ forme, en présence de vésicules anioniques, des structures fibrillaires de morphologie hélicoïdale nanoscopique. Le pas d'hélice des structures formées est gouverné par la concentration en AS₇₁₋₈₂ et le rapport peptide:lipide (P:L), et présente un caractère dynamique. À faibles concentrations et P:L, les structures adoptent une hélicité de pas gauche, quand à plus hautes concentrations et P:L, une hélicité de pas droit est favorisée. Des espèces fibrillaires avec deux chiralités ont été observées dans le cas de la maladie de Parkinson; les résultats présentés ici apparaissent donc bénéfiques pour mieux comprendre l'agrégation de l'AS et sa fibrillation *in vivo*. D'un point de vue diagnostique ou thérapeutique, il semble essentiel que les futures sondes, inhibiteurs et autres *breakers* visent des assemblages présentant des chiralité et morphologie spécifiques, notamment puisqu'elles sont susceptibles de changer avec l'avancement de la maladie.

5.2 Abstract

Parkinson's disease is an incurable neurodegenerative disorder caused by the aggregation of α -synuclein (AS). This amyloid protein contains a 12-residue-long segment, AS₇₁₋₈₂, that triggers AS pathological aggregation. This peptide is then essential to better understand the polymorphism and the dynamics of formation of AS fibrillar structures. In this work, vibrational circular dichroism showed that AS₇₁₋₈₂ is random coil in solution and forms parallel β -sheet fibrillar aggregates in the presence of anionic vesicles. Vibrational circular dichroism, with transmission electronic microscopy, revealed that the fibrillar structures exhibit a nanoscale tape-like morphology with a preferential supramolecular helicity. Whereas the structure handedness of some other amyloid peptides has been shown to be driven by pH, that of AS₇₁₋₈₂ is controlled by peptide concentration and peptide-to-lipid (P:L) molar ratio. At low concentrations and low P:L molar ratios, AS₇₁₋₈₂ assemblies have a left-twisted handedness, while at high concentrations and high P:L ratios, a right-twisted handedness is adopted. Left-twisted assemblies interconvert into right-twisted ones with time, suggesting a maturation of the amyloid structures. Since fibril species with two chiralities have also been reported previously in Parkinson's disease Lewy bodies and fibrils, the present results seem relevant to better understand AS amyloid assembly and fibrillization *in vivo*. From a diagnosis or therapeutic point of view, it becomes essential that future fibril probes, inhibitors or breakers target pathological assemblies with specific chirality and morphology, in particular because they may change with the stage of the disease.

5.3 Introduction

α -Synuclein is a protein mostly located in the dopaminergic neuronal network, at the presynaptic termini.¹ Over time, and for unclear reasons, AS aggregates and forms amyloid fibrils, which leads to the appearance of *Lewy bodies* in the dopaminergic neuronal network of the *substantia nigra*. This observation is a hallmark of Parkinson's disease (PD),²⁻³ a disorder affecting over ten million people in the world, which makes it the second most widespread neurodegenerative disease after Alzheimer's disease.

Amyloid disorders are characterized by the abnormal misfolding of a protein that undergoes a pathological aggregation, eventually causing cellular death.⁴ Amyloid

aggregation is a multistep process, where monomers associate into oligomers that form mature fibrils, most of the time composed of several protofibrils. They are composed of a cross β -sheet core, the β -strands running perpendicular to the fibril long axis, with an unbranched morphology. Backbone amide carbonyl and amine groups are hydrogen-bonded, and interdigitation of sidechains stabilize the overall structure by maintaining the protofibrils together, thus creating a dense and highly stable packing. The causes for this amyloid cascade are multiple and unclear.

Although PD has been described as soon as 1817⁵ and tremendously investigated since then, the current medication only treats symptoms but does not slow down the progression of the disease. The lack of reliable medication arises mainly from the failure of current cures to pass the clinical trial stage.⁶ An alarming aspect of PD is the tardiness of its diagnostic: in most cases it is established after an irreversible loss of 60%, or more, of dopaminergic neurons in the *substantia nigra*.⁷ The more recent and more promising research avenue regards the identification of biomarkers that would diagnose the onset of PD.⁷

Understanding and gaining insights into the pathogenic features of protein misfolding is then of primary importance for the sake of therapeutic development. Amongst the challenges to overcome lies fibril polymorphism whose biological relevance has recently been discussed.⁸ Polymorphism influences in particular the development of amyloid diseases. It is thus crucial to identify these polymorphs, obtain a molecular description of their structure and understand the variables that control their formation. Determining the most neurotoxic polymorphs could be a step forward to the research and design of aggregation inhibitors. Since such molecules often locate in specific fibrillar cavities,⁹ the knowledge of fibril molecular architecture is essential. Similarly, identifying the different maturation steps of aggregation would allow a better comprehension of the whole phenomenon.

In its physiological state, AS has been described as alternating between a disordered form in neurons' cytoplasm¹⁰⁻¹² and a membrane-bound helix-rich form.¹³⁻¹⁵ The helical fold has been suggested to stabilize the protein and prevent aggregation.¹⁶⁻¹⁷ However, this helical state has also been proposed as being an intermediate in the aggregation process.¹⁸⁻²¹

Over the 140-residue-long sequence of AS, three different parts are distinguished: the N-terminal region (1-60), the non- β -amyloid component (NAC, 61-95) and the C-terminal region (96-140). The latter remains disordered in the membrane-bound form of the protein¹⁵ and is not part of the β -sheet core of the fibrils.²² However, the negative charges of the C-terminal region impact AS fibril morphology and its seeding kinetics.²³ The N-terminal region contains a highly-conserved seven-time-repeated sequence involved in membrane-binding *via* the formation of amphiphilic α -helices.²⁴ The NAC is a highly amyloidogenic sequence characterized by 17 hydrophobic residues. It was first identified as a component of Alzheimer's disease proteinaceous inclusions, along with A β peptides,²⁵ but since then revoked.²⁶

This 35-residue-long segment is thought to be of great importance regarding AS pathological aggregation and strength of the binding to membranes.¹⁵ At the center of the NAC, a sequence of 12 amino acids (VTGVTAVAQKTV), thereafter called α -synuclein 71-82 (AS₇₁₋₈₂), triggers AS aggregation.²⁷⁻²⁸ A deletion within this sequence inhibits aggregation, while a substitution of an uncharged residue for a charged one makes AS less prone to aggregation. Moreover, β -synuclein, which lacks this sequence, has a reduced ability to aggregate.²⁷ It has even been shown to act as a natural inhibitor.²⁹

These characteristics make AS₇₁₋₈₂ a very interesting peptide to study to apprehend the role this sequence may have during AS aggregation. It is also thought to be able to mimic AS behavior.³⁰ More generally, small fragments of amyloid proteins are often used in structural studies.³¹ They may help designing aggregation inhibitors.³²⁻³⁴

While the aggregation of AS can occur both in solution and in the presence of model membranes, interactions with lipids are thought to be a general driver of pathological oligomerization and aggregation of amyloid peptides and proteins.³⁵⁻³⁶ Cell membrane surfaces could act as a fibrillization template, favoring nucleation and participating in the fibrillization cascade of AS.³⁶ For this reason, inhibitors can be designed to compete with AS for membrane binding.³⁷

We previously reported that anionic membranes induce a β -sheet-only structure for AS₇₁₋₈₂ as deduced from infrared spectroscopy (IR) and electronic circular dichroism.³⁰ The major drawback of these techniques is that they give information regarding secondary structure and generally do not probe the overall supramolecular organization. Moreover, this work seemed to indicate that no major change in the structure of AS₇₁₋₈₂ took place when varying the peptide-to-lipid (P:L) molar ratio or the peptide concentration. Concentration and molecular crowding are known to favor AS fibrillization,³⁸ while P:L has been shown to impact the fibrillization of AS.³⁶

The present work focuses on the effect of these parameters on the structure of AS₇₁₋₈₂ fibrils formed in the presence of lipid vesicles using vibrational circular dichroism (VCD). Application of VCD to structural study of amyloid polypeptides while interacting with membranes is uncommon, although it has already been used for antimicrobial peptides.³⁹⁻⁴¹ VCD allowed revealing the supramolecular organization of AS₇₁₋₈₂ fibrils, especially their long-range chiral structure. It proved its capability to distinguish fibrillar structures corresponding to different levels of fibrillar maturation. The results demonstrated that time, in addition to peptide concentration and P:L ratio, regulates AS₇₁₋₈₂ fibrils supramolecular chirality.

5.4 Results and Discussion

The last decade has witnessed a rise in the use of VCD to study amyloid peptides and proteins, following a pioneering work by Ma *et al.* who proved the capabilities of this technique to provide original details regarding such biomolecules.⁴² VCD allows probing the dynamics and structural characteristics of fibrillogenesis thanks to particular spectral features and an enhanced VCD signal, two orders of magnitude more intense than for usual secondary structures. When coupled to IR spectroscopy, VCD provides complementary structural information and a precise molecular and supramolecular characterization of amyloid structures.

5.4.1 AS₇₁₋₈₂ Structure in Solution and in the Presence of DMPG

Figure 5.1 displays the IR and VCD spectra in the amide I' region (1700-1600 cm⁻¹) of a 2.0% AS₇₁₋₈₂ (w/v) solution and a AS₇₁₋₈₂-DMPG mixture at a P:L ratio of 1:10 (2.0%

AS₇₁₋₈₂ w/v). The amide I' band originates mostly from the peptide bond C=O stretching vibration and is sensitive to polypeptide secondary structure. The IR amide I' band maximum at 1646 cm⁻¹ for AS₇₁₋₈₂ in solution is indicative of an essentially disordered structure. Such spectral patterns are commonly interpreted as representative of unfolded polypeptides. Absorbance IR actually cannot discriminate a truly disordered polypeptide chain from an unfolded one (random coil). The latter conformation is recognized to contain 3₁-helix structures (polyproline II (PPII) helix) that are considered as a basic secondary structure element of the denatured state ensemble⁴³⁻⁴⁵ and that cannot be evidenced from IR data.

VCD can discriminate a random coil conformation from a disordered one.⁴⁶ The VCD pattern observed in Figure 5.1, with negative and positive peaks at 1640 cm⁻¹ and 1665 cm⁻¹, respectively, is characteristic of the random coil structure containing 3₁-helices. In the case of totally disordered structures, dihedral angles have a statistically equal probability of occurrence, so that the VCD signal would be null in such a case.⁴⁷ The present spectra show that AS₇₁₋₈₂ contains PPII structures in solution, although truly disordered amino acids may be present. As previously observed,³⁰ the IR spectrum shows a shoulder near 1626 cm⁻¹ while the VCD spectrum exhibits a negative peak near 1618 cm⁻¹. These minor components may reflect the presence of a small proportion of β-sheets, which probably correspond to small oligomeric species.³⁰

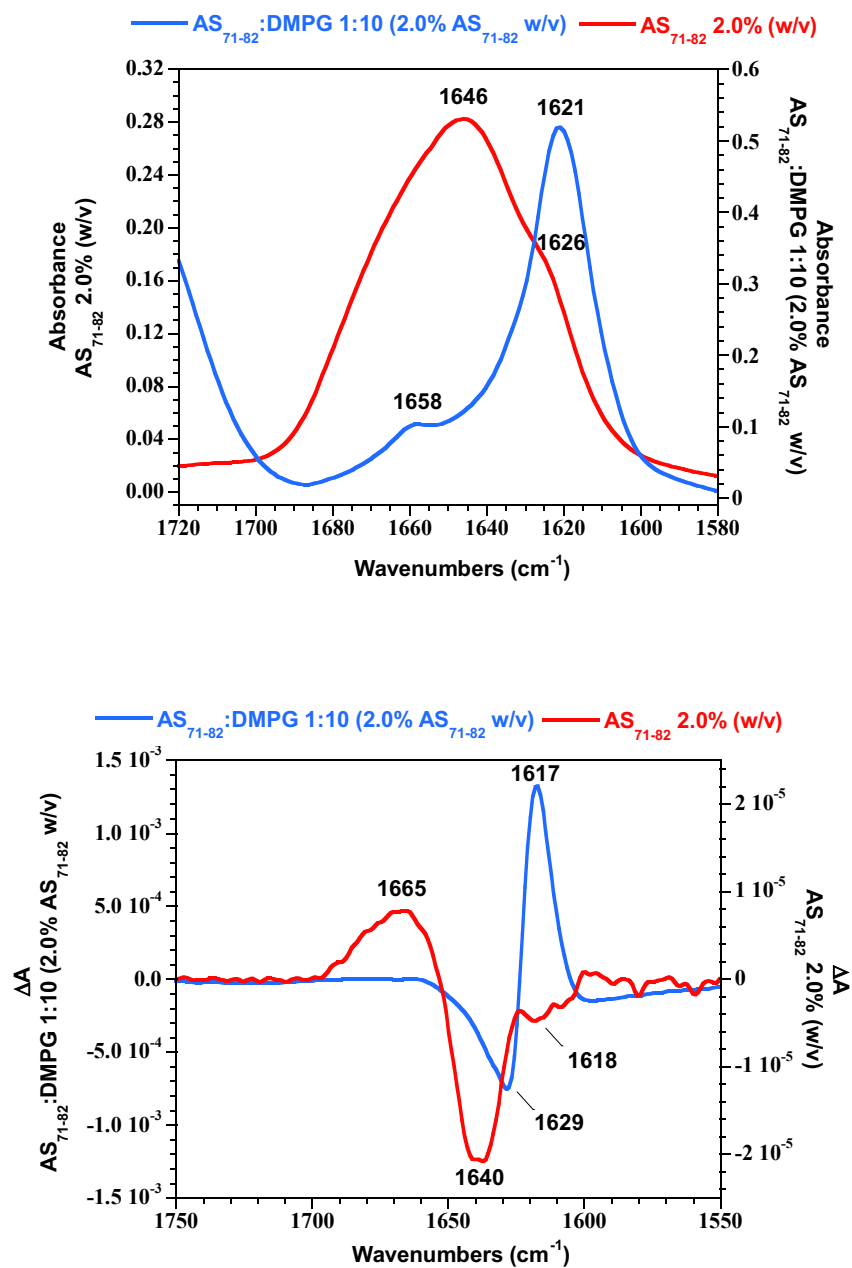


Figure 5.1. IR (up) and VCD (down) spectra of AS₇₁₋₈₂ in phosphate buffer at a 2.0% w/v concentration (red spectra) and AS₇₁₋₈₂:DMPG 1:10 (2.0% w/v) (blue spectra).

The shape of the IR amide I' band of AS₇₁₋₈₂ in the presence of DMPG membranes is drastically different from that observed in solution, with a strong component at 1621 cm⁻¹ and a smaller one at 1658 cm⁻¹ (Figure 5.1). The former component is typical of intermolecular β -sheets resulting from self-aggregation. The β -sheets are parallel as no

component is seen in the 1680-1685-cm⁻¹ range (which would then correspond to antiparallel β -sheets).⁴⁸ It is noteworthy that both parallel and antiparallel β -sheet structures can be adopted by the parent protein, depending on the experimental conditions.⁴⁹ Our assignment is also consistent with the fact that the 1621 cm⁻¹ component is narrow and in a wavenumber range usually associated with amyloids.^{42,50-54} The component at 1658 cm⁻¹ most probably arises from the carboxylate vibration of the glutamine residue sidechain (Gln79).⁴⁸ Consequently, the secondary structure of AS₇₁₋₈₂ seems fully composed of β -sheets.

The conversion of the random coil structure of AS₇₁₋₈₂ observed in solution to the β -sheet structure observed in the presence of PG membranes has been reported elsewhere.³⁰ β -Sheet aggregates are not observed in the presence of neutral membranes made of PC.³⁰ Then, the negative charge carried by DMPG probably interacts with the positive charge of Lys80, thereby triggering intermolecular β -sheet fibrillization. Electrostatic attraction between DMPG and AS₇₁₋₈₂ probably enhances the local peptide concentration at the membrane surface and/or perturbs the peptide native conformation, in turn promoting aggregation. It seems that, due to their surface negative charges, the lipid membranes offer a catalytic surface for fibrillization, which is consistent with the fact that negatively-charged lipids may favor AS fibrillization.⁵⁵ Moreover, lysine residues have proved to be of great importance for the fibrillization process, notably for the proteins A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ where a substitution of lysine residues greatly impacts aggregation and toxicity.⁵⁶

Similarly to the IR data, the VCD spectrum of AS₇₁₋₈₂ in the presence of DMPG multilamellar vesicles (MLVs) strongly differs from that observed in solution. It displays a negative band at 1629 cm⁻¹ and an intense positive band at 1617 cm⁻¹, which is typical of a β -sheet-rich and highly ordered structure. The shape of the signal, noted (- +), and its intensity orders of magnitude higher than usual secondary structures, indicate that the peptide is in an aggregated fibrillar form.⁴² The enhanced intensity is thought to originate from the long-range intersheet coupling along the amyloid fibril axis. The coupling intensity depends on the distance between β -sheet layers, the number of layers, the length of the β -strands and their spatial arrangements.⁵⁷ The signal is slightly asymmetric, which is probably due to intrinsic magnetic moments of certain residues or a possible irregularity in the fibrillar

structure.⁵⁷ Moreover, as predicted by theoretical calculations⁵⁸ and as confirmed by experiments,⁵⁹ the (- +) couplet pattern corresponds to a supramolecular structure with a right-twisted helical handedness along the long axis of the structure.

Figure 5.2 shows electron micrographs at several magnifications of AS₇₁₋₈₂-DMPG solutions at a P:L ratio of 1:10 and three peptide concentrations. Corresponding VCD spectra can be found in Figure 5.3. These images show in each condition the presence of long ribbon-like fibrils with a periodic twist. The dimensions of the structures are ~ 40 nm in width and hundreds-of-nanometers to micrometer-long. The approximate period is comprised between 200 and 300 nm. The twisted nature of the fibrils formed by AS₇₁₋₈₂ is consistent with the helicity probed by VCD. Unfortunately, TEM does not allow an unambiguous determination of the handedness of the fibril twist. It is therefore difficult to establish a relationship between the supramolecular chirality probed by VCD and that observed at the nanoscale by TEM (see a more detailed discussion below).

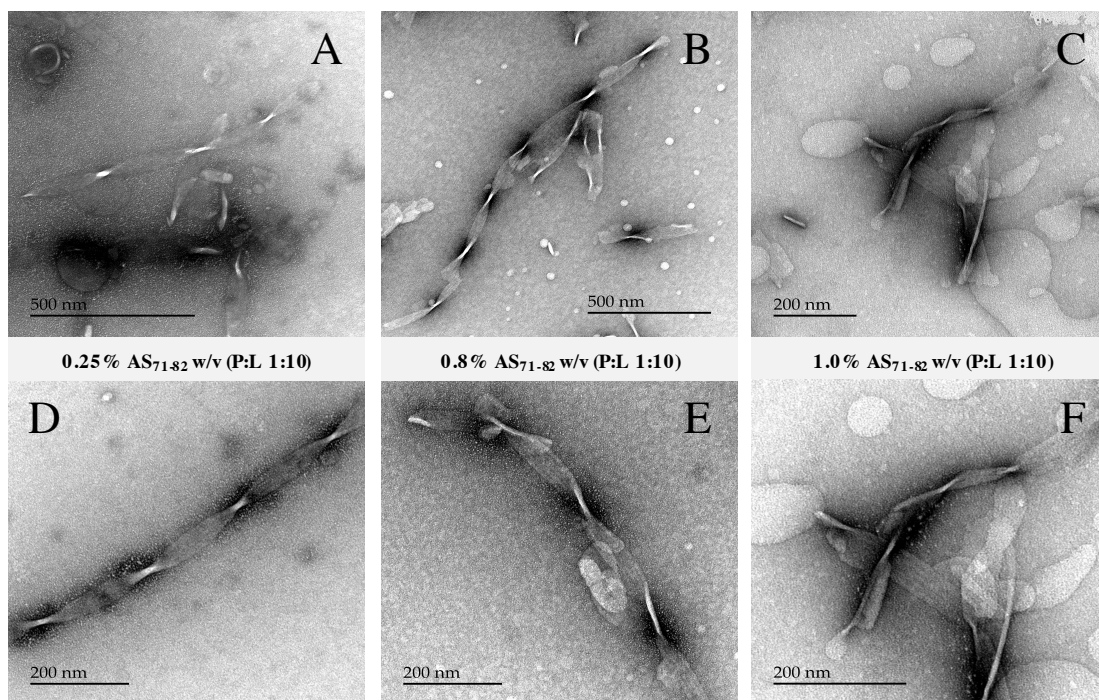


Figure 5.2. Electron micrographs of AS₇₁₋₈₂ fibrils formed in presence of DMPG membranes, at a peptide concentration of 0.25 % w/v (A and D), 0.8 % w/v (B and E) and 1.0 % w/v (C and F), at magnifications of 15k (B), 20k (A), 25k (C), 30k (D and E) and 40k (F) and a P:L ratio of 1:10.

Upon variations in peptide concentration (Figure S5.9), no change is observed in the shape of the IR spectra. Thus, AS₇₁₋₈₂ remains in a β -sheet conformation in all circumstances. A slight redshift ($\sim 1 \text{ cm}^{-1}$) of the component at $\sim 1621 \text{ cm}^{-1}$ is measured as the concentration and P:L ratio decrease. This shift most probably reflects a slight rearrangement of the β -sheets or a modification of their local environment, and does not correspond to a modification of the peptide secondary structure. Therefore, conventional IR data show that the secondary structure of AS₇₁₋₈₂ is not altered when the concentration or the P:L ratio varies.

5.4.2 Supramolecular Structures of AS₇₁₋₈₂ in the Presence of DMPG

The VCD spectra of AS₇₁₋₈₂ recorded as function of peptide concentration (from 0.25% to 2.0% w/v) at a constant P:L ratio of 1:10 are shown in Figure 5.3. From the Beer-Lambert's law, identical normalized absorbances $\Delta A/A$ would have been expected when the peptide concentration varies. However, the intensity of the 1.0% sample is more than twice lower than the 2.0% one, with $\Delta A/A$ values of $2.00 \cdot 10^{-3}$ and $4.72 \cdot 10^{-3}$, respectively. The VCD intensity is thus not linearly correlated with the peptide concentration. As discussed below, this observation indicates that other parameters have to be considered to describe the intensity, including the helical pitch length and the fibril thickness.

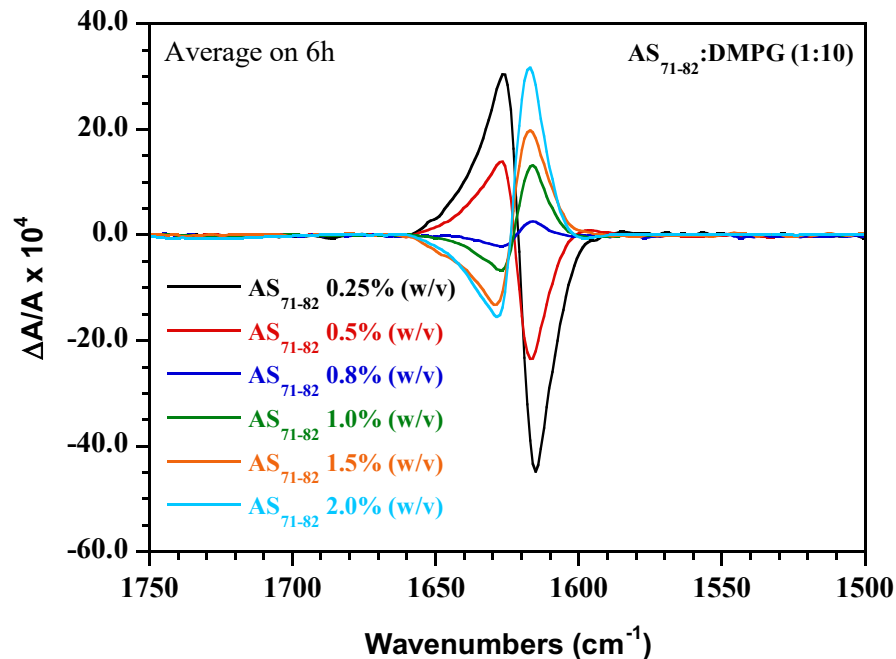


Figure 5.3. Normalized VCD spectra at various AS₇₁₋₈₂ concentrations (0.25%, 0.5%, 0.8%, 1.0%, 1.5% and 2.0%) for a constant P:L ratio of 1:10. The spectra correspond to the average of the first 6 hours of acquisition.

Even more surprising are the signals and intensities obtained with the 0.25% and 0.5% samples. When compared to the 1.0% and 2.0% spectra, those corresponding to the lower concentration samples exhibit a reversed signal with a (+ -) couplet. This corresponds to a supramolecular left handedness of the fibrillar structures. One can also observe that the normalized intensity of the 0.25% sample is twice stronger than that of the 0.5% sample, which was also unexpected.

A comparison between Figure 5.2 and Figure 5.3 shows that whatever the supramolecular chirality direction observed by VCD, the morphology of the fibrils is helical. Unfortunately, the handedness of the fibrils cannot be assessed from TEM microscopy. Based on the literature, the handedness deduced from VCD does not attest of the chirality of the fibril formed since the handedness of amyloid structures determined by microscopy (AFM, SEM) may differ from VCD.⁵¹ This is due to the fact that VCD and microscopy imaging probe helicity/chirality at different length scales. For instance, protofibrils often assemble into fibrils, so that the handedness of the former filaments is not necessarily a testimony of the handedness of the higher-level assemblies.

The investigation of several amyloid peptides show to date that (+ -) couplet patterns (supramolecular left-twist) correspond to left-twisted fibrils and that (- +) couplet patterns (supramolecular right-twist) correspond to flat tape-like fibrils.⁵¹ The fibrils formed by AS₇₁₋₈₂ are always helical, so that it seems that this amyloid peptide follows a different rule of assembly.

Similar effects as those observed as a function of AS₇₁₋₈₂ concentration also take place with variations of the P:L ratio, as displayed in Figure 5.4. At the lowest P:L ratio investigated (1:20) the signal adopts a (+ -) couplet (left-twisted fibrillar structure). On the opposite, at a P:L ratio of 1:10, the signal pattern is a (- +) couplet, corresponding to right-twisted fibrillar structures.

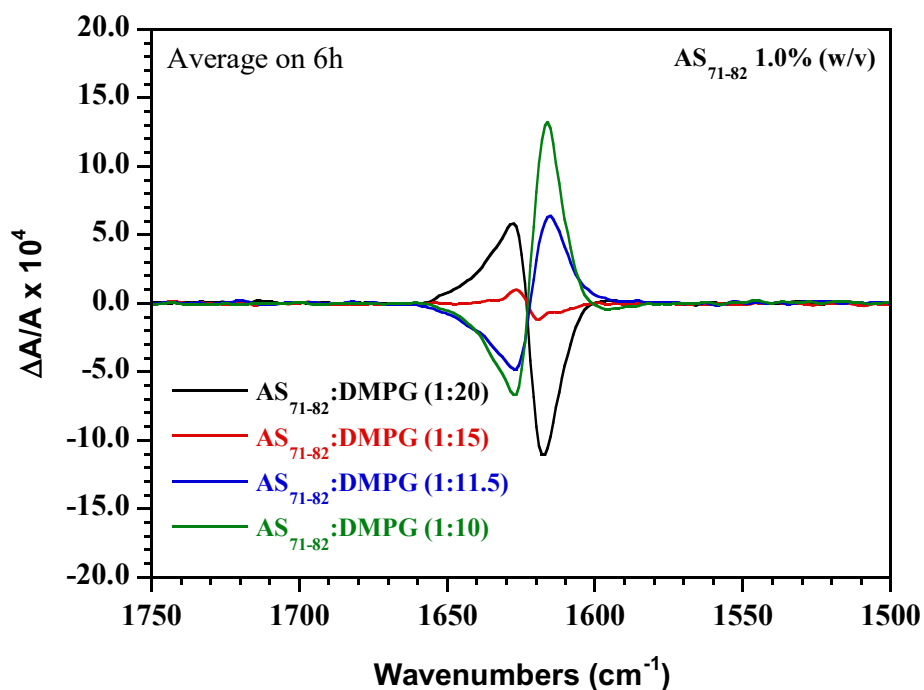


Figure 5.4. Normalized VCD spectra at various P:L (1:20, 1:15, 1:11.5 and 1:10) for a constant AS₇₁₋₈₂ concentration of 1.0% w/v. The spectra correspond to the average of the first 6 hours of acquisition.

The present structural behavior of AS₇₁₋₈₂ is reminiscent of its parent protein. AS, indeed, displays polymorphism like many amyloid peptides and proteins. Fibrils formed by AS can be twisted, with both right- or left-handedness, or tape-like flat, depending on incubation conditions.⁶⁰⁻⁶² Left- and right-twisted AS fibrils can co-form in the exact same

incubation conditions.⁶⁰ β -Amyloid fibrils also exhibit polymorphism,⁶³⁻⁶⁴ and seven polymorphs have been identified for its arctic mutant.⁶⁵ Our data suggest that the peptide AS₇₁₋₈₂ possesses characteristics similar to AS. The role helicity plays in the whole amyloidogenic process is not fully understood yet, but amyloid protofibrils and fibrils most certainly fold in a helical manner to minimize electrostatic and hydrophobic energies, to seclude local charges carried on β -strands (entropic requirements) or for steric hindrance reasons.

Each AS₇₁₋₈₂ β -strand carries three charges at physiological pH: the NH₃⁺ positive charge of Lys80, as well as the positive and negative charges of the N-terminal and C-terminal domains, respectively. Given the absence of disordered component on the IR spectra of fibrils, it seems that all residues are in a β -sheet structure. The spectra further show that AS₇₁₋₈₂ adopts an in-register parallel β -sheet structure. This structure would explain the necessity for the fibrils to adopt a twist from electrostatic arguments since in the case of in-register parallel β -sheets, the charges of each β -strand would face one another along the (proto-)fibril long axis if there was no twist, which would not be favored due to electrostatic self-repulsion. Furthermore, the initial left-handedness of the AS₇₁₋₈₂ fibrillar structures may be partly favored by the L-amino acids natural chirality, inducing a left-twist along the β -strand axis, eventually propagating to the whole structure. However, other factors may contribute to the initial structural organization.

5.4.3 The Conditions of Fibrillar Structure Formation

To monitor the variations of VCD couplet intensity of the twisted fibers, we measured the amplitude of the signal couplet using the factor g defined as:

$$g = \frac{\Delta A_{1617} - \Delta A_{1629}}{A} \quad (4.1)$$

where ΔA_{1617} is the VCD signal at 1617 cm⁻¹, ΔA_{1629} the VCD signal at 1629 cm⁻¹, and A the absorbance band height at 1621 cm⁻¹. According to this definition, the signal amplitude g is positive for right-twisted fibrillar structures, negative for left-twisted ones.

Figure 5.5 shows the VCD amplitude g of AS₇₁₋₈₂-DMPG aqueous solutions as a function of peptide concentration at a constant P:L ratio of 1:10 (upper panel), and as a function of P:L at a constant AS₇₁₋₈₂ concentration of 1.0% (w/v) (lower panel). For both these variables, two regimes are identifiable: (i) a regime at high concentrations and high P:L ratio (green) corresponding to right-twisted fibrillar structures ((- +) couplet, $g > 0$), with a signal that increases over time (see below), and (ii) a low concentration and low P:L ratio regime (red) with signals corresponding to left-twisted fibrillar structures ((+ -) couplet, $g < 0$), whose intensities decrease over time (see below). These data can be closely approximated by a logarithmic function, which indicates that a plateau would be reached at high concentrations and high P:L ratios. Moreover, both curve-fitting functions have a close value of the log coefficient (0.01405 for AS₇₁₋₈₂ concentration variations *versus* 0.01208 for P:L variations). The lower steepness of the curve slope in the green regimes with respect to the red ones shows that the spectra corresponding to the (+ -) couplet (left-twisted) have a higher amplitude than the (- +) couplet (right-twisted).

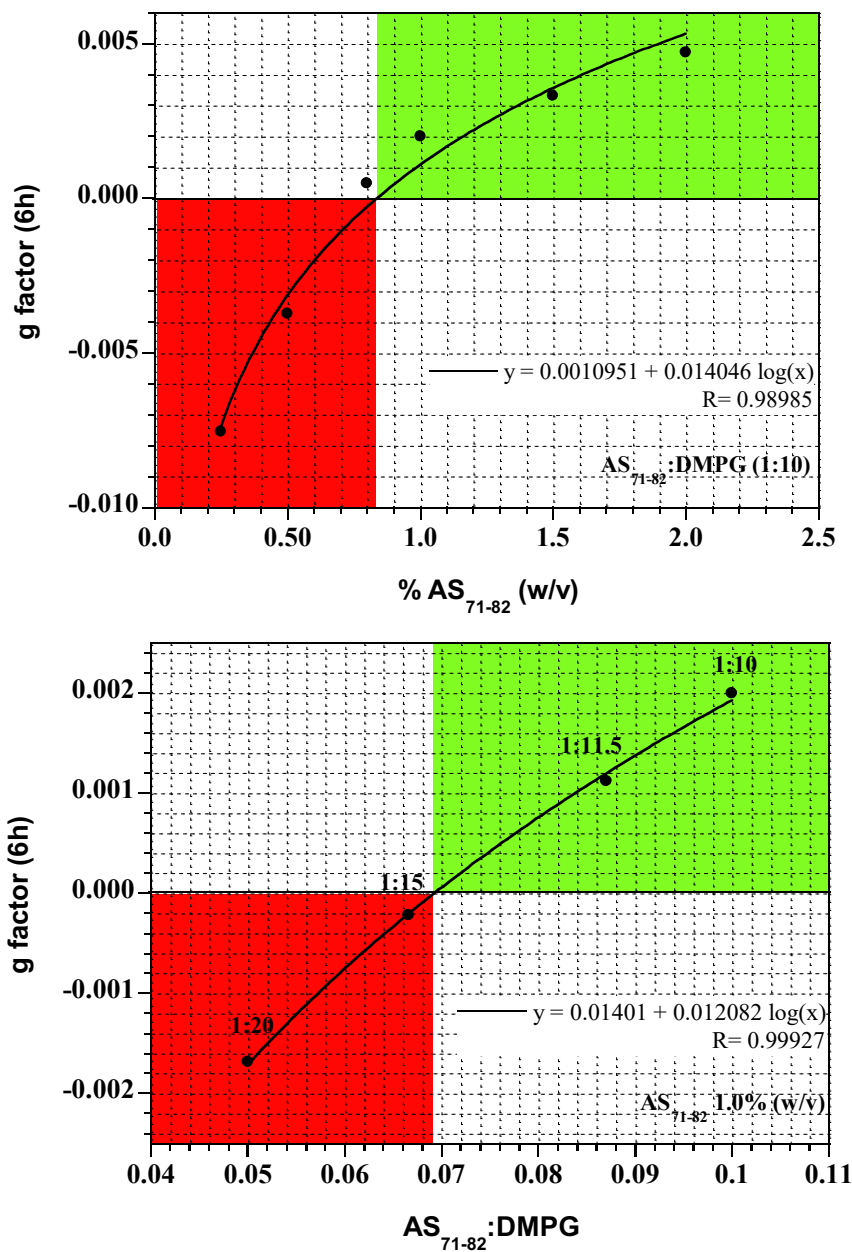


Figure 5.5. Plots of the normalized VCD couplet amplitude g ($g = (\Delta A_{1617} - \Delta A_{1629})/A$) of AS₇₁₋₈₂-DMPG aqueous solutions: (i) as a function of peptide concentration at a constant P:L ratio of 1:10 (upper panel) and (ii) as a function of P:L ratio (1:20, 1:15, 1:11.5 and 1:10), at a constant AS₇₁₋₈₂ concentration of 1.0% w/v (lower panel). Each point corresponds to the signal averaged over the first 6 hours of acquisition. The red and green areas correspond to left- and right-twisted assemblies whose VCD intensities decrease and increase, respectively. The equations correspond to the logarithmic curve-fitting of the data points.

To date, previous changes in supramolecular chirality of amyloid fibril organizations have been induced by a pH change. Effects of pH have been reported for the amyloid peptides transthyretin TTR (105-115), HET-s (218-289), apo- α -lactalbumin, lysozyme and insulin.⁵¹

A recent study even proved the ability of the peptide HET-s (218-289) mature fibrils to reverse their supramolecular chirality upon a pH elevation due to changes in the sidechains protonation state.⁵⁹ These studies underline the flexibility in morphology of amyloid fibrils. They show that the morphology adopted during fibrillization depends on physical and chemical conditions and that it is not an intrinsic property of the polypeptide amino acid sequence.

In the case of AS₇₁₋₈₂, the change in supramolecular chirality has not been induced by a pH change. The formation of left-twisted species being promoted at low AS₇₁₋₈₂ concentrations and low P:L ratios, these observations suggest that left-twisted species are promoted by low local confinement (low molecular crowding) and lower global lipid-to-peptide electrostatic charge ratio (or total membrane charge per peptide molecule). However, the influence of electrostatic charge may be put into question since the chirality changes with a variation of concentration only, the P:L ratio remaining constant. As a matter of fact, when AS₇₁₋₈₂ concentration increases, the partial volume occupied by the vesicles increases, which may facilitate contacts between peptides at the membrane surface. Thus, molecular crowding may be the main parameter controlling the supramolecular chirality of AS₇₁₋₈₂ structures. Moreover, it has to be recalled that the oligomeric state of AS₇₁₋₈₂ in solution varies with concentration.³⁰ Then, one cannot exclude that that association property of AS₇₁₋₈₂ impacts its fibrillization process in the presence of membranes as well as the final structure formed.

5.4.4 Time Dependence of the Fibrillar Structures

As mentioned above, the VCD signals vary in time in all the conditions used. The solutions corresponding to the red regimes of Figure 5.5 display VCD amplitudes that decrease over time. On the other hand, the green regimes correspond to solutions for which the signal increases over time. Then, in certain conditions, it is possible to observe specific chirality inversion phenomena.

Figure 5.6 displays the VCD spectra of AS₇₁₋₈₂ at 0.8% w/v (P:L of 1:10) as a function of time, which corresponds to the junction point between the two regimes identified in Figure 5.5 ($g = 0$). The signal is not higher than the noise (virtually null) at the beginning and increases over time to form fibrillar structures with a right-twisted morphology ((- +)

couplet). It is noteworthy that AS₇₁₋₈₂ is always in a β -sheet structure during the whole experiment since the IR spectra remain unchanged with time (data not shown). The first spectra recorded then correspond to a mixture, probably in equal proportions, of left-twisted and right-twisted species whose signals compensate. Over time, the left-handed structures convert into right-handed ones. This result suggests a two-state interconversion of the left-twisted assemblies into right-twisted ones, the latter form being the most thermodynamically stable.

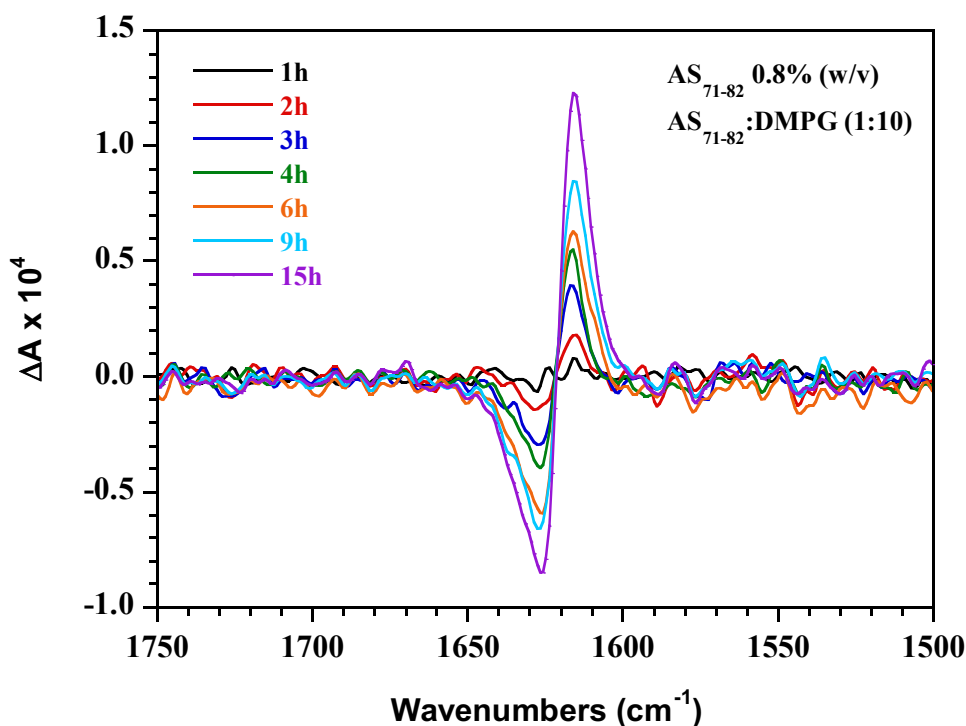


Figure 5.6. VCD spectra of AS₇₁₋₈₂-DMPG aqueous solution at a P:L ratio of 1:10 and a AS₇₁₋₈₂ concentration of 0.8% w/v over a 15-hour time period.

Figure 5.7 displays the VCD spectra of the equivalent experiment, but in P:L conditions corresponding to the junction point between the two regimes identified in Figure 5.5 (P:L of 1:15 and 1.0% AS₇₁₋₈₂ (w/v)). One can observe the reversal of the supramolecular chirality of the fibrillar structures as a function of time, going from a majority of left-handed twisted structures to right-handed ones. The phenomena observed at different P:L ratios are thus very similar to those observed at various peptide concentrations (and a constant P:L ratio).

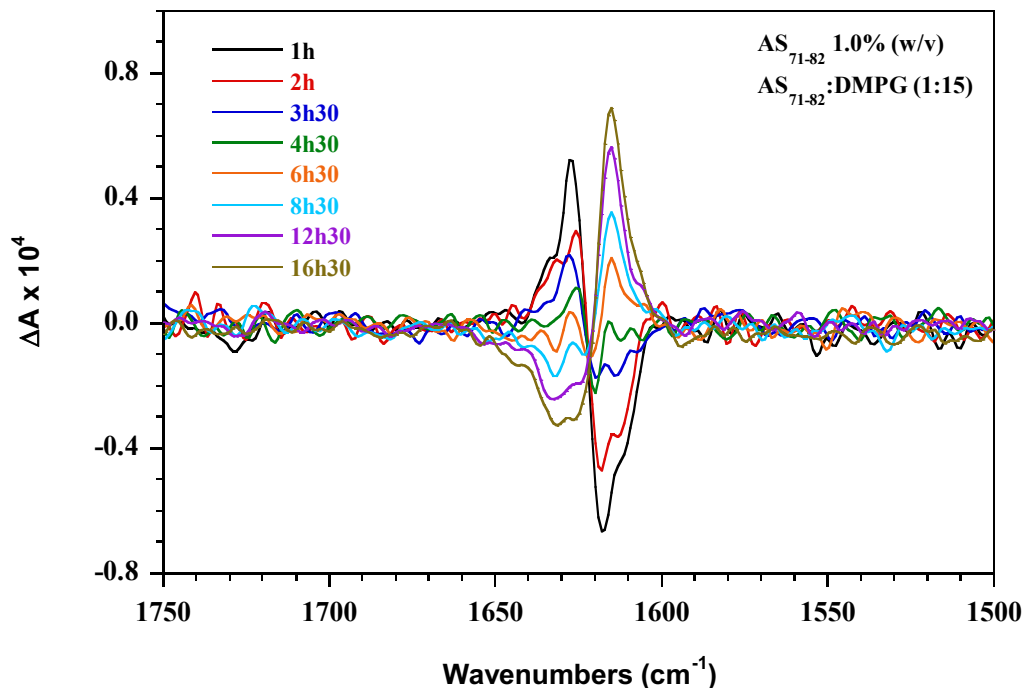


Figure 5.7. VCD spectra of AS₇₁₋₈₂-DMPG aqueous solution at a P:L ratio of 1:15 and 1.0% AS₇₁₋₈₂ w/v over a 16.5-hour time period.

The present data show that with aging left-twisted assemblies turn into right-twisted ones. The structures obtained at low concentrations and low P:L ratio (left-handed) thus represent the kinetically-favored form, while the ones obtained at higher concentrations (right-handed), higher P:L ratio and longer times then represent the thermodynamically-favored species. It is noteworthy that such a phenomenon has also been observed for oligo-*p*-phenylene-based polymer fibrils with the same impact of concentration and time.⁶⁶

The VCD spectra of a 2.0% AS₇₁₋₈₂ w/v (P:L of 1:10) solution as a function of time are displayed in Figure 5.8. While the IR spectra are unchanged (data not shown), the VCD signal increases during the whole experiment duration. Such a spectral evolution may correspond to the conversion of residual left-handed structures into right-handed ones. As shown in Figure S5.10, the kinetics of the signal increase seems to correspond to a first-order reaction, supporting a variation following a two-state process. However, this intensity increase could alternately take place either through thickening by protofibrils braiding or a decrease of the pitch crossover period, two phenomena that are known to enhance VCD intensity.⁵⁷ Thus, this spectral variation may represent a maturation of the fibrillar structures,

stabilizing over time and adopting a more energetically-favorable form. This conclusion would be consistent with other works that showed that upon fibrils growth and thickening, the helical pitch tends to increase.^{63,67}

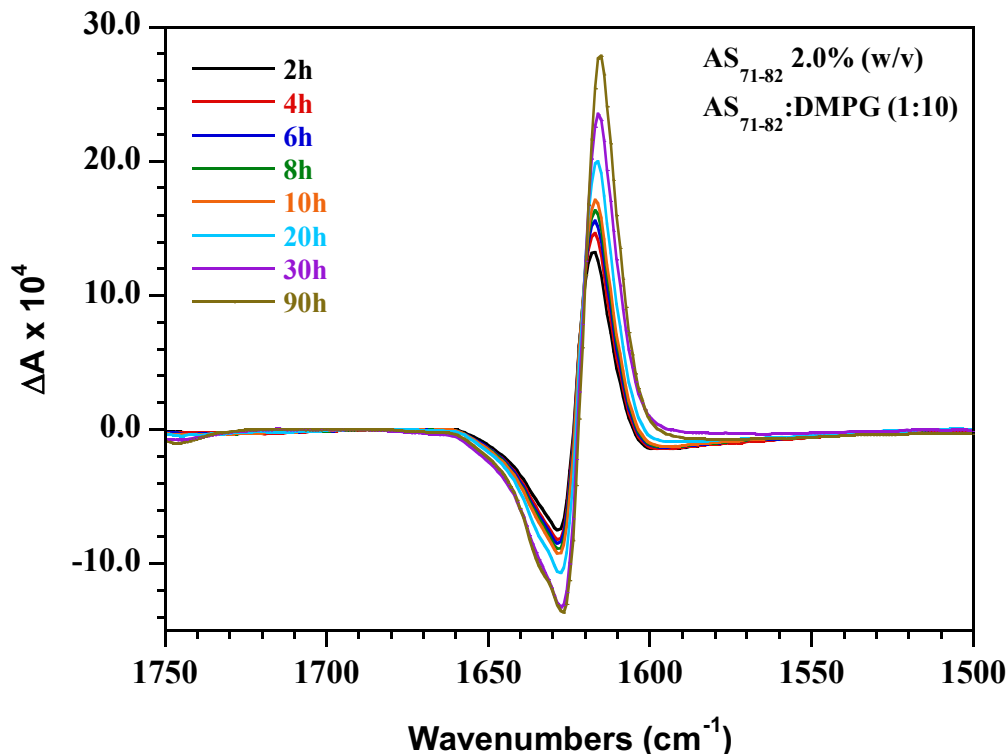


Figure 5.8. VCD spectra of AS₇₁₋₈₂ in presence of DMPG membranes (P:L 1:10, 2.0% AS₇₁₋₈₂ w/v) recorded as a function of time over a 90-hour time period.

5.4.5 Hypotheses for the Fibril Chirality Interconversion

Among the different scenarios and pathways of fibrillogenesis scenarios found in the literature for amyloid peptides and proteins,⁶⁸ two reveal a chirality reversal that could apply to AS₇₁₋₈₂ and may explain its supramolecular chirality behavior. The first hypothetical scenario (self-seeding hypothesis) would be that growth of the left-twisted fibrillar structures could destabilize them, leading to their breakage due to a growth-related increasing mechanical strain. Fibril breakage is a common feature amongst amyloids.⁶⁹ Usually, the larger the fibrillar structures, the easier the fragmentation. This segmentation would then induce a high local concentration of small protofibrillar structures, which could then reassemble differently. This process is assimilated to a secondary nucleation. Jansen *et al.*

observed this phenomenon for small agglomerates of insulin displaying a side-by-side association.⁷⁰ A similar fragmentation of initially left-twisted fibrillar structure of AS₇₁₋₈₂ could then associate with a right-twist due to mechanical strain as well as electrostatic and hydrophobic energy minimization.

The second scenario (unfolding or conformational switching hypothesis) states that upon meeting events, left-twisted fibrillar structures could untwist, reach a flat tape-like state, align with each other, and then refold in the opposite twist direction with several protofibrils sticking together. The unfolding of left-twisted fibrils has been observed with pH changes, leading to flat tape-like filaments⁷¹⁻⁷² or to reversed right-twisted fibrils.⁵⁹ Usov *et al.* observed an inversion of chirality in serum albumin amyloid fibrils formed in solution using high-speed atomic force microscopy. Over time, two left-twisted protofibrils unwind simultaneously upon meeting to eventually twist in the reversed direction and form a right-handed helical ribbon.⁷³ At the molecular level, this scenario would involve flexible aggregated β -strands capable of tilting along their axis, despite the innate chiral preference of L-amino acids.⁷⁴ One can infer that most AS₇₁₋₈₂ protofilaments are assembled and exist as single left-twisted protofilaments. With time, meeting events may promote the second chirality of the protofilaments in order to refold and minimize their interaction energy leading to right-twisted assemblies.

VCD data appear consistent with both models. In both cases, the left-twisted fibrillar structure population would decrease progressively, consistently with the decrease in the (+ -) couplet amplitude. Assuming that the intermediate states (fragmented or untwisted fibrils) have short lifetimes with respect to the acquisition time (hour range), the VCD signal may appear as an interconversion phenomenon without intermediate: a decrease in left-twisted fibrillar structures and an increase in right-twisted fibrillar structures. The loss of left-twisted structures would decrease the (+ -) couplet, while simultaneously, the (- +) couplet would increase, as experimentally observed.

It is noteworthy that the reversal of the VCD couplet pattern upon aging or AS₇₁₋₈₂ concentrations or P:L ratios changes may be explained by a third hypothesis: left-twisted protofibrils could stick together, retain their twist and associate into fibrils that would adopt

an overall right-twist. In this case the VCD signal would be composed of both the left-twist contribution of protofibrils and the right-twist contribution of the final fibrils. This scenario would also be compatible with the proportionally lower VCD intensity for the regimes at high concentrations and high P:L ratios.

The fibrillogenesis of amyloid peptides and proteins in solution is a highly complex process, where different events take place, such as nucleation, fragmentation and elongation -as well as secondary processes-, and occur in series or in parallel. The fibrillogenesis of AS₇₁₋₈₂ at the surface of membranes is a very complex phenomenon as well. The results presented here prove the high predictability of the supramolecular architecture of AS₇₁₋₈₂ assemblies. As exemplified above, particularly with P:L ratios of 1:10 (0.8% AS₇₁₋₈₂) and 1:15 (1.0% AS₇₁₋₈₂), the system is deterministic: it is possible to predict the handedness of the structures given the concentration and P:L ratio. Our results and others show that in carefully chosen conditions, peptides and proteins can form fibrils with a preferential morphology, and by tuning the incubation conditions it is possible to predict the final morphologies.

5.5 Conclusions

This study demonstrates that two forms of AS₇₁₋₈₂ β -sheet species with different helicities can be formed, depending on the peptide and lipid concentrations. These results underline the flexibility of the supramolecular architecture that can be adopted. The structural organizations observed in the present work are compiled in Table 5.1, with the sign of the VCD couplet, the corresponding handedness of the predominant fibril species and the time evolution of the signal.

Table 5.1. Summary of the Fibrillary Structures Formed by AS₇₁₋₈₂ in the Presence of DMPG Membranes at Different Concentrations and P:L Ratios.

		Couplet pattern	Handedness of the major population	Signal evolution with time
% AS ₇₁₋₈₂ w/v (at P:L ratio of 1:10)	0.25	(+ -)	left	decrease
	0.5	(+ -)	left	decrease
	0.8	absent (t=0) (- +) (t=18h)	left and right (t=0) right (t=18h)	increase
	1.0	(- +)	right	increase
	2.0	(- +)	right	increase
P:L ratio (at 1.0% AS ₇₁₋₈₂ w/v)	1:20	(+ -)	left	decrease
	1:15	(+ -) (t=0) (- +) (t=18h)	left (t=0) right (t=18h)	decrease (t=0) increase (t=18h)
	1:11.5	(- +)	right	increase
	1:10	(- +)	right	increase

Such a polymorphism and its time evolution, more than just displaying distinct molecular and supramolecular architectures, is acknowledged to have a biological significance.⁸ In particular, in the case of amyloid proteins, studies have shown that polymorphs have a different biological relevance, particularly a pathological one.^{62,64} Polymorphs, indeed, may exhibit different aggregation kinetics, diverse interactions with membranes or receptors, and various fragmentation kinetics and subsequent diffusion across tissues.⁸ Consequently, they may have diversified neurodegenerative mechanisms.⁸ Also, since supramolecular chirality varies with time and matures, amyloid structures may evolve so that they may take different forms depending on the stage of the disease.

Interestingly, one study reported that AS fibrils extracted from PD patients' brain display a twisted morphology² while fibrils with distinctive chiralities have previously been observed.⁶⁰⁻⁶² Variations in supramolecular chirality are then representative of the disease

reality so that amyloid peptides constitute good models to comprehend and describe the structural features involved in neurological diseases. Given the importance of the segment 71-82 for the parent protein AS, the behavior of AS₇₁₋₈₂ could have implications for PD as dynamical changes of fibrillar structures could have an impact on the degradation of neuronal membranes. This behavior could thus shed light on a phenomenon that could also take place with AS, highlighting the importance of the dynamics in the fibrillization process. Hypothetically this could contribute to the research of probes, inhibitors and breakers targeting specific structures at certain steps of amyloid maturation and diseases stages.

5.6 Experimental Section

5.6.1 Materials

DMPG (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)) was purchased from Avanti Polar lipids (Alabaster, AL, USA) and was used without further purification. Deuterium oxide (D₂O, 99.9 atom %D) was purchased from CDN Isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada). All solvents were of reagent grade or HPLC grade quality, purchased commercially, and used without further purification. Fmoc-protected amino acids, Wang resin, and other solid-phase peptide synthesis-related reagents were purchased from Matrix Innovation (Québec, QC, Canada). All other chemicals were of reagent grade.

5.6.2 Peptide Synthesis

AS₇₁₋₈₂ was synthesized using a solid-phase protocol with N-Fmoc-protected L-amino acids and Wang resin. Details can be found elsewhere.³⁰ The peptide backbone amines were deuterated by solubilizing the peptide in D₂O at room temperature for two days prior to freeze-drying, to prevent hydrogen/deuterium exchange during acquisition, a phenomenon known to slightly shift the amide I' band.

5.6.3 Sample Preparation

Multilamellar vesicles (MLVs) formation: AS₇₁₋₈₂ and DMPG were cosolubilized in a CHCl₃:MeOH solution (2:1 v:v). The samples were then dried under a flow of nitrogen, frozen, and lyophilized overnight to remove any traces of residual organic solvent. The dry mixture was then hydrated with a deuterated phosphate buffer (pD 7, 20 mM). Five

freeze/thaw cycles and in-between mechanical agitation were done in order to form and hydrate the MLVs.

5.6.4 VCD Spectra Acquisition

IR and VCD spectra were acquired on a Nicolet Nexus 670 Fourier-transform IR (FTIR) spectrometer (ThermoNicolet, Madison, WI, USA) equipped with a homemade VCD optical-bench⁷⁵ at 25 °C. At this temperature the phospholipids were in the fluid state (transition temperature of DMPG $T_m = 23$ °C). The samples were held in a demountable CaF₂ cell with fixed path length of 45 μm (volume ~ 30 μL). The absence of preferential orientation of fibrils was verified by the absence of linear dichroism.

5.6.5 Spectra Treatment

The ordinate scale ΔA corresponds to the intrinsic VCD intensity, *i.e.* the difference between the circularly polarized light $A_L - A_R$. The ratio $\Delta A/A$ corresponds to the normalized spectra, where A corresponds to the intensity of the maximum of the amide I' band in the IR spectrum. All spectra have been treated with the OmnicTM and KaleidaGraph softwares, have the solvent contribution subtracted, and the baseline corrected.

5.6.6 Transmission Electron Microscopy (TEM)

TEM experiments were conducted on a JEOL JEM-1230 electron microscope operating at 80 kV (JEOL, Tokyo, Japan) and equipped with a Gatan Ultrascan CCD camera (Gatan, Pleasanton, CA, USA). Measurements were made in the bright field mode, with negative staining using uranyl acetate as a contrast agent. All experiments were conducted at room temperature.

Samples were prepared as above and frozen at -18 °C within one hour after preparation. The solution was deposited on a copper grid coated with carbon, the excess of water was then absorbed using blotting paper. The sample was then stained with a 2.0% (w/v) uranyl acetate solution (pH 3.5), and finally blotted again. Micrographs were visualized using the Gatan Digital Micrograph software, version 3.4 (Gatan, Pleasanton, CA, USA).

5.7 Associated Content

Supporting Information

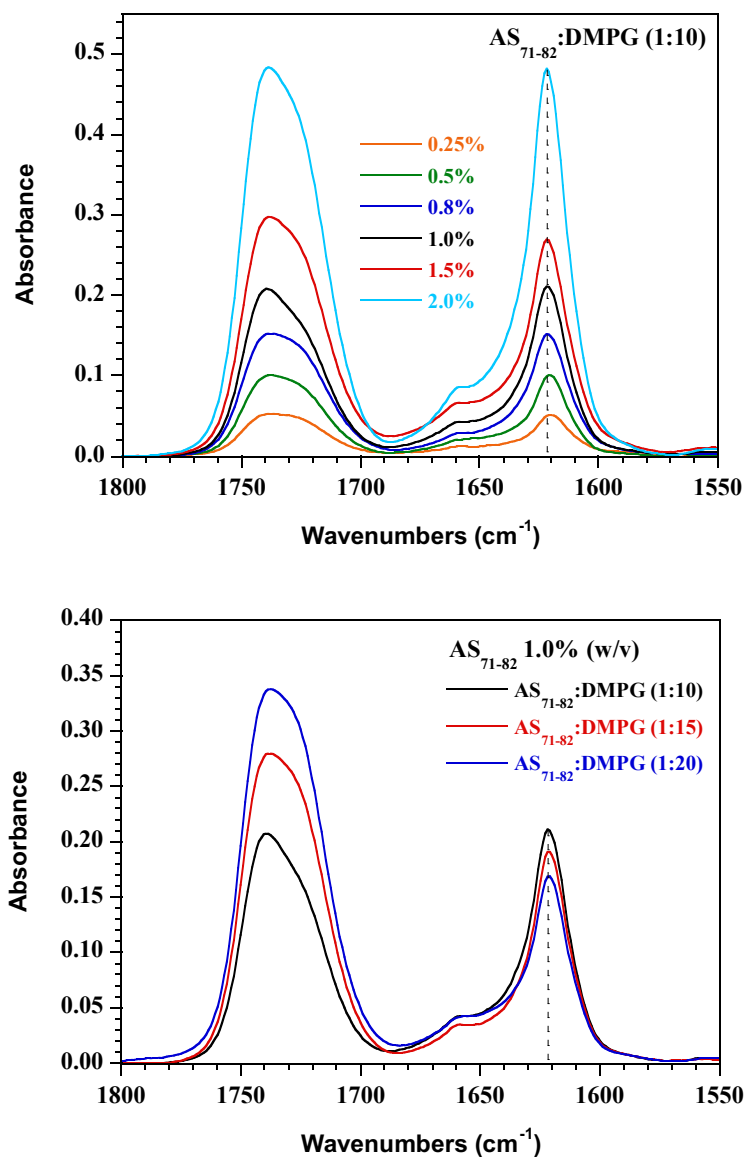


Figure S5.9. IR spectra of AS₇₁₋₈₂ in presence of DMPG membranes at a P:L molar ratio of 1:10 for various AS₇₁₋₈₂ concentrations (0.25, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 and 2.0% w/v) (upper panel), and at a constant AS₇₁₋₈₂ concentration of 1.0% w/v for various P:L molar ratios (1:20, 1:15 and 1:10) (lower panel). The spectra were acquired prior to VCD acquisition. The dashed line indicates the red-shift observed as the AS₇₁₋₈₂ concentration and P:L ratio decrease. The amide I' band of AS₇₁₋₈₂ arises at 1621 cm⁻¹. The band near 1740 cm⁻¹ is due to the C=O stretching band of DMPG. The variations of absorbance are simply and directly related to the peptide concentration and P:L ratios.

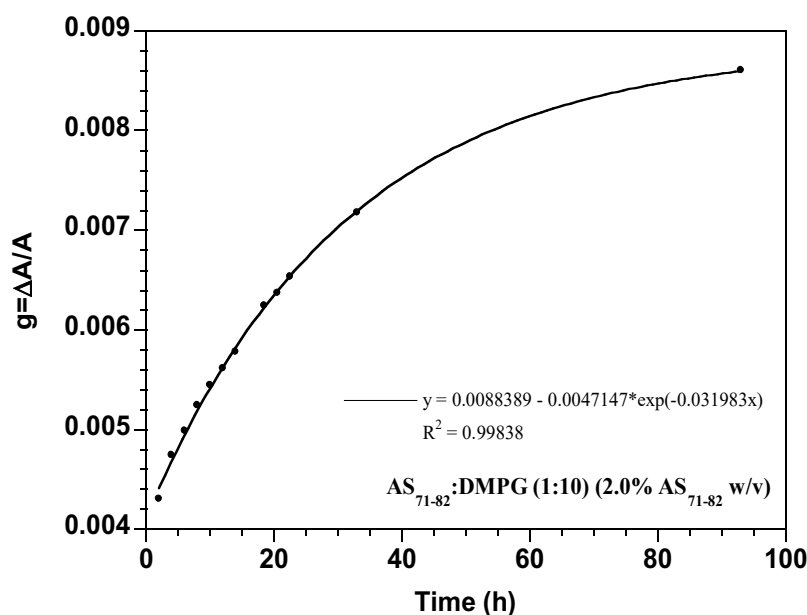


Figure S5.10. VCD couplet amplitude g ($g = (\Delta A_{1617} - \Delta A_{1629})/A$) as a function of time of a 2.0% AS_{71-82} w/v solution at a P:L ratio of 1:10. The data can be modeled using an exponential function.

5.8 Acknowledgments

This paper is dedicated to the memory of Professor Michèle Auger, a generous and talented woman, expert in NMR spectroscopy and biophysical systems. Her contributions as a researcher and teacher as well as her dedication to the academic and scientific community were exceptional and will be long enduring.

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (M.A.), the Fonds de recherche du Québec-Nature et Technologies (FRQ-NT) (M.A.), and Université Laval (M.A.). The Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), the Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), the Centre québécois sur les matériaux fonctionnels (CQMF), are acknowledged for the infrastructure provided to us. PROTEO and CQMF are supported by FRQ-NT. B.M. is the recipient of graduate scholarships from Bionano (NSERC) and PROTEO. The authors are indebted to the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS, Chemistry Department) and to Région Aquitaine for financial support for the FT-IR and optical equipment at Université Bordeaux I. The authors

thank R. Janvier (Université Laval) for his help with transmission electron microscopy measurements.

5.9 References

1. Iwai, A.; Masliah, E.; Yoshimoto, M.; Ge, N.; Flanagan, L.; Rohan de Silva, H. A.; Kittel, A.; Saitoh, T., The precursor protein of Non-A β Component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* **1995**, *14*, 467-475.
2. Spillantini, M. G.; Crowther, R. A.; Jakes, R.; Hasegawa, M.; Goedert, M., α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6469-6473.
3. Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M. Y.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M., α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **1997**, *388*, 839-840.
4. Chiti, F.; Dobson, C. M., Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: A summary of progress over the last decade. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 27-68.
5. Parkinson, J., An Essay on the Shaking Palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **2002**, *14*, 223-236.
6. Sarkar, S.; Raymick, J.; Imam, S., Neuroprotective and therapeutic strategies against Parkinson's disease: Recent perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 904.
7. Miller, D. B.; O'Callaghan, J. P., Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. *Metab., Clin. Exp.* **2015**, *64*, S40-S46.
8. Tycko, R., Amyloid polymorphism: Structural basis and neurobiological relevance. *Neuron* **2015**, *86*, 632-645.
9. Pujols, J.; Peña-Díaz, S.; Lázaro, D. F.; Peccati, F.; Pinheiro, F.; González, D.; Carija, A.; Navarro, S.; Conde-Giménez, M.; García, J., et al., Small molecule inhibits α -synuclein aggregation, disrupts amyloid fibrils, and prevents degeneration of dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, 10481-10486.
10. Fauvet, B.; Mbefo, M. K.; Fares, M.-B.; Desobry, C.; Michael, S.; Ardah, M. T.; Tsika, E.; Coune, P.; Prudent, M.; Lion, N., et al., α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15345-15364.
11. Theillet, F.-X.; Binolfi, A.; Bekei, B.; Martorana, A.; Rose, H. M.; Stuver, M.; Verzini, S.; Lorenz, D.; van Rossum, M.; Goldfarb, D., et al., Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature* **2016**, *530*, 45-50.
12. Weinreb, P. H.; Zhen, W.; Poon, A. W.; Conway, K. A.; Lansbury, P. T., NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13709-13715.
13. Davidson, W. S.; Jonas, A.; Clayton, D. F.; George, J. M., Stabilization of α -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9443-9449.
14. Eliezer, D.; Kutluay, E.; Bussell Jr, R.; Browne, G., Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 1061-1073.
15. Fusco, G.; De Simone, A.; Gopinath, T.; Vostrikov, V.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Veglia, G., Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3827.
16. Burré, J.; Sharma, M.; Südhof, T. C., Definition of a molecular pathway mediating α -synuclein neurotoxicity. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 5221-5232.
17. Zhu, M.; Fink, A. L., Lipid binding inhibits α -synuclein fibril formation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 16873-16877.

18. Abedini, A.; Raleigh, D. P., A role for helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded polypeptides? *Phys. Biol.* **2009**, *6*, 015005.
19. Comellas, G.; Lemkau, L. R.; Zhou, D. H.; George, J. M.; Rienstra, C. M., Structural Intermediates during α -Synuclein Fibrillogenesis on Phospholipid Vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5090-5099.
20. Ghosh, D.; Singh, P. K.; Sahay, S.; Jha, N. N.; Jacob, R. S.; Sen, S.; Kumar, A.; Riek, R.; Maji, S. K., Structure based aggregation studies reveal the presence of helix-rich intermediate during α -synuclein aggregation. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9228.
21. Tang, M.; Comellas, G.; Rienstra, C. M., Advanced solid-state NMR approaches for structure determination of membrane proteins and amyloid fibrils. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2080-2088.
22. Tuttle, M. D.; Comellas, G.; Nieuwkoop, A. J.; Covell, D. J.; Berthold, D. A.; Kloepper, K. D.; Courtney, J. M.; Kim, J. K.; Barclay, A. M.; Kendall, A., et al., Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 409-415.
23. Iyer, A.; Roeters, S. J.; Kogan, V.; Woutersen, S.; Claessens, M. M. A. E.; Subramaniam, V., C-Terminal truncated α -synuclein fibrils contain strongly twisted β -sheets. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15392-15400.
24. Kessler, J. C.; Rochet, J.-C.; Lansbury, P. T., The N-terminal repeat domain of α -synuclein inhibits β -sheet and amyloid fibril formation. *Biochemistry* **2003**, *42*, 672-678.
25. Uéda, K.; Fukushima, H.; Masliah, E.; Xia, Y.; Iwai, A.; Yoshimoto, M.; Otero, D. A.; Kondo, J.; Ihara, Y.; Saitoh, T., Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 11282-11286.
26. Culvenor, J. G.; McLean, C. A.; Cutt, S.; Campbell, B. C. V.; Maher, F.; Jäkälä, P.; Hartmann, T.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; Li, Q.-X., Non-A β component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) Revisited : NAC and α -synuclein are not associated with A β amyloid. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 1173-1181.
27. Giasson, B. I.; Murray, I. V. J.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y., A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α -synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2380-2386.
28. Periquet, M.; Fulga, T.; Myllykangas, L.; Schlossmacher, M. G.; Feany, M. B., Aggregated α -synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity *in vivo*. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 3338-3346.
29. Brown, J. W. P.; Buell, A. K.; Michaels, T. C. T.; Meisl, G.; Carozza, J.; Flagmeier, P.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M.; Galvagnion, C., β -Synuclein suppresses both the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation *via* competitive binding to surfaces. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36010.
30. Bédard, L.; Lefèvre, T.; Morin-Michaud, É.; Auger, M., Besides fibrillization: Putative role of the peptide fragment 71–82 on the structural and assembly behavior of α -synuclein. *Biochemistry* **2014**, *53*, 6463-6472.
31. Martial, B.; Lefèvre, T.; Auger, M., Understanding amyloid fibril formation using protein fragments: Structural investigations *via* vibrational spectroscopy and solid-state NMR. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 1133-1149.
32. Gazit, E., Mechanisms of amyloid fibril self-assembly and inhibition. *FEBS J.* **2005**, *272*, 5971-5978.
33. Gazit, E., Self assembly of short aromatic peptides into amyloid fibrils and related nanostructures. *Prion* **2007**, *1*, 32-35.
34. López de la Paz, M.; Serrano, L., Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 87-92.

35. Andreasen, M.; Lorenzen, N.; Otzen, D., Interactions between misfolded protein oligomers and membranes: A central topic in neurodegenerative diseases? *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2015**, *1848*, 1897-1907.
36. Galvagnion, C.; Buell, A. K.; Meisl, G.; Michaels, T. C. T.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M., Lipid vesicles trigger α -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 229-234.
37. Perni, M.; Galvagnion, C.; Maltsev, A.; Meisl, G.; Müller, M. B. D.; Challa, P. K.; Kirkegaard, J. B.; Flagmeier, P.; Cohen, S. I. A.; Cascella, R., et al., A natural product inhibits the initiation of α -synuclein aggregation and suppresses its toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, E1009-E1017.
38. Shtilerman, M. D.; Ding, T. T.; Lansbury, P. T., Molecular crowding accelerates fibrillization of α -synuclein: Could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry* **2002**, *41*, 3855-3860.
39. Kocourková, L.; Novotná, P.; Čujová, S.; Čerovský, V.; Urbanová, M.; Setnička, V., Conformational study of melectin and antapin antimicrobial peptides in model membrane environments. *Spectrochim. Acta, Part A* **2017**, *170*, 247-255.
40. Novotná, P.; Goncharova, I.; Urbanová, M., Mutual structural effect of bilirubin and model membranes by vibrational circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2014**, *1838*, 831-841.
41. Novotná, P.; Urbanová, M., Vibrational circular dichroism study of polypeptide model-membrane systems. *Anal. Biochem.* **2012**, *427*, 211-218.
42. Ma, S.; Cao, X.; Mak, M.; Sadik, A.; Walkner, C.; Freedman, T. B.; Lednev, I. K.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A., Vibrational Circular Dichroism Shows Unusual Sensitivity to Protein Fibril Formation and Development in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12364-12365.
43. Rath, A.; Davidson, A. R.; Deber, C. M., The structure of "unstructured" regions in peptides and proteins: Role of the polyproline ii helix in protein folding and recognition*. *Biopolymers* **2005**, *80*, 179-185.
44. Woolfson, D. N.; Bartlett, G. J.; Bruning, M.; Thomson, A. R., New currency for old rope: From coiled-coil assemblies to α -helical barrels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 432-441.
45. Ferreon, J. C.; Hilser, V. J., The effect of the polyproline II (PPII) conformation on the denatured state entropy. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 447-457.
46. Dukor, R. K.; Keiderling, T. A., Reassessment of the random coil conformation: vibrational CD study of proline oligopeptides and related polypeptides. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1747-1761.
47. Paterlini, M. G.; Freedman, T. B.; Nafie, L. A., Vibrational circular dichroism spectra of three conformationally distinct states and an unordered state of poly(L-lysine) in deuterated aqueous solution. *Biopolymers* **1986**, *25*, 1751-1765.
48. Barth, A., Infrared Spectroscopy of Proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073-1101.
49. Roeters, S. J.; Iyer, A.; Pletikapić, G.; Kogan, V.; Subramaniam, V.; Woutersen, S., Evidence for intramolecular antiparallel beta-sheet structure in alpha-synuclein fibrils from a combination of two-dimensional infrared spectroscopy and atomic force microscopy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41051.
50. Bouchard, M.; Zurdo, J.; Nettleton, E. J.; Dobson, C. M.; Robinson, C. V., Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1960-1967.
51. Kurouski, D.; Lu, X.; Popova, L.; Wan, W.; Shanmugasundaram, M.; Stubbs, G.; Dukor, R. K.; Lednev, I. K.; Nafie, L. A., Is supramolecular filament chirality the underlying cause of major morphology differences in amyloid fibrils? *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2302-2312.

52. Labbé, J.-F.; Lefèvre, T.; Guay-Bégin, A.-A.; Auger, M., Structure and membrane interactions of the β -amyloid fragment 25-35 as viewed using spectroscopic approaches. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 7228-7239.
53. Shanmugam, G.; Polavarapu, P. L., Site-specific structure of A β (25–35) peptide: Isotope-assisted vibrational circular dichroism study. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteom.* **2013**, *1834*, 308-316.
54. Surmacz-Chwedoruk, W.; Babenko, V.; Dec, R.; Szymczak, P.; Dzwolak, W., The emergence of superstructural order in insulin amyloid fibrils upon multiple rounds of self-seeding. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32022.
55. Galvagnion, C., The role of lipids interacting with alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Parkinson's Dis.* **2017**, *7*, 433-450.
56. Sinha, S.; Lopes, D. H. J.; Bitan, G., A key role for lysine residues in amyloid β -protein folding, assembly, and toxicity. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 473-481.
57. Measey, T. J.; Schweitzer-Stenner, R., Vibrational circular dichroism as a probe of fibrillogenesis: The origin of the anomalous intensity enhancement of amyloid-like fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1066-1076.
58. Welch, W. R. W.; Kubelka, J.; Keiderling, T. A., Infrared, vibrational circular dichroism, and Raman spectral simulations for β -sheet structures with various isotopic labels, interstrand, and stacking arrangements using density functional theory. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 10343-10358.
59. Shanmugasundaram, M.; Kurouski, D.; Wan, W.; Stubbs, G.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A.; Lednev, I. K., Rapid filament supramolecular chirality reversal of HET-s (218–289) prion fibrils driven by pH elevation. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 8521-8525.
60. Hoyer, W.; Antony, T.; Cherny, D.; Heim, G.; Jovin, T. M.; Subramaniam, V., Dependence of α -synuclein aggregate morphology on solution conditions. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 383-393.
61. Vilar, M.; Chou, H.-T.; Lührs, T.; Maji, S. K.; Riek-Loher, D.; Verel, R.; Manning, G.; Stahlberg, H.; Riek, R., The fold of α -synuclein fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 8637-8642.
62. Bousset, L.; Pieri, L.; Ruiz-Arlandis, G.; Gath, J.; Jensen, P. H.; Habenstein, B.; Madiona, K.; Olieric, V.; Böckmann, A.; Meier, B. H., et al., Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2575.
63. Fändrich, M.; Meinhardt, J.; Grigorieff, N., Structural polymorphism of Alzheimer A β and other amyloid fibrils. *Prion* **2009**, *3*, 89-93.
64. Petkova, A. T.; Leapman, R. D.; Guo, Z.; Yau, W.-M.; Mattson, M. P.; Tycko, R., Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Science* **2005**, *307*, 262-265.
65. Antzutkin Oleg, N., Amyloidosis of Alzheimer's A β peptides: solid-state nuclear magnetic resonance, electron paramagnetic resonance, transmission electron microscopy, scanning transmission electron microscopy and atomic force microscopy studies. *Magn. Reson. Chem.* **2004**, *42*, 231-246.
66. Aparicio, F.; Nieto-Ortega, B.; Nájera, F.; Ramírez Francisco, J.; López Navarrete Juan, T.; Casado, J.; Sánchez, L., Inversion of supramolecular helicity in oligo-*p*-phenylene-based supramolecular polymers: Influence of molecular atropisomerism. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *53*, 1373-1377.
67. Volpatti, L. R.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J., A clear view of polymorphism, twist, and chirality in amyloid fibril formation. *ACS Nano* **2013**, *7*, 10443-10448.
68. Kurouski, D. In *Exploring New Findings on Amyloidosis*; Fernandez-Escamilla, A. M., Ed.; IntechOpen: 2016; pp 73-98.

69. Knowles, T. P. J.; Waudby, C. A.; Devlin, G. L.; Cohen, S. I. A.; Aguzzi, A.; Vendruscolo, M.; Terentjev, E. M.; Welland, M. E.; Dobson, C. M., An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science* **2009**, *326*, 1533-1537.
70. Jansen, R.; Dzwolak, W.; Winter, R., Amyloidogenic self-assembly of insulin aggregates probed by high resolution atomic force microscopy. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 1344-1353.
71. Kurouski, D.; Dukor, R. K.; Lu, X.; Nafie, L. A.; Lednev, I. K., Spontaneous inter-conversion of insulin fibril chirality. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2837-2839.
72. Wischik, C. M.; Crowther, R. A.; Stewart, M.; Roth, M., Subunit structure of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 1905-1912.
73. Usov, I.; Adamcik, J.; Mezzenga, R., Polymorphism complexity and handedness inversion in serum albumin amyloid fibrils. *ACS Nano* **2013**, *7*, 10465-10474.
74. Dzwolak, W.; Lokszejn, A.; Galinska-Rakoczy, A.; Adachi, R.; Goto, Y.; Rupnicki, L., Conformational indeterminism in protein misfolding: Chiral amplification on amyloidogenic pathway of insulin. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7517-7522.
75. Buffeteau, T.; Lagugné-Labarthe, F.; Sourisseau, C., Vibrational circular dichroism in general anisotropic thin solid films: Measurement and theoretical approach. *Appl. Spectrosc.* **2005**, *59*, 732-745.

Chapitre 6 : The Structure of a Parkinson's Disease-Involved α -Synuclein Peptide is Modulated by Membrane Composition and Physical State

(2020) *J. Phys. Chem. B*, **124**, 3469-3481

Retranscrit avec permission, Copyright © 2020, American Chemical Society

Benjamin Martial¹, Gabrielle Raïche-Marcoux^{1†}, Thierry Lefèvre¹, Pierre Audet², Normand Voyer³ and Michèle Auger¹

¹Department of Chemistry, Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), Centre québécois sur les matériaux fonctionnels (CQMF), Université Laval, 1045 avenue de la médecine, Québec, QC G1V 0A6, Canada

²Department of Chemistry, Université Laval, 1045 avenue de la médecine, Québec, QC G1V 0A6, Canada

³Department of Chemistry, Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), Université Laval, 1045 avenue de la médecine, Québec, QC G1V 0A6, Canada

[†]Present address: Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada; CUO-Recherche, Centre de Recherche du CHU de Québec, Hôpital du Saint-Sacrement, CHU de Québec, Québec, G1S 4L8, Canada

6.1 Résumé

Pour sonder l'importance des interactions entre AS₇₁₋₈₂ et des membranes modèles lors de la fibrillation, nous avons mené des expériences par infrarouge, ainsi que par RMN-ÉS. Ces expériences ont permis de caractériser la structure des protofibrilles de l'AS₇₁₋₈₂ formées en présence de membranes modèles anioniques comme étant sous forme de feuillets- β parallèles parfaitement *in-register*. De plus, les études de thermotropisme ont prouvé que l'état physique des membranes a un effet sur la structure de l'AS₇₁₋₈₂, tandis que la présence

de fibrilles d'AS₇₁₋₈₂ ne perturbe pas significativement ni l'hydratation des têtes polaires, ni l'ordre des chaînes acyle des phospholipides. Ces arguments permettent d'émettre l'hypothèse que les fibrilles se trouvent très probablement à la surface des membranes, et y sont maintenues par interactions électrostatiques, tel que suggéré par la RMN du ³¹P.

6.2 Abstract

α -Synuclein, the protein responsible for Parkinson's disease, contains a 12-residue long sequence, AS₇₁₋₈₂, that is thought to play a crucial role in α -synuclein aggregation process. Neuronal membranes are direct interacting partners of α -synuclein and play a role in fibrillogenesis by providing a charged catalytic surface, notably from anionic phospholipids. However, details are lacking regarding the impact of membrane composition and the driving forces leading to membrane anchorage and peptide structure conversion. To decipher the interplay of α -synuclein with neuronal membranes, the structure of AS₇₁₋₈₂ was investigated in the presence of anionic model membranes. Infrared (IR) spectroscopy and solid-state nuclear magnetic resonance data show that AS₇₁₋₈₂ adopts a perfectly in-register parallel β -sheet structure with fibrillar morphology upon interactions with anionic model membranes. IR thermotropism experiments conducted with several membrane compositions revealed that the phospholipids phase transition induces a rearrangement of AS₇₁₋₈₂ β -sheet structure. By contrast, membranes are not significantly affected by the presence of AS₇₁₋₈₂, which advocates for the amyloid fibrils to lie loosely on the membrane surface. The results bring new arguments for the lipid-sensing capabilities of AS₇₁₋₈₂ and revealed its protofibrillar structure. The striking similarities between AS₇₁₋₈₂ and α -synuclein make of it a potential good aggregation inhibitor upon chemical modifications.

6.3 Introduction

Parkinson's disease (PD) belongs to the broad family of amyloid diseases. PD affects more than ten million people around the world and comes second after Alzheimer's disease among the most widespread neurodegenerative diseases. Even though the cellular mechanisms involved in the development of PD remain elusive, a hallmark is the presence in the *substantia nigra* of proteinaceous aggregates called Lewy bodies, mostly composed of α -synuclein (AS)¹⁻². These aggregates adopt a fibrillar cross β -sheet structure, typical of

amyloid fibrils. AS is a 140-residue long protein in which three domains can be distinguished: the N-terminal region (1-60), the non β -amyloid component (NAC, 61-95) and the C-terminal region (96-140)³. The N-terminal region mainly regulates the formation of amphiphilic α -helices upon membrane-binding^{4,6}. The C-terminal region has proved to impact the aggregation process, its deletion accelerating AS fibrillar aggregation⁷. The NAC region, comprising 17 hydrophobic residues out of 35, is very amyloidogenic. As a matter of fact, despite the high sequence homology between AS and β -synuclein (BS), they have different aggregation behaviors. BS is missing a part of the NAC (notably residues 71-82) and has almost no ability to aggregate, contrarily to AS. BS has even been proved to be able to inhibit AS aggregation^{8,9}. Furthermore, studies have shown that specific deletions or substitutions in the NAC region slow down or even inhibit the fibrillization process⁸.

A consensus exists regarding the role neuronal membranes have in AS fibrillization. Neuronal membranes and dopaminergic micro-vesicles are negatively charged, which favors electrostatic interactions with the N-terminal region of AS (basic in physiological conditions with a net charge of +4). This leads to the anchorage of AS to the membrane surface, *via* the formation of α -helices⁵. Fibrillization could occur from either the association of random coil monomers aggregating in the cell media, or from membrane-bound α -helices turning into β -sheet clusters¹⁰⁻¹¹. However, details regarding the driving forces leading to membrane anchorage and structure conversion are lacking. This is also true regarding the impact of the membrane composition or aqueous environment. One of the limitations is that, due to the low availability of AS, it is difficult to perform biophysical studies with model membranes. Such studies would be useful to understand the molecular structure of AS and its interactions with membranes.

Carefully chosen short amyloid fragments are particularly suited to apprehend the physicochemical behavior and structure of full-length amyloid proteins¹². AS₇₁₋₈₂ allows the study of the amyloidogenic features of AS, even though being water-soluble, thereby bypassing the complexity of working with full-length AS. A previous study underlined the structural similarities between AS₇₁₋₈₂ and AS, making it a good model to mimic AS structural features¹³. Another work has shown that AS₇₁₋₈₂ forms amyloid fibrils in the presence of single

negatively-charged phospholipid membrane. It has been suggested that the peptide form parallel β -sheet structure but is not known whether the form is in- or out-of-register¹⁴.

The present study is intended to characterize AS₇₁₋₈₂ molecular structure, and how this structure is influenced by membrane composition. The aim is also to get closer to more biologically relevant membranes than single phospholipid model membranes. Infrared spectroscopy (IR) and solid-state nuclear magnetic resonance (ssNMR) were used as they are powerful techniques to study peptide secondary structure and phospholipid order and hydration level. To gain more insight into these secondary structures, we selectively isotopically ¹³C=O labeled AS₇₁₋₈₂.

ssNMR allowed the measurement of an interstrand distance of the β -sheet structure of AS₇₁₋₈₂ via the ¹³C DQF-DRAWS (double quantum-filtered dipolar recoupling in a windowless sequence) pulse sequence. IR spectroscopy, coupled to ssNMR, allowed the determination of an in-register parallel β -sheet structure of AS₇₁₋₈₂ upon anionic membrane interactions. We observed that AS₇₁₋₈₂ has little to no effect on the hydrophobic core, hydration and thermotropism of model membranes. However, the opposite is not true: membrane fluidity and temperature affect the structure of AS₇₁₋₈₂. The results show a slight conformational modification of AS₇₁₋₈₂ that is modulated by the gel-to-fluid phase transition of the phospholipid bilayers. This thermal event is followed by an irreversible β -sheet conversion. ssNMR further allows identifying DMPG as being the main phospholipid interacting with AS₇₁₋₈₂, via the ³¹P PROCSA (phosphorus recoupling of the chemical shift anisotropy) pulse sequence.

6.4 Experimental Section

6.4.1 Materials

DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), deuterated DMPC (DMPC (d₅₄)), DMPG (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)), DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), deuterated DPPC (DPPC (d₆₂)) were purchased from Avanti Polar lipids (Alabaster, AL, USA) and were used without further purification. Deuterium oxide (D₂O, 99.9 atom %D) was purchased from CDN Isotopes (Pointe-Claire,

QC, Canada). All solvents were of reagent grade or HPLC grade quality, purchased commercially, and used without further purification. Fmoc-protected amino acids, Wang resin, and other solid-phase peptide synthesis-related reagents were purchased from Matrix Innovation (Québec, QC, Canada). Glycine-1-¹³C was purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri). All other chemicals were of reagent grade.

6.4.2 Peptide synthesis

N-Fmoc-protected 1-¹³C-Glycine was synthesized from 1-¹³C-Glycine following a protocol from literature¹⁵. AS₇₁₋₈₂ primary sequence is ⁷¹VTGVTAQAQKT⁸²V. AS₇₁₋₈₂ and 1-¹³C-Gly₇₃-AS₇₁₋₈₂ were synthesized using a solid-phase protocol with N-Fmoc-protected L-amino acids and Wang resin. AS₇₁₋₈₂ is not capped: it is not C-terminally amidated nor N-terminally acetylated. Details can be found elsewhere¹³. The peptide backbone amines were deuterated by solubilizing the peptide in D₂O at room temperature for two days prior to freeze-drying for IR spectroscopy samples, to prevent hydrogen/deuterium exchange during acquisition, a phenomenon known to slightly downshift the amide I' band.

6.4.3 Sample preparation

Multilamellar vesicles (MLVs) formation: AS₇₁₋₈₂ and lipids were cosolubilized in a CHCl₃:MeOH solution (2:1 v:v). The samples were then dried under a flow of nitrogen, frozen, and freeze-dried overnight to remove any traces of residual organic solvent. The dry mixture was then hydrated with a deuterated phosphate buffer (pD 7, 20 mM). Five freeze/thaw cycles and in-between mechanical agitation were done in order to form and hydrate the MLVs. The thaw step was carried out ~10 °C above the gel-to-fluid phase transition temperature (T_m) and freezing at -195 °C. Samples for transmission IR and ssNMR PROCSA experiments were prepared as stated above. Samples for ssNMR DQF-DRAWS experiments were prepared according to the same protocol and were freeze-dried. AS₇₁₋₈₂ structure remained unchanged upon freeze-drying as suggested by IR experiments (compare Figure 6.1B and Figure S6.10).

6.4.4 IR spectra acquisition

Spectra were acquired with a Nicolet iS50 Fourier-transform IR (FTIR) spectrometer (Thermo Scientific, Madison, WI) equipped with a KBr beamsplitter and a liquid-nitrogen-cooled MCT (mercury-cadmium-telluride) detector. Samples were held in a demountable CaF₂ cell with a fixed path length of 45 μm (volume $\sim 30 \mu\text{L}$). A homemade cell-holding heating device based on the thermoelectric Peltier effect coupled to a cooling bath was used to control the sample temperature in the range 5-70° C. A total of 128 interferograms were acquired, co-added and Fourier transformed using a Happ-Genzel apodization function to give a spectral resolution of 4 cm^{-1} in the 4000-800- cm^{-1} range.

Freeze-dried samples used in the DQF-DRAWS experiments were analyzed with a Golden Gate[®] single reflection attenuated total reflection system (Specac, Pleasantville, NY) fitted with a diamond crystal. A total of 64 interferograms were acquired, co-added and Fourier transformed using a Happ-Genzel apodization function to give a spectral resolution of 4 cm^{-1} in the 4000-800- cm^{-1} range.

Phosphatidylglycerol (PG) is absent in neuronal membranes but is a good fit for replacing phosphatidylserine (PS), which is an abundant anionic phospholipid in neuronal membranes¹⁶. The serine headgroup of PS has a spectral contribution that overlaps with the peptide amide I' band, which may prevent an accurate determination of the secondary structure¹⁷. Nevertheless, a few experiments have been conducted with PS to demonstrate that PG induces basically the same β -sheet structure for AS₇₁₋₈₂ (Figure S6.11).

6.4.5 Spectra treatment

IR spectra were treated as follows: subtraction of buffer spectrum at the corresponding temperature, and then cubic baseline correction (1800-1550 cm^{-1}). Spectral treatment was done with GRAMS/AI 8.0 (Thermo Scientific). Second derivative spectra were calculated with the Savitzky-Golay method using a cubic polynomial and 15 data points, and were subsequently multiplied by -1 to display absorbance peaks upwards.

6.4.6 Solid-state NMR

^{13}C NMR experiments were carried out on a Bruker Avance-400 (Bruker Biospin, Milton, ON, Canada) operating at a magnetic field of $B_0 = 9.4$ T, corresponding to 400 MHz for ^1H and 100.62 MHz for ^{13}C . The DQF-DRAWS sequence was implemented as illustrated in Figure S6.12, along with phase cycling¹⁸. Samples were packed in an insert to ensure high RF field homogeneity then introduced into a zirconium oxide tube with a diameter of 4 mm. Magic-angle spinning was set so that a rotor period corresponds to 8.5 RF periods (5882 ± 1 Hz), or 170 μs (a DRAWS period spans 4 rotor periods, 0.68 ms). Pulse widths were determined by a nutation experiment and resulted in 5.0 μs and 20 μs for the 90° and 360° pulses, respectively. The cross-polarization (CP) conditions were set using a RAMP-CP. The contact time was set at 2.5 ms and the 90° pulse length on the ^1H nucleus was set at 3.0 ms. Following the CP, a two-pulse phase-modulated (TPPM) ^1H high power decoupling was used to spoil the Hartmann-Hahn condition during the excitation and reconversion periods and the acquisition. An FID was acquired every two DRAWS periods (every 1.36 ms) to minimize acquisition time, and a total of 11 FID were acquired (mixing times from 0 to 15 ms). Each FID was made of 2048 points and the spectral width was set at 40 kHz. A line broadening of 100 Hz was applied to all spectra. Integrated areas correspond to the central carbonyl band, without the spinning sidebands, for resolution reasons. The chemical shifts were referenced relative to external adamantane. For each experiment, a recycling delay of 8 s was implemented. No spectral subtraction of naturally abundant ^{13}C arising from AS₇₁₋₈₂ or the phospholipids is necessary as the pulse sequence filters out single-quantum signals.

DQF-DRAWS simulated buildup curves data were created with numerical calculations via the SIMPSON software package¹⁹, using a three-spin “infinite loop” model to simulate the interactions one spin undergoes in a parallel β -sheet configuration²⁰⁻²². Double-quantum transverse relaxation (T_2^{DQ}) effects were modeled by applying the exponential decaying factor f

$$f = e^{-\frac{t}{2 * T_2^{DQ}}} \quad (6.1)$$

to the calculated single-quantum intensity²¹. Experimental data were automatically fitted by incrementing alternatively the dipolar coupling strength (i.e. internuclear distance) and T_2^{DQ} in order to minimize the root mean square (RMS) between experimental and simulated data. Simulated data verified the condition $\chi^2 < (N - M)\sqrt{2}$ for good fits²³, where N is the total number of points, M the number of fitting parameters and χ^2 defined as:

$$\chi^2 = \sum_i^N \frac{(a_i^{\text{exp}} - a_i^{\text{sim}})^2}{\sigma^2} \quad (6.2)$$

where a_i^{exp} are experimental points, a_i^{sim} are simulated points after application of the exponential decaying factor f and with σ^2 defined as follows:

$$\sigma^2 = \sum_i^N \frac{(a_i^{\text{exp}} - a_i^{\text{best fit}})^2}{N - M} \quad (6.3)$$

where $a_i^{\text{best fit}}$ are simulated points of the best fit.

³¹P NMR experiments were carried out on a Bruker Avance-400 (Bruker Biospin) operating at a magnetic field of $B_0 = 9.4$ T, corresponding to 400 MHz for ¹H and 161.98 MHz for ³¹P. Samples were introduced into a zirconium oxide tube with a diameter of 4 mm. The PROCSA (phosphorus recoupling of the chemical shift anisotropy) pulse sequence²⁴ required a magic-angle spinning frequency $\omega_r = 6$ kHz (± 1 Hz) with a ³¹P 90° pulse length of 3.0 μ s. 512 FID were acquired, with 32 scans per FID, spectral width was 50 kHz. ¹H decoupling was done with a 180° pulse centered around every rotor period during the Cn_n^1 pulse train (³¹P recoupling), and with TPPM during acquisition. During ³¹P recoupling, the ³¹P power was set at 4.28 ω_r . The chemical shifts were referenced relative to external phosphoric acid. Data were processed with MestReLab MNova 14.0. A line broadening of 100 Hz was applied to all recoupled powder spectra. MNova auto peak-picking function was used to extract $\delta^{31\text{P}_{\text{iso}}}$ values for each phospholipid in the direct dimension spectra.

6.4.7 Transmission electron microscopy (TEM)

TEM experiments were conducted on a JEOL JEM-1230 electron microscope operating at 80 kV (JEOL, Tokyo, Japan) and equipped with a Gatan Ultrascan CCD camera

(Gatan, Pleasanton, CA, USA). Measurements were made in the bright field mode, with negative staining using uranyl acetate as a contrast agent. All experiments were conducted at room temperature. Samples were prepared as above and frozen at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ within one hour after preparation. The solution was deposited on a copper grid coated with carbon, the excess of water was then absorbed using blotting paper. The sample was then stained with a 2.0% (w/v) uranyl acetate solution (pH 3.5), and finally blotted again. Micrographs were visualized using the Gatan Digital Micrograph software, version 3.4 (Gatan, Pleasanton, CA, USA).

6.5 Results and Discussion

The structure of AS₇₁₋₈₂ when interacting with membranes made up of a single component has been described previously¹³. In the presence of zwitterionic (POPC) membranes, AS₇₁₋₈₂ is mostly disordered, i.e. it keeps the same structure than in solution. It has a small ordering effect on the acyl chain, and slightly favors hydration of the C=O ester below the polar headgroup¹³. By contrast, when interacting with negatively-charged (POPG, DMPG) membranes, the peptide adopts a fully and well-defined parallel- β -sheet structure¹³⁻¹⁴, which does not interfere with acyl chains but slightly lower the phospholipid C=O hydration¹³. In the present study, we focus on partially anionic model membranes (mixture of zwitterionic and anionic phospholipids) in order to more closely mimic the composition of neuronal membranes.

6.5.1 In-register *versus* out-of-register β -sheet

Figure 6.1A displays the amide I' band of AS₇₁₋₈₂ in the presence of DMPC:DMPG (1:1) membranes. An intense and relatively narrow band is present at 1618 cm^{-1} , indicative of a β -sheet structure. The absence of a component between 1680 and 1700 cm^{-1} indicates that the β -sheets are parallel²⁵. Transmission electron microscopy (TEM) confirmed that this β -sheet structure corresponds to amyloid fibrils (Figure S6.13) similarly to what is observed with pure DMPG¹⁴.

The small component at 1658 cm^{-1} is assigned to the vibration of the glutamine residue sidechain vibration²⁵⁻²⁶. This parallel β -sheet structure is very similar to the one described previously with DMPG and POPG membranes¹³⁻¹⁴. The 1618-cm^{-1} band is actually

composed of two components as can be seen on the second derivative (1621 and 1616 cm^{-1}). The explanation for the presence of these two components and the one at 1637-1634 cm^{-1} (as well as those in Figures 6.1B and 6.1C) is developed below.

The parallel β -sheet structure of AS_{71-82} is ascertained by the IR data, yet a doubt remains as to whether the configuration is in-register or out-of-register. In the former configuration, every β -strand involved in the fibril is perfectly superimposed to its direct neighbors whereas an out-of-register configuration corresponds to β -strands shifted of one or several amino acids, as can be seen on the molecular structures modeled in Figure 6.2A.

To distinguish in-register and out-of-register structures, selective ^{13}C -labelling of the peptide bond carbonyl has proven to be a powerful tool, as reviewed elsewhere¹². IR band position is in part dictated by the reduced mass equation so that $^{13}\text{C}=\text{O}$ amide I' band arises at lower wavenumbers than $^{12}\text{C}=\text{O}$ amide I' band. Figures 6.1B and 6.1C displays the amide I' bands of 1- ^{13}C -Gly₇₃-AS₇₁₋₈₂:DMPC:DMPG (1:5:5) and AS₇₁₋₈₂:DMPC:DMPG (1:5:5, 5:1 unlabeled AS₇₁₋₈₂:1- ^{13}C -Gly₇₃-AS₇₁₋₈₂), respectively.

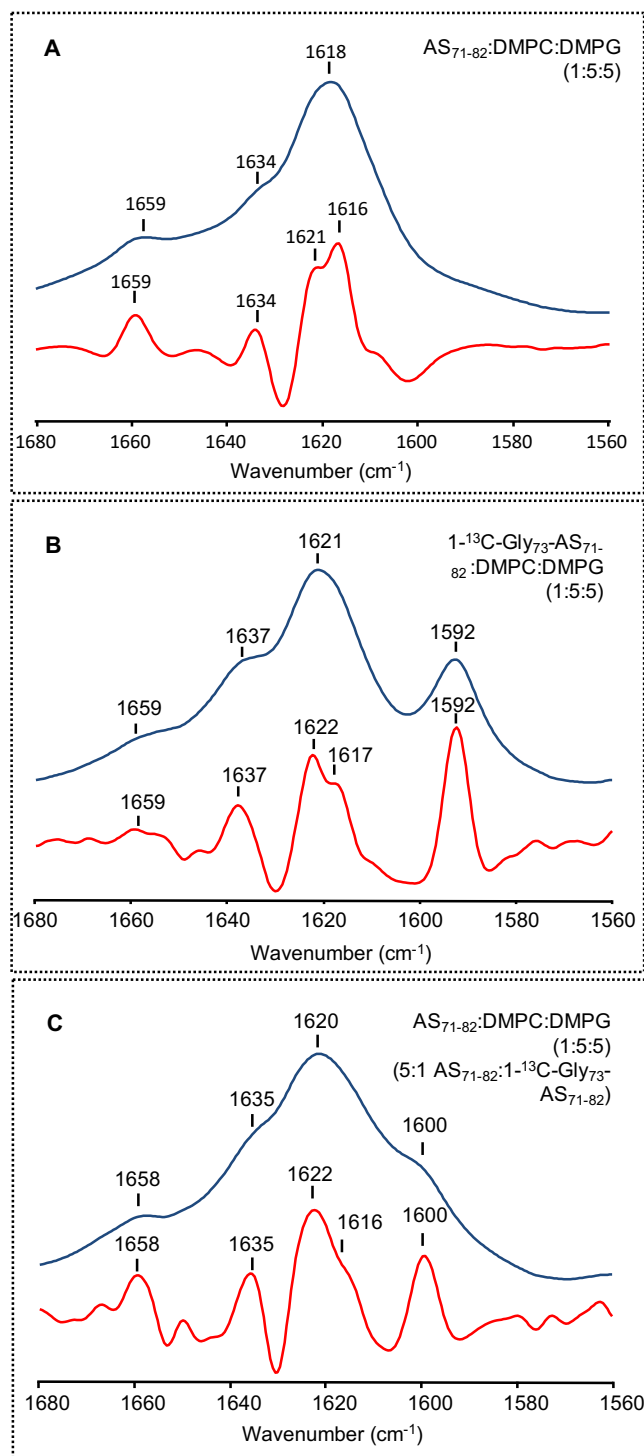


Figure 6.1. Amide I' bands and second derivatives at room temperature of AS₇₁₋₈₂:DMPC:DMPG (1:5:5) for (A) the unlabeled peptide, (B) 1-¹³C-Gly₇₃-AS₇₁₋₈₂ and (C) isotopic dilution (5:1 AS₇₁₋₈₂:1-¹³C-Gly₇₃-AS₇₁₋₈₂).

With respect to unlabeled AS₇₁₋₈₂, the spectrum of 1-¹³C-Gly₇₃-AS₇₁₋₈₂ displays one additional band at 1592 cm⁻¹ due to the Gly₇₃ peptide bond vibration. The position of this band corresponds to a β-sheet structure²⁷⁻²⁹. One can observe that the major component at 1621 cm⁻¹ is upshifted compared to unlabeled AS₇₁₋₈₂ (1618 cm⁻¹). This originates from the fact that labeling a residue located in the core of a β-strand weakens the overall intrastrand transition dipole coupling (TDC)³⁰⁻³¹, thus inducing a slight upshift of the amide I' band. TDC is an essential parameter for the analysis of secondary structure vibration bands, notably of β-sheet structures²⁵. The comparison of Figures 6.1C and 6.1B reveals an upshift of the ¹³C=O Gly₇₃ component from 1592 to 1600 cm⁻¹ upon isotopic dilution. The amplitude of this shift is indicative of a strong intermolecular coupling between 1-¹³C-Gly₇₃ residues, revealing their close vicinity in the fibrils and strongly suggesting an in-register parallel β-sheet structure³². All amide I' spectral features of labeled and unlabeled peptide point towards an in-register β-sheet configuration of AS₇₁₋₈₂.

An accurate determination of the interstrand β-sheet distance is essential to obtain a clear view of the protofibril arrangement. In the case of an in-register parallel β-sheet structure, the distance between the same residues in two adjacent β-strands is typically ~ 4.7 Å³³. In the case of an out-of-register parallel β-sheet structure, this distance increases to either ~ 5.5 or ~ 6.5 Å³⁴⁻³⁵. Structural models are presented in Figure 6.2A. To discriminate these two possibilities, ssNMR was employed. The double quantum-filtered dipolar recoupling in a windowless sequence (DQF-DRAWS) solid-state NMR pulse sequence³⁶ is particularly adequate to measure short homonuclear distances³⁷⁻³⁸, especially for amyloid peptides^{20-21,35,39}, and then to discriminate in- from out-of-register β-sheets. DQF-DRAWS was preferred to DRAWS for sensitivity reasons, and the possibility to fit simultaneously the internuclear distance and T_2^{DQ} , the double-quantum transverse relaxation parameter²⁰. The results obtained with the DQF-DRAWS experiments are presented in Figure 6.2B, alongside the best fit curve and simulations for two other scenarios.

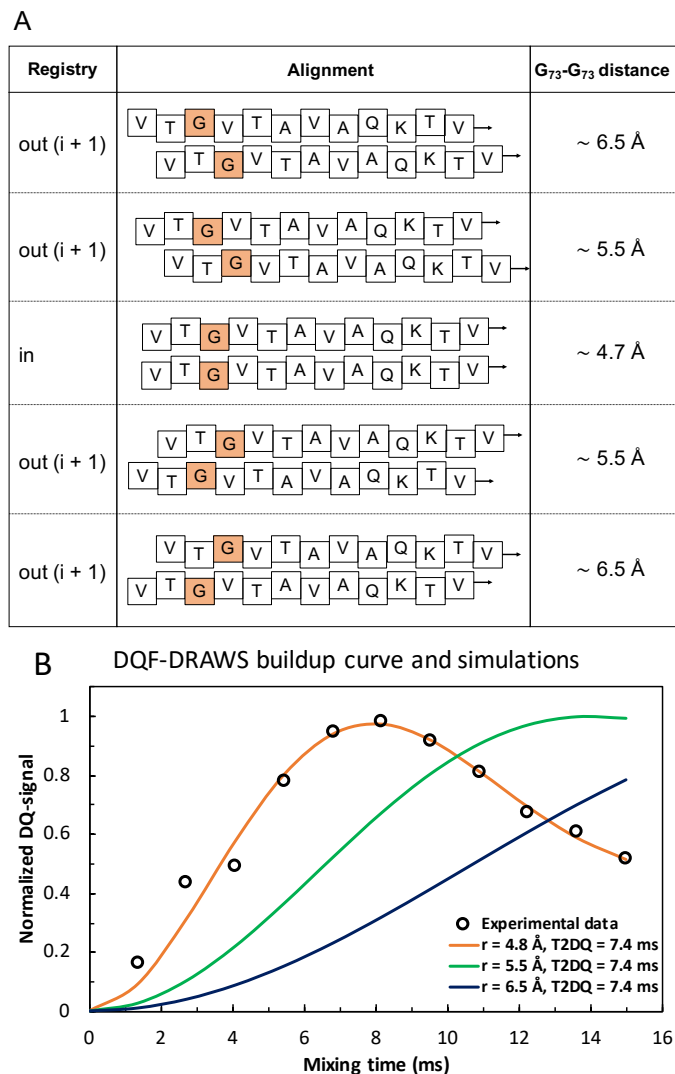


Figure 6.2. (A) Structural models of a parallel alignment of in-register and out-of-register (i + 1) β -sheet protofibrils. Orange labels correspond to $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Gly residues. Inter-residue distances r were found in the literature³⁴⁻³⁵. (B) DQF-DRAWS experiments for $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Gly₇₃-AS₇₁₋₈₂ demonstrate a 4.8-Å distance at this position (orange buildup curve), additional simulations for out-of-register distances are displayed (green and blue buildup curves for 5.5 and 6.5 Å, respectively). Data shown are the mean for four measurements. Simulations were run taking into account a three-spin “infinite loop” model, to account for the two homonuclear interactions a given spin goes under in an amyloid fibril²⁰⁻²².

DQF-DRAWS results indicate that the distance r between two $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Gly₇₃-labeled adjacent β -strands corresponds to 4.8 Å, indicative of an in-register parallel β -sheet structure. The fact that AS₇₁₋₈₂ forms such a configuration reinforces the idea that this peptide constitutes a good model of AS, since AS also adopts an in-register parallel β -sheet in its fibrillar form⁴⁰⁻⁴¹.

6.5.2 The effect of AS₇₁₋₈₂ on lipid membranes

When heated, lipid bilayer membranes exhibit certain thermotropic behavior. The main phase transition, or gel-to-fluid phase transition, involves disordering of the acyl chains and an increase in membrane fluidity. It is then often referred to as chain fusion (melting). The phase transition temperature, T_m , depends on the type of lipid headgroup and chain structure (length and presence of insaturations).

In order to probe interactions between AS₇₁₋₈₂ and model membranes, several phospholipid mixtures have been used. This allowed varying the value of T_m , then probing the influence of membrane fluidity on the peptide structure and thermal behavior. To that purpose, two types of zwitterionic phospholipids have been used: DMPC (14:0-14:0, $T_m = 24$ °C) and DPPC (16:0-16:0, $T_m = 41$ °C), with DMPG (14:0-14:0, $T_m = 24$ °C) as an anionic phospholipid. When mixing these two types of phospholipid, the resulting T_m corresponds to the average of the corresponding T_m of the phospholipids. Varying the phospholipids with regards to their acyl chain length allows generating model membranes with different T_m values. Nevertheless, this description is only valid for phospholipids with chains similar enough to form homogeneously mixed membranes. If two phospholipids are unable to mix due to a hydrophobic core thickness mismatch, two values of T_m are observed corresponding to two lipid populations.

The $\nu_s(\text{CH}_2)$ or $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ vibrations are well-known probes of the conformational state of the acyl chains. Plotting the position of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ or $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ bands as a function of temperature allows monitoring the lipid phase transition. At a molecular level, it corresponds to CH_2 groups of the acyl chains going from a majority of *trans* conformers to a majority of *gauche* ones, which spectroscopically translates into a steep increase in $\nu_s(\text{CH}_2)$ wavenumbers⁴²⁻⁴⁶. The position of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ band then provides information relative to the chain conformational order. The use of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ band is usually favored with regards to $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ as protein amino acid sidechain vibrations may contribute to the latter band.

Figure 6.3A displays the $\nu_s(\text{CH}_2)$ thermotropism curves of DMPC:DMPG mixtures (1:1) at AS₇₁₋₈₂:PL ratios of 1:5:5 and 1:10:10. For this lipid mixture, T_m is 24 °C (T_m for

both pure lipid bilayers is 24 °C). When comparing the curves corresponding to membranes with or without AS₇₁₋₈₂, it can be seen that T_m is not modified and the shape of the curve is not impacted by AS₇₁₋₈₂. This indicates that AS₇₁₋₈₂ does not alter the cooperativity of the lipid phase transition. The difference in $\nu_s(\text{CH}_2)$ values for different samples at given temperatures lies within the experimental uncertainty and it is then reasonable to assume that there is no significant impact of the peptide on the lipid chain (dis)order.

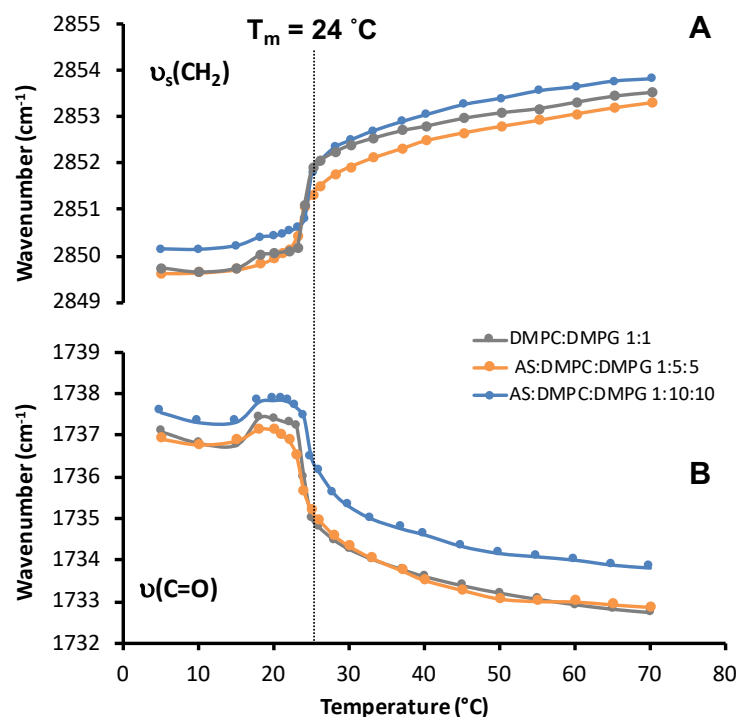


Figure 6.3. Thermotropic curves of the DMPC:DMPG (1:1) and AS₇₁₋₈₂:DMPC:DMPG at P:L of 1:5:5 and 1:10:10. (A) Position of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ band maximum as a function of temperature. (B) Position of the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band maximum as a function of temperature.

While the $\nu(\text{CH}_2)$ bands characterize the conformation of the hydrophobic chains, the carbonyl ester stretching $\nu(\text{C}=\text{O})$ band informs about the hydration of the membrane interfacial region. It is made of two components and thus appears as an asymmetrical band⁴⁷⁻⁴⁸. The high wavenumber sub-band corresponds to dehydrated (non hydrogen-bonded) carbonyl groups while the one at lower wavenumbers corresponds to hydrated (hydrogen-bonded) carbonyl groups. The $\nu(\text{C}=\text{O})$ position is thus indicative of the level of hydration of carbonyl groups.

Inversely to the $\nu_s(\text{CH}_2)$ band, when the phase transition temperature (T_m) is reached, the position of the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band redshifts because a majority of the glycerol groups becomes more hydrated due to the lateral expansion of the lipids, which translates spectroscopically to a sudden and steep increase in the low-frequency component, then downshifting the band maximum. The main phase transition is preceded by another small thermal effect called the pretransition as reflected by the increase in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ position⁴⁹. This phenomenon is due to the conversion of the gel phase to the so-called rippled phase, a hexagonal arrangement of the acyl chains, tilting from 35° with regards to the bilayer normal, to 0° . It involves an out-of-plane rearrangement, going from a one-dimensional lamellar lattice to a two-dimensional similar lamellar lattice, perturbed by a periodic ripple of the phospholipids which is reflected by a change in the glycerol moiety⁵⁰⁻⁵¹.

As can be seen in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ thermotropism curves of Figure 6.3B, the curves are very similar in the absence and presence of AS₇₁₋₈₂, showing that the hydration is very similar in the absence and the presence of AS₇₁₋₈₂ in both the gel and fluid phases and that the thermotropic behavior of the lipids is unchanged.

We used solid-state NMR to study the impact of AS₇₁₋₈₂ on the polar head group of PC:PG membranes. This technique provides information on the dynamics and morphology of the membranes via the study of phosphorus (^{31}P) nuclei⁵². Recently, a pseudo two-dimensional pulse sequence, based on the ROCSA (recoupling of the chemical shift anisotropy) pulse sequence⁵³, and dubbed PROCSA (phosphorus ROCSA) was published²⁴. This pulse sequence allows the determination of the isotropic chemical shifts on the direct dimension, and the recoupled anisotropic chemical shifts (powder spectra) on the indirect dimension under magic-angle spinning (MAS). This pulse sequence has been employed to study phospholipid phases in bacterial membrane mimics and to probe interactions of a membrane-binding peptide involved in the cell membrane repair process⁵⁴. The results obtained for DMPC:DMPG membranes while interacting with AS₇₁₋₈₂ are presented in Figure 6.4A for the direct dimension spectra and Figure 6.4B for the indirect dimension recoupled spectra. The corresponding two-dimensional ^{31}P - ^{31}P PROCSA spectra are displayed in Figure S6.14.

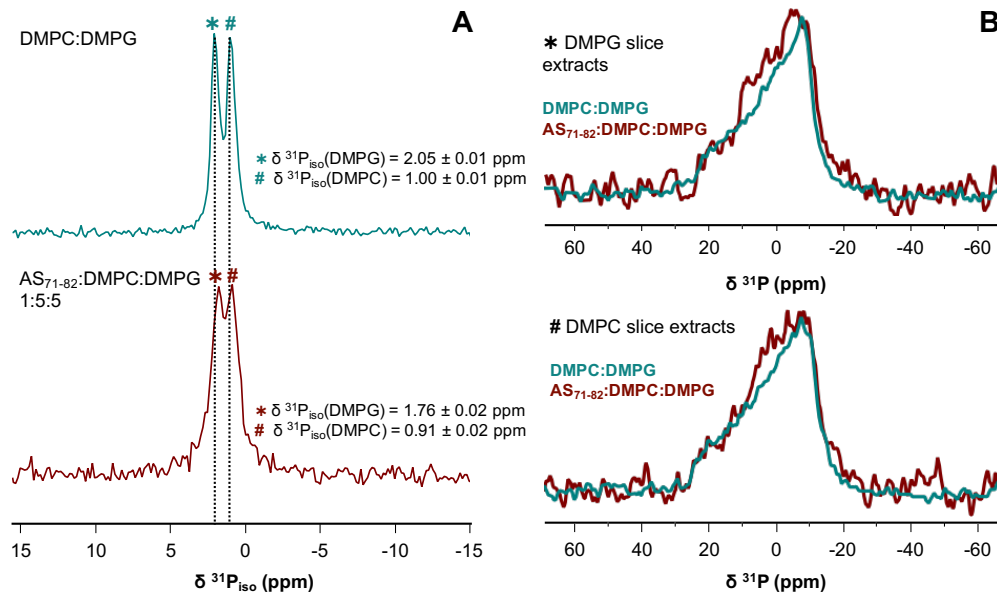


Figure 6.4. (A) PROCSA direct dimension sum spectra and (B) ^{31}P slices extracted from the 2D PROCSA spectra of DMPC:DMPG 1:1 and AS₇₁₋₈₂:DMPC:DMPG 1:5:5, at 37 °C ($\nu_{MAS} = 6$ kHz). Values of δ^{31P}_{iso} and deviation were obtained with three separate experiments for the DMPC:DMPG mixture and the AS₇₁₋₈₂:DMPC:DMPG mixture. Slices were extracted at the isotropic chemical shifts from (A).

Even though the presence of AS₇₁₋₈₂ fibrils alters the spectra resolution, as was observed in static ^{31}P ssNMR¹³, conclusions can still be drawn. First, the ΔCSA seem equivalent for both phospholipid powder spectrum with and without AS₇₁₋₈₂ ($\Delta\text{CSA} \approx 45$ ppm for DMPC and ≈ 42 ppm for DMPG). Second, despite the lower spectral resolution, both the recoupled powder spectra of DMPC and DMPG reveal an impact of AS₇₁₋₈₂ on the lipid membranes. One can observe in particular that the powder spectra are higher at their center, a phenomenon observed in static ^{31}P spectra of membranes composed only of POPC or POPG upon interactions with AS₇₁₋₈₂¹³. This spectral feature indicates more spherical vesicles with AS₇₁₋₈₂, i.e. less prone to deformation induced by the magnetic field. This pattern broadening could reveal a rigidification of the membranes upon interaction with AS₇₁₋₈₂, although not detected by IR. This particular feature suggests a close vicinity of the fibrils to the membrane surface. Third, the isotropic chemical shift of each phospholipid (δ^{31P}_{iso}) reveals that AS₇₁₋₈₂ interacts more favorably with DMPG ($\Delta\delta^{31P}_{iso}$ of ~ -0.3 ppm, against a $\Delta\delta^{31P}_{iso}$ of ~ -0.1 ppm for DMPC). This result indicates that the polar headgroup of DMPG is more impacted than that of DMPC in the presence of AS₇₁₋₈₂. This was expected given the electrostatic

interaction between the anionic polar headgroup of DMPG and the positively charged AS₇₁₋₈₂.

82.

As a parallel in-register configuration of the β -strands along the fibrils would create a lysine (K⁸⁰) ladder, one can wonder whether AS₇₁₋₈₂ would induce lipid segregation via the formation of DMPG domains aligned with the fibrils, similarly to what has been reported for antimicrobial peptides⁵⁵⁻⁵⁶. In order to address this possibility, mixtures of DMPG with perdeuterated-chain DMPC and DPPC were used to independently study the thermal behavior of DMPG and DMPC/DPPC using the $\nu_s(\text{CH}_2)$ and $\nu_s(\text{CD}_2)$ bands, respectively. The CD elongation vibrations ($\nu_s(\text{CD}_2)$, $\nu_{\text{as}}(\text{CD}_2)$, $\nu_s(\text{CD}_3)$ and $\nu_{\text{as}}(\text{CD}_3)$) region spans the spectral domain 2000-2200 cm^{-1} .

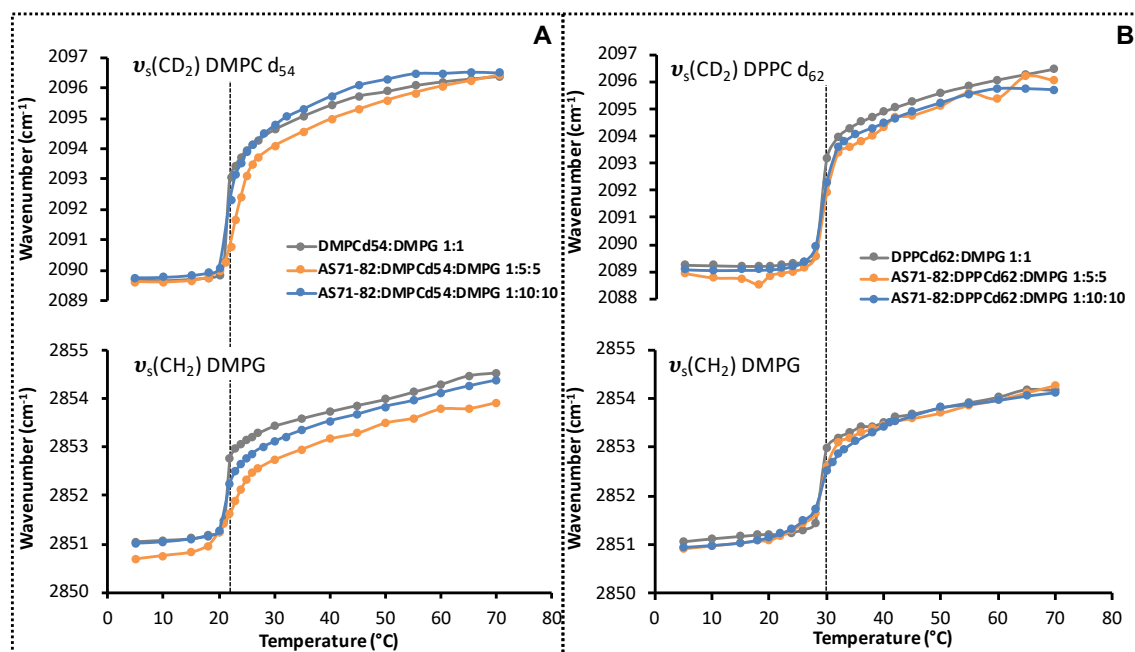


Figure 6.5. Thermotropic curves of DMPC(d_{54}):DMPG (A) and DPPC(d_{62}):DMPG (B) mixtures in presence and in absence of AS₇₁₋₈₂. T_m is similarly represented by a vertical dotted line in (A) and (B).

Figures 6.5A and 6.5B display the thermotropic curves of DMPC(d_{54}):DMPG and DPPC(d_{62}):DMPG mixtures, respectively, in the presence and absence of AS₇₁₋₈₂. The $\nu_s(\text{CH}_2)$ curve of DMPG is highly similar to the $\nu_s(\text{CD}_2)$ one of DMPC- d_{54} in the presence of AS₇₁₋₈₂, showing that the two lipids form a homogeneous mixture (Figure 6.5A). This conclusion is

also true for DPPC(d_{62}):DMPG membranes (Figure 6.5B). These data thus suggest no phase separation between PC and PG and indicate that, if segregation would take place, it would do it at a level such that it does not impact the phospholipid phase transition.

6.5.3 The effect of lipid membranes on the structure of AS₇₁₋₈₂

A close inspection of the amide I' band reveals a subtle but significant and reproducible shift with temperature of the main component near 1619 cm^{-1} (Figure 6.6A). Figure 6.6B shows the plot of the amide I' band maximum, $\nu(\text{Am I}')$, as a function of temperature upon heating and subsequent cooling. An unusual thermal behavior, which is absent with pure DMPG membranes (Figure S6.15), is observed with phospholipid-mixture membranes. From a general perspective, the $\nu(\text{Am I}')$ of peptides and proteins often increases slightly with temperature in a linear manner, but this does not necessarily reflect any structure modification. Shifts to higher wavenumber in the $5\text{-}18^\circ\text{ C}$ range have been reported for several proteins, an effect that has been assigned to changes in solvent dielectric properties⁵⁷.

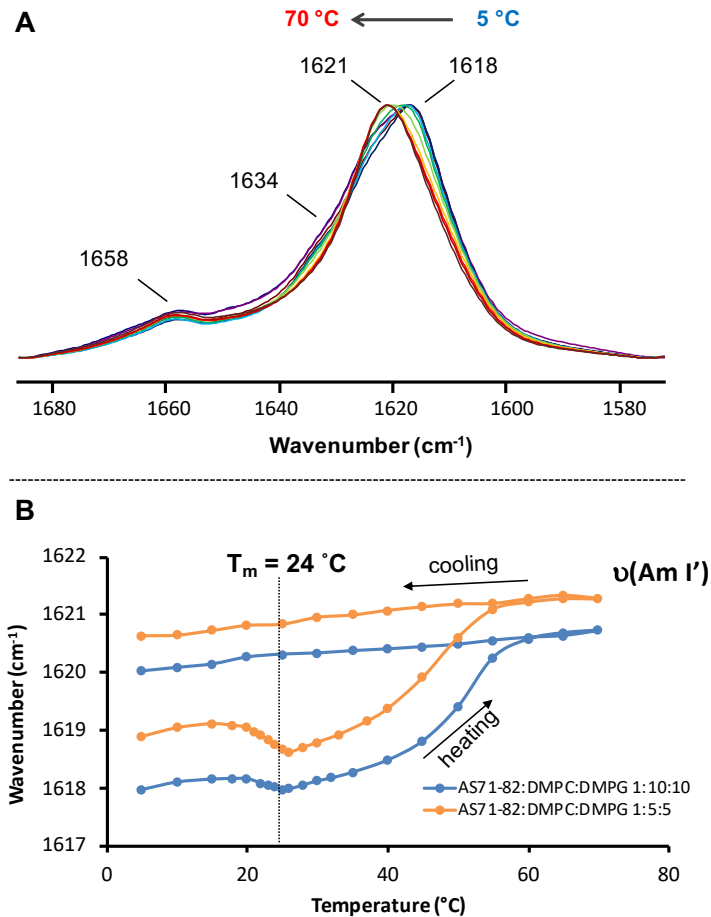


Figure 6.6. (A) Amide I' band of AS₇₁₋₈₂, at AS₇₁₋₈₂:DMPC:DMPG 1:5:5. (B) Plots of the amide I' band maximum position as a function of temperature for AS₇₁₋₈₂:DMPC:DMPG 1:5:5 and AS₇₁₋₈₂:DMPC:DMPG 1:10:10. spectra are normalized with respect to the amide I' band maximum $\nu(\text{Am I}')$.

In the present case, $\nu(\text{Am I}')$ increases linearly between 5 and 19 °C probably due to a similar solvent dielectric effect. However, above 19 °C, the band shifts to lower wavenumbers, with a minimum at 24 °C. Interestingly, the temperature range corresponding to the decrease in $\nu(\text{Am I}')$ encompasses the main phase transition of the phospholipid, the minimum corresponding exactly to T_m . This observation intriguingly suggests that the secondary structure of AS₇₁₋₈₂ is affected by the lipid phase transition during heating. At temperature higher than T_m , a second thermal event occurs up to 55 °C as proved by the increases in $\nu(\text{Am I}')$. This increase is followed by a plateau up to 70 °C. Subsequent cooling induces a continuous linear decrease of $\nu(\text{Am I}')$ suggesting no structural rearrangement of the peptide.

To ascertain the influence of the lipid phase transition on the AS₇₁₋₈₂ structure and reject the hypothesis that it could simply reflect a temperature effect, membranes composed of a mixture of DPPC and DMPG were studied. As mentioned above, mixing phospholipids with different acyl chain lengths results in a T_m corresponding to the mean T_m of both phospholipids if they are correctly mixed and do not form domains⁵⁸.

Figure 6.7A and 6.7B displays the thermotropic curves ($\nu_s(\text{CH}_2)$ and $\nu(\text{C=O})$, respectively) of DPPC:DMPG mixtures (1:1) at ratios of AS₇₁₋₈₂:PL of 1:5:5 and 1:10:10. DPPC:DMPG membrane mixtures display a T_m of 31.5° C with a steep increase and decrease of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ and $\nu(\text{C=O})$ curves, respectively, showing a high cooperativity of the phase transition. Only a single phase transition is identifiable. T_m corresponds to the mean T_m values of DMPG (24 °C) and DPPC (41 °C), which indicates that the phospholipids are completely mixed despite the difference in the acyl chain lengths of the two lipids. However, the pretransition disappears in this case.

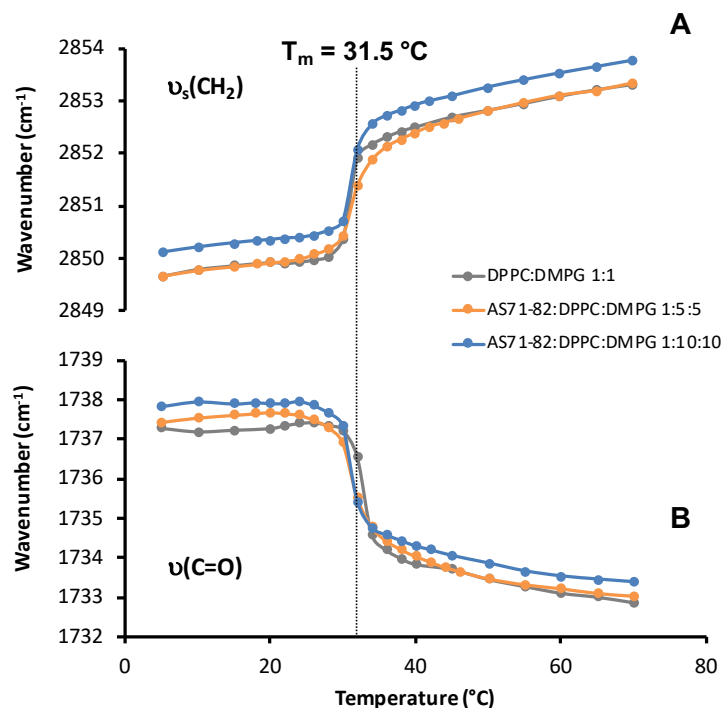


Figure 6.7. Thermotropism curves of the DPPC:DMPG (1:1) and AS₇₁₋₈₂:DPPC:DMPG at P:L of 1:5:5 and 1:10:10. (A) Position of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ band maximum as a function of temperature. (B) Position of the $\nu(\text{C=O})$ band maximum as a function of temperature.

Similarly to the DMPC:DMPG mixture, the DPPC:DMPG bilayers are not significantly impacted by the presence of AS₇₁₋₈₂. As can be seen in Figures 6.7A and 6.7B, T_m is not affected by the presence of AS₇₁₋₈₂. Moreover, the acyl chain order and level of hydration of the membranes are basically similar in the absence and in the presence of AS₇₁₋₈₂, in both the gel and the fluid phases. The phospholipid phase transition cooperativity is not impacted either.

Figure 6.8 displays the amide I' band position of AS₇₁₋₈₂, $\nu(\text{Am I}')$, upon interactions with DPPC:DMPG membranes. The same kind of temperature-dependence than for DMPC:DMPG mixtures is observed. There is first a linear increase in $\nu(\text{Am I}')$ and then a decrease when the temperature approaches T_m . This behavior reveals a small rearrangement of the β -sheet structure of AS₇₁₋₈₂ that is modulated by the phase transition, i.e. by the physical state of the membranes. Above T_m , $\nu(\text{Am I}')$ increases until ~ 50 °C where a plateau is again reached. Then, $\nu(\text{Am I}')$ decreases upon cooling. These experiments show that the peptide is the subject of two conformational events upon heating in the presence of PC-PG lipid mixtures: one induced by the lipid phase transition and another one due to heating.

It is noteworthy that the structural rearrangement induced by the gel-to-fluid phase transition most probably also takes place during sample preparation, during which samples are heated 10 °C above T_m to fully hydrate the lipids (35 °C for DMPC:DMPG and 43 °C for DPPC:DMPG). At this stage, the peptide conformational rearrangement is reversible. However, as seen in Figures 6.6B and 6.8, the phenomena are irreversible above 50-55 °C.

Even though the shifts observed at T_m for $\nu(\text{Am I}')$ seem small, they could reveal important morphological modifications. We recently observed that in certain conditions similar IR spectra correspond to AS₇₁₋₈₂ fibrils with opposite supramolecular chiralities¹⁴. This advocates for IR being a powerful probe of local secondary structures but may lack to seize the overall fibrillar architecture.

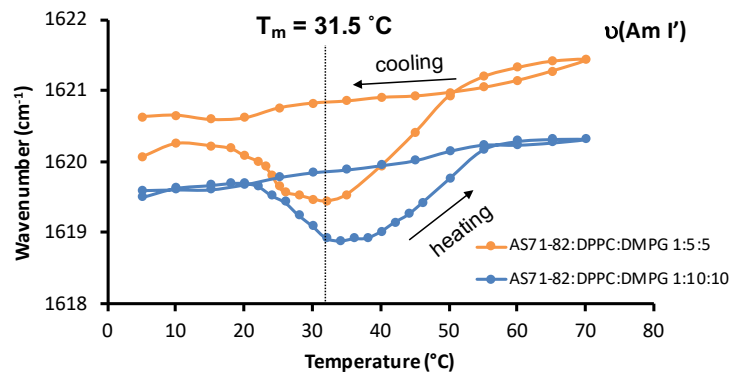


Figure 6.8. Plots of the amide I' band maximum position as a function of temperature for AS₇₁₋₈₂:DPPC:DMPG 1:5:5 and AS₇₁₋₈₂:DPPC:DMPG 1:10:10.

6.5.4 Structural rearrangements of AS₇₁₋₈₂ β -sheets induced by the lipid phase transition and temperature

In order to gain further insights into the structural alterations that occur upon the lipid phase transition, we proceeded to second derivative calculations of the amide I' band (Figure 6.6A), a method that has proved to be powerful for the investigation of proteins and peptides, especially for amyloid cross-seeding experiments⁵⁹.

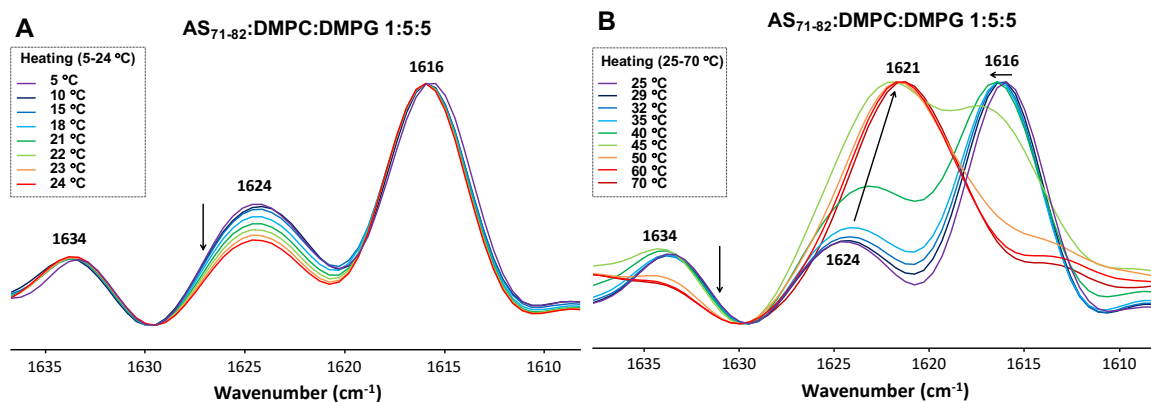


Figure 6.9. Secondary derivatives of the amide I' band of AS₇₁₋₈₂:DMPC:DMPG 1:5:5 displayed at Figure 6.6A. Secondary derivatives are presented (A) below T_m (5-24 °C) and (B) above T_m (25-70 °C). Spectra are normalized with respect to the component at 1616 cm^{-1} .

The secondary derivatives of the amide I' band of AS₇₁₋₈₂:DMPC:DMPG mixtures are presented in Figure 6.9. These spectra reveal the presence of three components at 1616, 1621-

1624 and 1634 cm^{-1} . The two former components correspond to wavenumbers usually associated with intermolecular β -sheet structures found in amyloids and protein aggregates^{12,27,29,60}. They show that the β -sheet band at 1618-1621 cm^{-1} observed in the raw spectra (Figure 6.6A) is actually composed of two components. They most likely represent two closely-related in-register β -sheet populations. The component at 1634 cm^{-1} , that corresponds to a low intensity shoulder on the amide I' bands in Figure 6.6A, is less encountered in amyloids and is usually assigned to regular (not intermolecular) β -sheets.

The intensity ratio of these two populations evolves with temperature. The component at 1616 cm^{-1} is predominant at 5 °C, although the one at 1624 cm^{-1} is clearly present. Upon heating, and until T_m , the 1624- cm^{-1} component slightly decreases relatively to the one at 1616 cm^{-1} (Figure 6.9A). The intensity ratio is minimal at T_m . No band shift is observed in this temperature range. Once T_m is reached (Figure 6.9B), and up to 70 °C, several spectral phenomena can be observed. First, the ratio between the intensity of the band at 1624 and 1616 cm^{-1} increases. Then, one can observe a band shift accompanying the bands ratio increase, from 1624 to 1621 cm^{-1} . Finally, the bands at 1616 and 1634 cm^{-1} disappear simultaneously at about 50 °C, showing that these two bands are correlated and are components of the same β -sheet structure. From ~50 °C and above, only the band at 1621 cm^{-1} remains. The spectrum at 10 °C after heating also gives rise to a single component near 1621 cm^{-1} , suggesting no conformational rearrangement upon cooling.

The presence of three components in the amide I region reveals the presence of amino acids adopting two subtly different in-register β -sheet arrangements (thereafter called conformers). The low intensity and high frequency of the 1634- cm^{-1} component suggests that it could correspond to 1-2 amino acid(s) adopting a loose β -sheet conformation, probably more exposed to water, which is likely to be present at one end of the β -strands. This component is intimately associated with the 1616- cm^{-1} band, and they represent one of the two β -sheet conformers (conformer C1). The second one (conformer C2) is represented by the 1624- cm^{-1} band. The two conformers coexist at most temperatures, although C2 forms a unique population above 50-55 °C. As judged from its intensity below T_m , the 1624- cm^{-1}

component should represent 2-3 amino acids in this temperature range. The conversion from C1 to C2 occurs upon heating above T_m .

The low temperature conformer C1 seems to be easily perturbed as it is influenced by the lipid phase transition only, i.e. by membrane fluidity. The increase in membrane fluidity promotes C1 (partial C2→C1 conversion) as seen by the intensity decrease of the 1624-cm⁻¹ component upon heating below T_m . By contrast, the complete conversion from C1 to C2 first requires that the system is in the fluid phase, and second, high temperatures (50-55 °C).

The conformer transition might be rationalized as follows: upon lipid chain melting and higher polar head hydration, degree of freedom is provided to the peptide fibrils so that C1 is favored at the expense of C2. As temperature increase above T_m , the “loose” amino acid(s) located at the peptide end could progressively toe the line and become part of the more rigid β -sheets. Membrane fluidity and temperature would allow for a β -sheet sliding of the protofibrils⁶¹ and/or the formation of more stable fibrils. This hypothesis of hydrated amino acids adopting a loose β -sheet conformation at the end of each β -strand is supported by the shift of the 1635-cm⁻¹ component to 1639 cm⁻¹ after freeze-drying (Figure S6.10). Moreover, the shift of this component observed between Figure 6.1A, 6.1B and 6.1C (1634, 1637 and 1635 cm⁻¹, respectively) suggests a close vicinity of these residue(s) with Gly₇₃, which when 1-¹³C-labelled, impacts the intra-strand ¹²C coupling. This loose β -sheet conformation is thus more likely to be present at the N-terminal end of the strand. Then, the formation of a hydrophobic core composed by all amino acids, after the phospholipids phase transition, would compose a unique β -sheet population, coherent with the only 1621-cm⁻¹ β -sheet component remaining at 70° C. This figure unambiguously shows that change of the membrane physical state triggers a structural rearrangement. It should be noted that the 1592-cm⁻¹ component observed in Figure 6.1B and associated to 1-¹³C-Gly₇₃ does not significantly shift upon heating (data not shown), only a slight shift being observed above 65°C.

The conclusion from IR data is that membrane fluidity and temperature modulate the structure of AS₇₁₋₈₂ and allow for a more stable and more energetically favored form. The fluidity of the membranes would allow a better anchorage of AS₇₁₋₈₂ fibrils around the anionic cloud carried on the phosphate group of DMPG phospholipids, mostly via the positively

charged lysine sidechain (K⁸⁰). Lysine residues have proved to play an important role in membrane insertion of proteins⁶². Lysine sidechain ($-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_3^+$) would be sufficiently long to insert below the glycerol headgroup and be stabilized by the negative charge carried on the phosphate group. Despite lysine residues being generally considered as an aggregation breaker⁶³, K⁸⁰ could here be the starting point of aggregation by anchoring its sidechain at the interfacial level of the lipid bilayer, and later by acting as an aggregation nucleus. This electrostatic interaction of lysine residues with anionic phospholipids has been observed at the atomic level in a physiological situation for AS⁶⁴.

6.6 Conclusions

The amyloid peptide AS₇₁₋₈₂ forms fibrils in the presence of model membranes, but only with anionic ones. IR revealed a parallel β -sheet structure of AS₇₁₋₈₂ in that case. ¹³C-labelling on the peptide bond carbonyl of Gly₇₃ was used to carry out an IR investigation of the β -sheet structure geometry at the atomic level, as well as ssNMR DQF-DRAWS experiments. IR then revealed a strong coupling of the Gly₇₃ residues of adjacent strands in AS₇₁₋₈₂ fibrils. These results suggest a close vicinity of Gly₇₃ residues in adjacent β -strands in AS₇₁₋₈₂ fibrils, which is consistent with an in-register configuration. This conclusion was validated by the ssNMR DQF-DRAWS experiments, which revealed an inter-residue distance of 4.8 Å, typical of amyloid fibrils interstrand distance.

The instantaneous change of structure from random coil to in-register parallel β -sheet is almost unambiguously caused by the electrostatic interaction between AS₇₁₋₈₂ which carries a net charge of (+1) at pH 7.0, and the negative charge of DMPG phospholipids composing the model membranes, as suggested by the PROCSA experiments. Electrostatic interactions are a well-known amyloid aggregation driver, which is particularly true for AS^{9,65-70}.

Besides surface electrostatic density, lipid composition of membranes also drives membrane fluidity. The latter has proved to be of great importance for protein binding, and AS is no exception^{9,71-72}. More particularly, Stöckl *et al.* have shown that AS binds to membranes with anionic phospholipids located in fluid-state membrane domains⁷¹. Similarly, AS₇₁₋₈₂ binds preferentially to anionic phospholipids as revealed by ³¹P ssNMR, even if the membranes are only partially composed of anionic phospholipids, as AS₇₁₋₈₂ does not

particularly interact with fully zwitterionic model membranes¹³. Here, we demonstrated that AS₇₁₋₈₂, similarly to AS, is sensitive to the physical state of membranes.

As proved by ³¹P ssNMR, AS₇₁₋₈₂ interacts closely with the membranes, as attested by the impact of AS₇₁₋₈₂ discussed above. Yet, IR indicates no specific perturbations of the membrane hydration nor hydrophobic core order upon interactions with AS₇₁₋₈₂. These results, when looked at altogether, suggest a close vicinity of the peptide to the membrane surface, it thus seems logical that phase transition alters AS₇₁₋₈₂ β -sheet structure. Moreover, and despite the fact that this change observed by IR seems slight, we recently observed via vibrational circular dichroism that highly similar IR spectra, if not identical, correspond to amyloid fibrils with opposite morphology¹⁴. The change in $\nu(\text{Am I}')$ position could thus reveal important morphological changes. Even though amyloid fibrils can be perceived as extremely stable structures, they are often prone to dynamical rearrangement, such as an antiparallel structure turning to a parallel structure over time²¹, or fibrillar supramolecular chirality reversal following external stimuli⁷³. Similarly, in this case, membrane phospholipids phase transition could act as the external stimuli triggering the structural rearrangement.

The similarities pointed out between AS₇₁₋₈₂ and AS, turn into arguments in favor of AS₇₁₋₈₂ being able to interfere with AS aggregation, if correctly chemically modified, as was proposed in the past⁷⁴, and again recently⁷⁵. More particularly, with three threonine residues in its primary sequence, AS₇₁₋₈₂ is a particularly good candidate to display aggregation inhibition properties, as was demonstrated recently with the addition of N-acetylglucosamine to threonine residues of modified AS peptides⁷⁶.

6.7 Author contributions

Conceptualization: TL MA.

Formal analysis: BM GRM TL PA NV.

Funding acquisition: MA NV.

Investigation: BM GRM.

Methodology: BM GRM TL PA NV MA.

Project administration: MA NV.

Resources: MA NV.

Supervision: TL MA NV.

Validation: TL MA NV.

Writing – original draft: BM.

Writing – review & editing: BM GRM TL NV.

6.8 Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, the Fonds de recherche du Québec-Nature et Technologies (FRQ-NT), and Université Laval. The Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), the Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), the Centre québécois sur les matériaux fonctionnels (CQMF), are acknowledged for the infrastructure provided to us. PROTEO and CQMF are supported by FRQ-NT. B.M. is the recipient of graduate scholarships from Bionano (NSERC) and PROTEO. The authors sincerely thank Prof. J. R. Long (University of Florida) for providing the DQF-DRAWS pulse sequence and insightful advices. The authors thank R. Janvier (Université Laval) for the transmission electron microscopy measurements.

6.9 Supplementary information

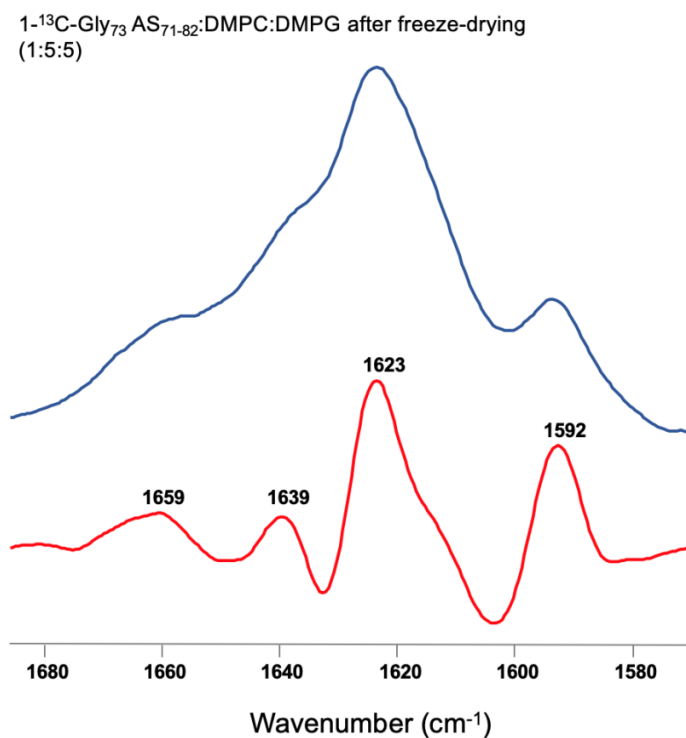


Figure S6.10. Amide I band of 1-¹³C-Gly₇₃ AS₇₁₋₈₂:DMPC:DMPG 1:5:5 and its second derivative after freeze-drying prior to the DQF-DRAWS experiments. The structure of 1-¹³C-Gly₇₃ AS₇₁₋₈₂ is not altered when compared to its in-solution structure, exception being made for the 1639 cm⁻¹ component. The higher wavenumber than in solution (1634 cm⁻¹) is consistent with the assignment of this component to hydrated β -sheet amino acids and dehydration upon the freeze-drying process.

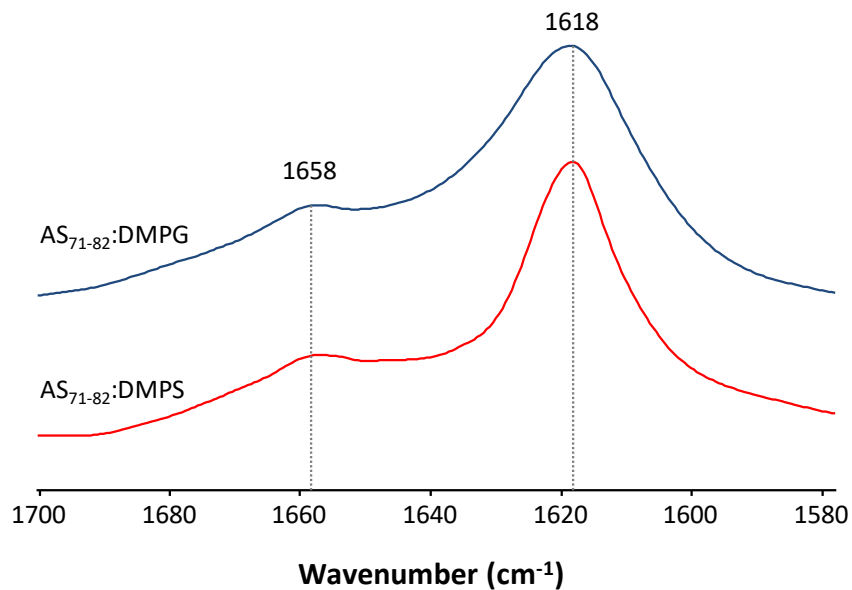


Figure S6.11. Amide I band of AS₇₁₋₈₂:DMP5 and AS₇₁₋₈₂:DMPG. The 1618-cm⁻¹ component corresponds to β -sheet, and the absence of component above 1680 cm⁻¹ indicates a parallel β -sheet. The 1658-cm⁻¹ component corresponds to the glutamine sidechain vibration.

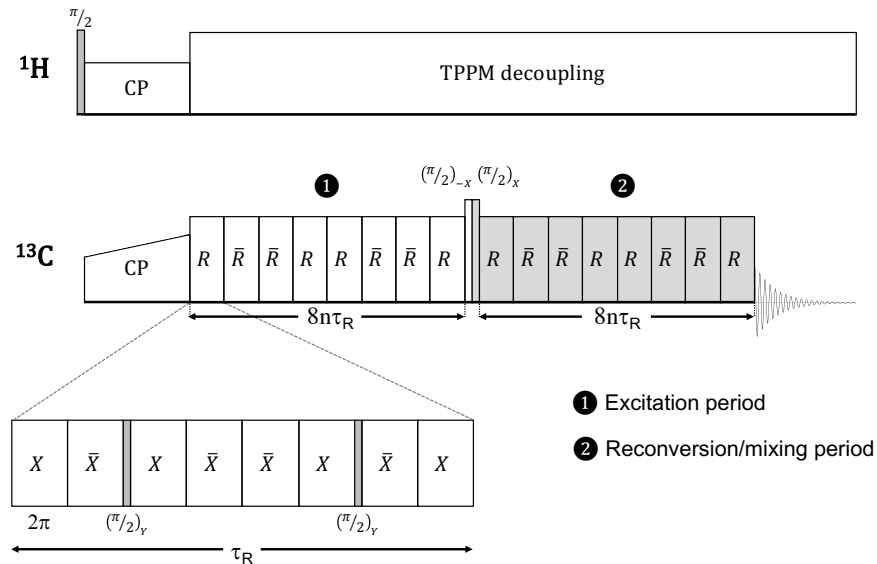


Figure S6.12. DQF-DRAWS pulse sequence as implemented. R represents a pulse supercycle, \bar{R} is the same supercycle with inverted phases. The double quantum coherence is developed during the excitation period, and then converted in a measurable (single quantum) signal during the reconversion/mixing period. Build-up curves were obtained by incrementing n between 1 and 11, corresponding to mixing times from 0 to 15 ms. Phase-cycling was implemented to isolate the desired double quantum coherence signal from single quantum signal.

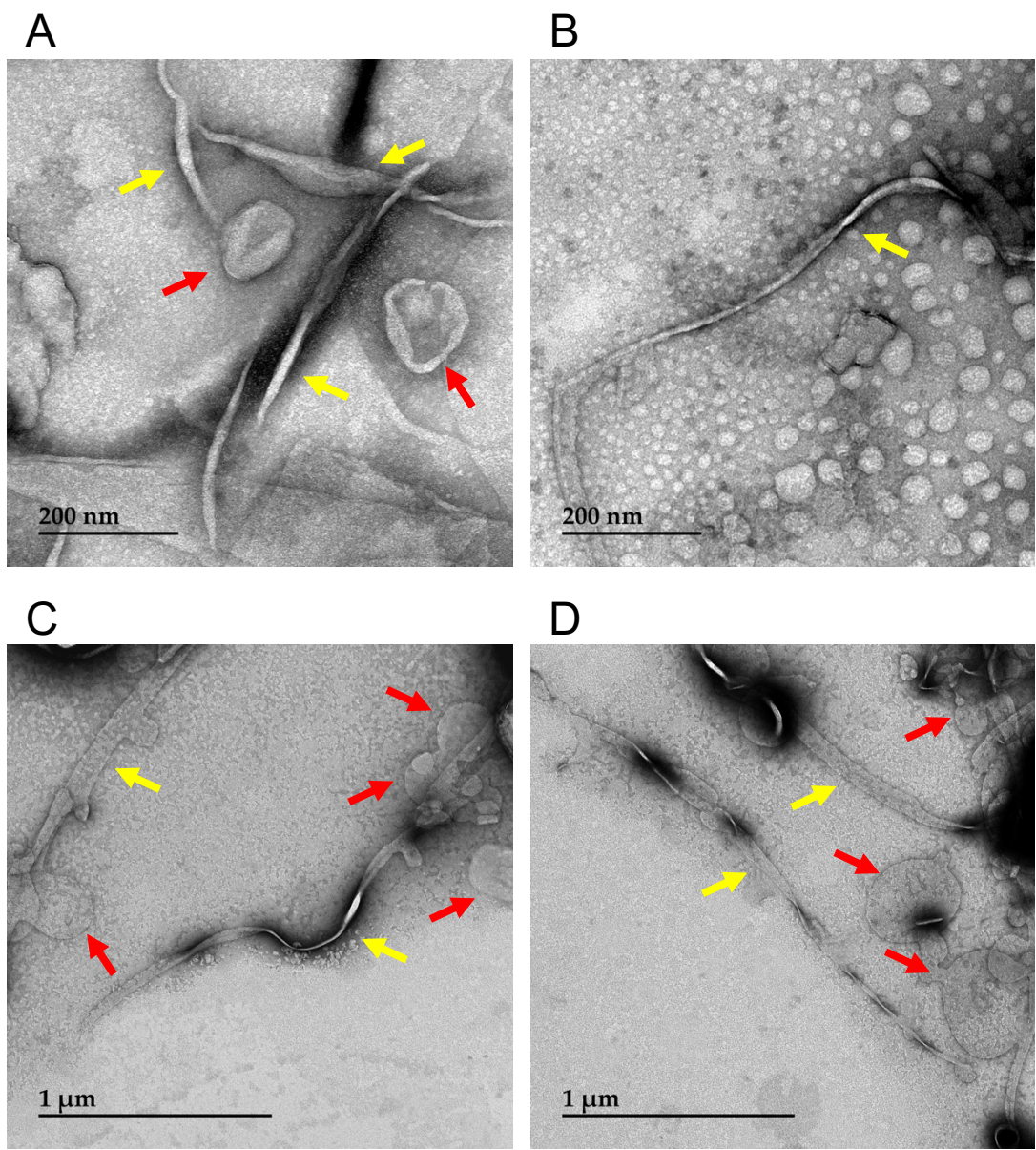


Figure S6.13. Electron micrographs of AS₇₁₋₈₂ upon interaction with DMPC:DMPG MLVs (A) & (B), and with DPPC:DMPG MLVs (C) & (D). Yellow arrows point to AS₇₁₋₈₂ fibrils and red arrows point to the lipid vesicles.

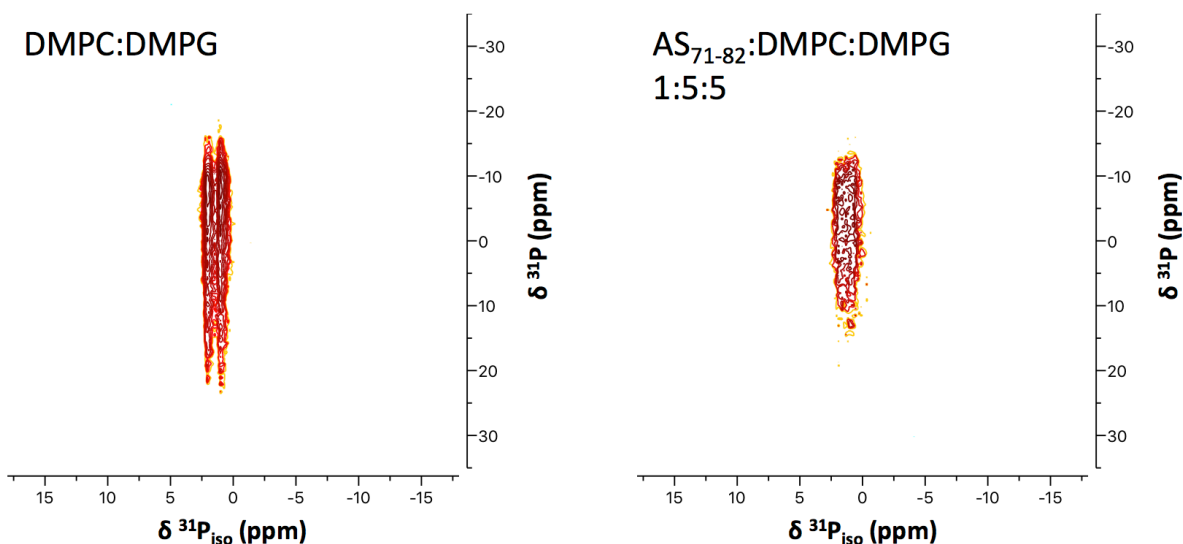


Figure S6.14. Two-dimensional ^{31}P - ^{31}P PROCSA spectra for DMPC:DMPG (left) and AS₇₁₋₈₂:DMPC:DMPG (1:5:5, right). Contour levels used for both spectra are the same: 10 positive and 10 negative contours, a 1.20 scaling factor and an intensity threshold of 17.0.

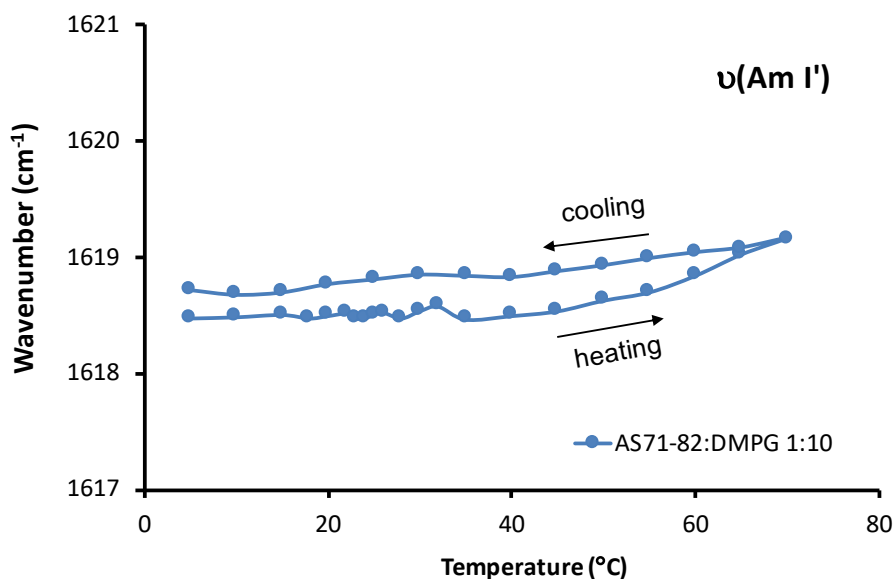


Figure S6.15. Plot of $\nu(\text{Am I}')$ of AS₇₁₋₈₂:DMPG 1:10 as a function of temperature.

6.10 References

1. Spillantini, M. G.; Crowther, R. A.; Jakes, R.; Hasegawa, M.; Goedert, M., α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6469-6473.
2. Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M., α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **1997**, *388*, 839-840.

3. Bendor, J. T.; Logan, T. P.; Edwards, R. H., The function of α -synuclein. *Neuron* **2013**, *79*, 1044-1066.
4. Eliezer, D.; Kutluay, E.; Bussell Jr, R.; Browne, G., Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 1061-1073.
5. Fusco, G.; De Simone, A.; Gopinath, T.; Vostrikov, V.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Veglia, G., Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3827.
6. Vamvaca, K.; Volles, M. J.; Lansbury, P. T., The first N-terminal amino acids of α -synuclein are essential for α -helical structure formation *in vitro* and membrane binding in yeast. *J. Mol. Biol.* **2009**, *389*, 413-424.
7. Iyer, A.; Roeters, S. J.; Kogan, V.; Woutersen, S.; Claessens, M. M. A. E.; Subramaniam, V., C-Terminal truncated α -synuclein fibrils contain strongly twisted β -sheets. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15392-15400.
8. Giasson, B. I.; Murray, I. V. J.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y., A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α -synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2380-2386.
9. Brown, J. W. P.; Buell, A. K.; Michaels, T. C. T.; Meisl, G.; Carozza, J.; Flagmeier, P.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M.; Galvagnion, C., β -Synuclein suppresses both the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation *via* competitive binding to surfaces. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36010.
10. Roberts, H. L.; Brown, D. R., Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α -synuclein. *Biomolecules* **2015**, *5*, 282-305.
11. Tang, M.; Comellas, G.; Rienstra, C. M., Advanced solid-state NMR approaches for structure determination of membrane proteins and amyloid fibrils. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2080-2088.
12. Martial, B.; Lefèvre, T.; Auger, M., Understanding amyloid fibril formation using protein fragments: Structural investigations *via* vibrational spectroscopy and solid-state NMR. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 1133-1149.
13. Bédard, L.; Lefèvre, T.; Morin-Michaud, É.; Auger, M., Besides fibrillization: Putative role of the peptide fragment 71–82 on the structural and assembly behavior of α -synuclein. *Biochemistry* **2014**, *53*, 6463-6472.
14. Martial, B.; Lefèvre, T.; Buffeteau, T.; Auger, M., Vibrational circular dichroism reveals supramolecular chirality inversion of α -synuclein peptide assemblies upon interactions with anionic membranes. *ACS Nano* **2019**, *13*, 3232-3242.
15. Ten Kortenaar, P. B. W.; Van Dijk, B. G.; Peeters, J. M.; Raaben, B. J.; Adams, P. J. H. M.; Tesser, G. I., Rapid and efficient method for the preparation of Fmoc-amino acids starting from 9-fluorenylmethanol. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27*, 398-400.
16. Takamori, S.; Holt, M.; Stenius, K.; Lemke, E. A.; Grønborg, M.; Riedel, D.; Urlaub, H.; Schenck, S.; Brügger, B.; Ringler, P., et al., Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **2006**, *127*, 831-846.
17. Kimura, Y.; Nagai, Y., Infrared spectra of brain phosphatidylserine. *Biochem. J.* **1960**, *77*, 3-4.
18. Mills, F. D.; Antharam, V. C.; Ganesh, O. K.; Elliott, D. W.; McNeill, S. A.; Long, J. R., The helical structure of surfactant peptide KL4 when bound to POPC: POPG lipid vesicles. *Biochemistry* **2008**, *47*, 8292-8300.
19. Bak, M.; Rasmussen, J. T.; Nielsen, N. C., SIMPSON: A general simulation program for solid-state NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 296-330.
20. Caporini, M. A.; Bajaj, V. S.; Veshkort, M.; Fitzpatrick, A.; MacPhee, C. E.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G., Accurate determination of interstrand distances and alignment in amyloid fibrils by magic angle spinning NMR. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 13555-13561.

21. Liang, C.; Ni, R.; Smith, J. E.; Childers, W. S.; Mehta, A. K.; Lynn, D. G., Kinetic intermediates in amyloid assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15146-15149.
22. Gregory, D. M.; Benzinger, T. L. S.; Burkoth, T. S.; Miller-Auer, H.; Lynn, D. G.; Meredith, S. C.; Botto, R. E., Dipolar recoupling NMR of biomolecular self-assemblies: determining inter- and intrastrand distances in fibrilized Alzheimer's β -amyloid peptide. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **1998**, *13*, 149-166.
23. Karlsson, T.; Popham, J. M.; Long, J. R.; Oyler, N.; Drobny, G. P., A study of homonuclear dipolar recoupling pulse sequences in solid-state nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7394-7407.
24. Warschawski, D. E.; Arnold, A. A.; Marcotte, I., A new method of assessing lipid mixtures by ^{31}P magic-angle spinning NMR. *Biophys. J.* **2018**, *114*, 1368-1376.
25. Barth, A., Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073-1101.
26. Kurouski, D.; Kar, K.; Wetzel, R.; Dukor, R. K.; Lednev, I. K.; Nafie, L. A., Levels of supramolecular chirality of polyglutamine aggregates revealed by vibrational circular dichroism. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1638-1643.
27. Labbé, J.-F.; Lefèvre, T.; Guay-Bégin, A.-A.; Auger, M., Structure and membrane interactions of the β -amyloid fragment 25-35 as viewed using spectroscopic approaches. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 7228-7239.
28. Ashburn, T. T.; Auger, M.; Lansbury, P. T., The structural basis of pancreatic amyloid formation: isotope-edited spectroscopy in the solid state. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 790-791.
29. Moran, S. D.; Zanni, M. T., How to get insight into amyloid structure and formation from infrared spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1984-1993.
30. Welch, W. R. W.; Kubelka, J.; Keiderling, T. A., Infrared, vibrational circular dichroism, and Raman spectral simulations for β -sheet structures with various isotopic labels, interstrand, and stacking arrangements using density functional theory. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 10343-10358.
31. Welch, W. R. W.; Keiderling, T. A.; Kubelka, J., Structural analyses of experimental ^{13}C edited amide I' IR and VCD for peptide β -sheet aggregates and fibrils using DFT-based spectral simulations. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 10359-10369.
32. Decatur, S. M., Elucidation of residue-level structure and dynamics of polypeptides via isotope-edited infrared spectroscopy. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 169-175.
33. Tycko, R., Amyloid polymorphism: Structural basis and neurobiological relevance. *Neuron* **2015**, *86*, 632-645.
34. Benzinger, T. L. S.; Gregory, D. M.; Burkoth, T. S.; Miller-Auer, H.; Lynn, D. G.; Botto, R. E.; Meredith, S. C., Propagating structure of Alzheimer's β -amyloid(10-35) is parallel β -sheet with residues in exact register. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 13407-13412.
35. Debelouchina, G. T.; Bayro, M. J.; Fitzpatrick, A. W.; Ladizhansky, V.; Colvin, M. T.; Caporini, M. A.; Jaroniec, C. P.; Bajaj, V. S.; Rosay, M.; MacPhee, C. E., et al., Higher order amyloid fibril structure by MAS NMR and DNP spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19237-19247.
36. Gregory, D. M.; Mehta, M. A.; Shiels, J. C.; Drobny, G. P., Determination of local structure in solid nucleic acids using double quantum nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 28-42.
37. Mehta, M. A.; Eddy, M. T.; McNeill, S. A.; Mills, F. D.; Long, J. R., Determination of peptide backbone torsion angles using double-quantum dipolar recoupling solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2202-2212.
38. Long, J. R.; Mills, F. D.; Raucci, F., A high resolution structure of the putative hinge region in M2 channel-lining segments of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2007**, *1768*, 2961-2970.

39. Fitzpatrick, A. W. P.; Debelouchina, G. T.; Bayro, M. J.; Clare, D. K.; Caporini, M. A.; Bajaj, V. S.; Jaroniec, C. P.; Wang, L.; Ladizhansky, V.; Müller, S. A., et al., Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 5468-5473.
40. Tuttle, M. D.; Comellas, G.; Nieuwkoop, A. J.; Covell, D. J.; Berthold, D. A.; Kloepper, K. D.; Courtney, J. M.; Kim, J. K.; Barclay, A. M.; Kendall, A., et al., Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 409-415.
41. Vilar, M.; Chou, H.-T.; Lührs, T.; Maji, S. K.; Riek-Loher, D.; Verel, R.; Manning, G.; Stahlberg, H.; Riek, R., The fold of α -synuclein fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 8637-8642.
42. Nabet, A.; Auger, M.; Pézolet, M., Investigation of the temperature behavior of the bands due to the methylene stretching vibrations of phospholipid acyl chains by two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 948-955.
43. Kodati, V. R.; El-Jastimi, R.; Lafleur, M., Contribution of the intermolecular coupling and librotorsional mobility in the methylene stretching modes in the infrared spectra of acyl chains. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 12191-12197.
44. Kodati, V. R.; Lafleur, M., Comparison between orientational and conformational orders in fluid lipid bilayers. *Biophys. J.* **1993**, *64*, 163-170.
45. Umemura, J.; Cameron, D. G.; Mantsch, H. H., A Fourier transform infrared spectroscopic study of the molecular interaction of cholesterol with 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1980**, *602*, 32-44.
46. Asher, I. M.; Levin, I. W., Effects of temperature and molecular interactions on the vibrational infrared spectra of phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1977**, *468*, 63-72.
47. Mantsch, H. H.; McElhaney, R. N., Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 213-226.
48. Lewis, R. N.; McElhaney, R. N.; Pohle, W.; Mantsch, H. H., Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 2367-2375.
49. Casal, H. L.; Mantsch, H. H., Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* **1984**, *779*, 381-401.
50. Janiak, M. J.; Small, D. M.; Shipley, G. G., Nature of the thermal pretransition of synthetic phospholipids: dimyristoyl- and dipalmitoyllecithin. *Biochemistry* **1976**, *15*, 4575-4580.
51. Heimburg, T., A model for the lipid pretransition: Coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1154-1165.
52. Smith, I. C. P.; Ekiel, I. H. In *Phosphorous-31 NMR*; Gorenstein, D. G., Ed.; Academic Press: San Diego, 1984; pp 447-475.
53. Chan, J. C. C.; Tycko, R., Recoupling of chemical shift anisotropies in solid-state NMR under high-speed magic-angle spinning and in uniformly ^{13}C -labeled systems. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 8378-8389.
54. Yan, X.; Noel, F.; Marcotte, I.; DeWolf, C. E.; Warschawski, D. E.; Boisselier, E., AHNAK C-Terminal peptide membrane binding-interactions between the residues 5654-5673 of AHNAK and phospholipid monolayers and bilayers. *Langmuir* **2020**, *36*, 362-369.
55. Joanne, P.; Galanth, C.; Goasdoué, N.; Nicolas, P.; Sagan, S.; Lavielle, S.; Chassaing, G.; El Amri, C.; Alves, I. D., Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, *1788*, 1772-1781.

56. Epand, R. F.; Schmitt, M. A.; Gellman, S. H.; Epand, R. M., Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two α/β -antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2006**, *1758*, 1343-1350.
57. Amunson, K. E.; Kubelka, J., On the temperature dependence of amide I frequencies of peptides in solution. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 9993-9998.
58. Van Dijck, P. W. M.; Kaper, A. J.; Oonk, H. A. J.; De Gier, J., Miscibility properties of binary phosphatidylcholine mixtures. A calorimetric study. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1977**, *470*, 58-69.
59. Sneideris, T.; Darguzis, D.; Botyriute, A.; Grigaliunas, M.; Winter, R.; Smirnovas, V., pH-Driven polymorphism of insulin amyloid-like fibrils. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0136602.
60. Buchanan, L. E.; Carr, J. K.; Fluitt, A. M.; Hoganson, A. J.; Moran, S. D.; de Pablo, J. J.; Skinner, J. L.; Zanni, M. T., Structural motif of polyglutamine amyloid fibrils discerned with mixed-isotope infrared spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 5796-5801.
61. Buchete, N.-V.; Hummer, G., Structure and dynamics of parallel β -sheets, hydrophobic core, and loops in Alzheimer's A β fibrils. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 3032-3039.
62. Lerch-Bader, M.; Lundin, C.; Kim, H.; Nilsson, I.; von Heijne, G., Contribution of positively charged flanking residues to the insertion of transmembrane helices into the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 4127-4132.
63. Rousseau, F.; Serrano, L.; Schymkowitz, J. W. H., How evolutionary pressure against protein aggregation shaped chaperone specificity. *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 1037-1047.
64. Viennet, T.; Wördehoff, M. M.; Uluca, B.; Poojari, C.; Shaykhalishahi, H.; Willbold, D.; Strodel, B.; Heise, H.; Buell, A. K.; Hoyer, W., et al., Structural insights from lipid-bilayer nanodiscs link α -Synuclein membrane-binding modes to amyloid fibril formation. *Commun. Biol.* **2018**, *1*, 44.
65. Hertel, C.; Terzi, E.; Hauser, N.; Jakob-Rotne, R.; Seelig, J.; Kemp, J. A., Inhibition of the electrostatic interaction between beta-amyloid peptide and membranes prevents beta-amyloid-induced toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 9412-9416.
66. Grey, M.; Linse, S.; Nilsson, H.; Brundin, P.; Sparr, E., Membrane interaction of alpha-synuclein in different aggregation states. *J. Parkinson's Dis.* **2011**, *1*, 359-371.
67. Pfefferkorn, C. M.; Jiang, Z.; Lee, J. C., Biophysics of alpha-synuclein membrane interactions. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2012**, *1818*, 162-171.
68. Auluck, P. K.; Caraveo, G.; Lindquist, S., α -Synuclein: Membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 211-233.
69. Iyer, A.; Claessens, M., Disruptive membrane interactions of alpha-synuclein aggregates. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteom.* **2019**, *1867*, 468-482.
70. O'Leary, E. I.; Lee, J. C., Interplay between α -synuclein amyloid formation and membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteom.* **2019**, *1867*, 483-491.
71. Stöckl, M.; Fischer, P.; Wanker, E.; Herrmann, A., α -Synuclein selectively binds to anionic phospholipids embedded in liquid-disordered domains. *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 1394-1404.
72. Galvagnion, C., The role of lipids interacting with alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Parkinson's Dis.* **2017**, *7*, 433-450.
73. Shanmugasundaram, M.; Korouski, D.; Wan, W.; Stubbs, G.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A.; Lednev, I. K., Rapid filament supramolecular chirality reversal of HET-s (218–289) prion fibrils driven by pH elevation. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 8521-8525.
74. Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., Design of an N-methylated peptide inhibitor of α -synuclein aggregation guided by solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7873-7881.
75. Ryan, P.; Xu, M.-m.; Davey, A. K.; Kassiou, M.; Mellick, G. D.; Rudrawar, S., O-GlcNAcylation of truncated NAC segment alters peptide-dependent effects on α -synuclein aggregation. *Bioorg. Chem.* **2019**, *94*, 103389.
76. Levine, P. M.; Galesic, A.; Balana, A. T.; Mahul-Mellier, A.-L.; Navarro, M. X.; De Leon, C. A.; Lashuel, H. A.; Pratt, M. R., α -Synuclein O-GlcNAcylation alters aggregation and

toxicity, revealing certain residues as potential inhibitors of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 1511-1519.

Conclusion

Le but de cette thèse était d'étudier la formation de fibres amyloïdes de l'AS, par le biais du peptide modèle AS₇₁₋₈₂, et d'appréhender le rôle des interactions AS₇₁₋₈₂-membranes pour mieux comprendre la fibrillation de l'AS. Ce projet de doctorat, situé au carrefour des neurosciences, de la chimie et de la biophysique, s'inscrit dans un contexte actuel où le vieillissement progressif de la population voit apparaître un plus grand nombre de personnes atteintes de la MP. Le flou régnant sur l'avenir de la MP au niveau des traitements et sur ses impacts sociétaux en fait un sujet d'étude théorique aux enjeux indéniables.

Depuis les premiers travaux effectués sur les protéines amyloïdes, leur implication dans l'avancement des amyloïdoses est devenue indiscutable. Malgré un nombre étourdissant d'études portées sur l'AS -en 2010, environ 26 000 articles étaient répertoriés sur Google Scholar répondant à la requête « a synuclein », en 2019 ce chiffre s'élève à plus de 105 000 au total- la recherche n'a pas encore réussi à aboutir à un traitement efficace et curatif, tel qu'expliqué dans l'introduction de cette thèse, notamment à cause des essais cliniques, de la difficulté de diagnostic, et des multiples formes que peut prendre la MP. Les études recourent plusieurs domaines : la médecine, la biologie, les neurosciences, la chimie, etc. Les études d'interactions de l'AS avec des membranes modèles ne sont pas les plus répandues, bien que le rôle des membranes cellulaires dans la MP soit établi. Étudier un peptide spécifique, l'AS₇₁₋₈₂, interagissant avec des membranes modèles représente donc un domaine peu exploité pouvant apporter de nouveaux éléments de compréhension au mécanisme global de pathogénicité, notamment d'un point de vue structurel et dynamique. La rédaction de la revue de littérature présentée au chapitre 3 de cette thèse avait donc pour objectif premier de mettre en lumière les multiples possibilités offertes par de tels systèmes (peptides correspondant à des séquences spécifiques de protéines amyloïdes), et pour objectif second de souligner leur utilité en vue d'appréhender les phénomènes dynamiques et structuraux concernant les protéines amyloïdes.

Notre objectif de recherche était donc ici de réussir à caractériser le peptide AS₇₁₋₈₂, d'une importance cruciale dans le processus d'agrégation, lors d'interactions avec des membranes modèles, et ce de manière à apporter de nouveaux éléments au casse-tête que

représente la pathogénicité de l'AS dans le cadre de la MP. Pour ce faire, nous nous sommes servis de plusieurs méthodes biophysiques, complémentaires, et sélectionnées en fonction des avantages qu'elles apportent. En gardant à l'esprit les limitations inhérentes à ces méthodes, notamment la non-représentativité physiologique, comparé à ce qu'un système *in vitro* peut offrir, les techniques utilisées nous ont tout de même fourni des informations qu'il n'aurait pas été possible d'obtenir autrement. Au vu des résultats obtenus, il est possible de dresser un portrait plus clair du peptide AS₇₁₋₈₂, tant au niveau structural que dynamique lorsque celui-ci interagit avec des membranes modèles. Au niveau de la composition des membranes modèles, nous nous sommes principalement servis de PC et PG, deux phospholipides qui constituent un bon choix, compte tenu de leurs propriétés hautement documentées et dont les caractéristiques physico-chimiques étaient adaptées et avantageuses pour nos études.

Récapitulatif des résultats principaux

AS₇₁₋₈₂ en solution

Avant d'entamer les études sur les interactions entre l'AS₇₁₋₈₂ et des membranes modèles, nous avons trouvé important d'étudier le comportement de l'AS₇₁₋₈₂ seul en solution, de manière à interpréter correctement les résultats obtenus avec les membranes modèles.

Nous avons trouvé que l'AS₇₁₋₈₂ adopte majoritairement une structure de pelote statistique dans un tampon aqueux, et cela grâce aux spectroscopies FTIR et VCD. Cependant, nous avons constaté par la même occasion qu'AS₇₁₋₈₂ forme simultanément des oligomères organisés sous forme de feuillets- β antiparallèles, dont la population relative est directement reliée à la concentration et à la force ionique, et également inversement reliée à la température (figure 7.1A). Cette caractérisation a permis de renforcer l'image de peptide amyloïde de l'AS₇₁₋₈₂, dans le sens où celui a été caractérisé à la fois sous forme monomérique désordonnée en solution, sous forme oligomérique, sous forme proto-fibrillaire puis fibrillaire, tel qu'il a été démontré dans les chapitres subséquents. Ces éléments viennent donc renforcer l'image de bon modèle de l'AS₇₁₋₈₂ en vue d'investiguer l'AS.

La conformation désordonnée de l'AS₇₁₋₈₂ en solution permet d'affirmer sans ambiguïté que ce sont bien les interactions avec les membranes modèles qui provoquent l'agrégation fibrillaire de celui-ci.

Étude de la chiralité supramoléculaire

Les études conduites en VCD étaient les premières à notre connaissance portant sur des interactions entre un peptide amyloïde et des membranes modèles, étant par la même occasion plus significatives d'un point de vue biologique que celles de peptides/protéines réalisées en solution (Pr L. Nafie, Syracuse University, pionnier du VCD appliqué aux amyloïdes, communication personnelle). Ces résultats nous ont permis d'identifier et de caractériser le caractère dynamique de l'agrégation de l'AS₇₁₋₈₂, principalement au niveau de la chiralité supramoléculaire des fibrilles formées. Les résultats obtenus par FTIR antérieurement aux expériences VCD suggéraient que le système, une fois stable après la préparation des échantillons, n'évoluait plus. Le VCD a donc permis de découvrir un comportement dynamique qu'il n'aurait pas été possible d'identifier autrement. Cette étude a permis de sonder d'un côté la géométrie hélicoïdale des fibrilles formées par AS₇₁₋₈₂, sa dynamique, mais également l'importance des membranes modèles dans ce processus, qui agissent certainement comme surface catalytique à ces modifications structurales. Plus précisément, nous avons pu découvrir l'importance de la concentration et du rapport peptide:lipide sur la morphologie et la dynamique des fibrilles formées par AS₇₁₋₈₂ (figure 7.1B). Dans cette partie de l'étude, la TEM a beaucoup apporté, venant corroborer les hypothèses formulées lors de l'analyse des données VCD. La découverte des deux chiralités était inattendue, mais leur présence est un argument supplémentaire de la grande flexibilité des systèmes amyloïdes, même une fois que ceux-ci sont organisés sous forme de fibrilles ou proto-fibrilles. Ces résultats pourraient trouver un écho dans la recherche sur les amyloïdes de manière générale, et mettent en lumière de nouvelles problématiques à considérer dans l'approche de peptides et protéines amyloïdes, que ce soit au niveau de la recherche de biomarqueurs, de sondes ou encore d'inhibiteurs d'agrégation qui visent une morphologie précise.

Étude de la dynamique des membranes modèles

Les études conduites en infrarouge ont confirmé que les membranes modèles ont un rôle de précurseurs d'agrégation en feuillet- β dès lors qu'elles comportent une proportion de phospholipides anioniques aussi basse que 10%. Le peptide AS₇₁₋₈₂ avait déjà été caractérisé lors de travaux précédents comme adoptant une structure en feuillet- β parallèle lors d'interactions avec des membranes anioniques. Nous avons réussi ici, en nous servant d'un marquage isotopique $^{13}\text{C}=\text{O}$ soigneusement choisi, à caractériser ce feuillet- β parallèle comme étant parfaitement *in-register* (brins- β parfaitement superposés), par une combinaison de FTIR et de RMN.

De plus, les études de thermotropisme ont révélé l'impact de la transition de phase des phospholipides composant les membranes sur la structure en feuillet- β de l'AS₇₁₋₈₂. En parallèle, cette même étude a permis de constater que les fibrilles de l'AS₇₁₋₈₂ se forment et demeurent très probablement à la surface des membranes modèles, étant donné que le peptide ne perturbe pas significativement l'ordre/le désordre ni l'hydratation des phospholipides (figure 7.1C). Ce résultat était attendu, étant donné que, le peptide ayant beau être majoritairement composé d'acides aminés hydrophobes, celui-ci est soluble dans l'eau. De plus les fibrilles amyloïdes se forment de manière à isoler les poches hydrophobes du milieu aqueux, donc une fois les fibrilles formées, celles-ci n'ont pas nécessairement besoin de pénétrer dans la membrane pour se placer au niveau des chaînes acyle hydrophobes. L'interaction qui gouverne l'agrégation est électrostatique, et provient très certainement de l'interaction entre la lysine, résidu chargé positivement, et la tête polaire du DMPG. Cette interaction serait possible grâce à la longue chaîne latérale de la lysine, qui est alors capable d'atteindre la charge négative de DMPG portée sur le groupement phosphate du DMPG. L'utilisation en FTIR de phospholipides aux chaînes acyle deutérées n'a pas permis de mettre en lumière une quelconque perturbation visant spécifiquement DMPG.

Finalement, nous nous sommes servis de la séquence RMN PROCSA, dans le but d'obtenir de l'information sur cette interaction préférentielle supposée de l'AS₇₁₋₈₂ avec DMPG. Cette séquence, particulièrement adaptée à l'étude de membranes modèles composées d'un mélange de phospholipides, nous a permis de sonder encore plus en

profondeur ces interactions peptide/lipides. Concernant cette partie de l'étude, nous avons voulu déterminer si notre hypothèse, selon laquelle AS₇₁₋₈₂ interagit principalement avec la tête polaire des phospholipides PG, se vérifiait. L'étude en RMN ³¹P fournit directement de l'information sur l'environnement et la dynamique des têtes polaires, et plus précisément, des groupements phosphates. Les résultats obtenus à l'aide de la séquence PROCSA ont indiqué une interaction préférentielle avec les têtes polaires glycérol, chargées négativement. Ce résultat, plutôt attendu, est venu confirmer qu'il s'agit bien de l'interaction électrostatique qui régit l'agrégation en feuillet-β de l'AS₇₁₋₈₂. Cependant, les phospholipides PC semblent également subir un léger effet dû à la présence du peptide. Ceci peut s'expliquer par leur proximité aux phospholipides anioniques voisins, et par la même occasion du peptide, bien qu'il ne semble pas y avoir d'interaction directe entre AS₇₁₋₈₂ et les PC, mais plutôt un effet de proximité spatiale.

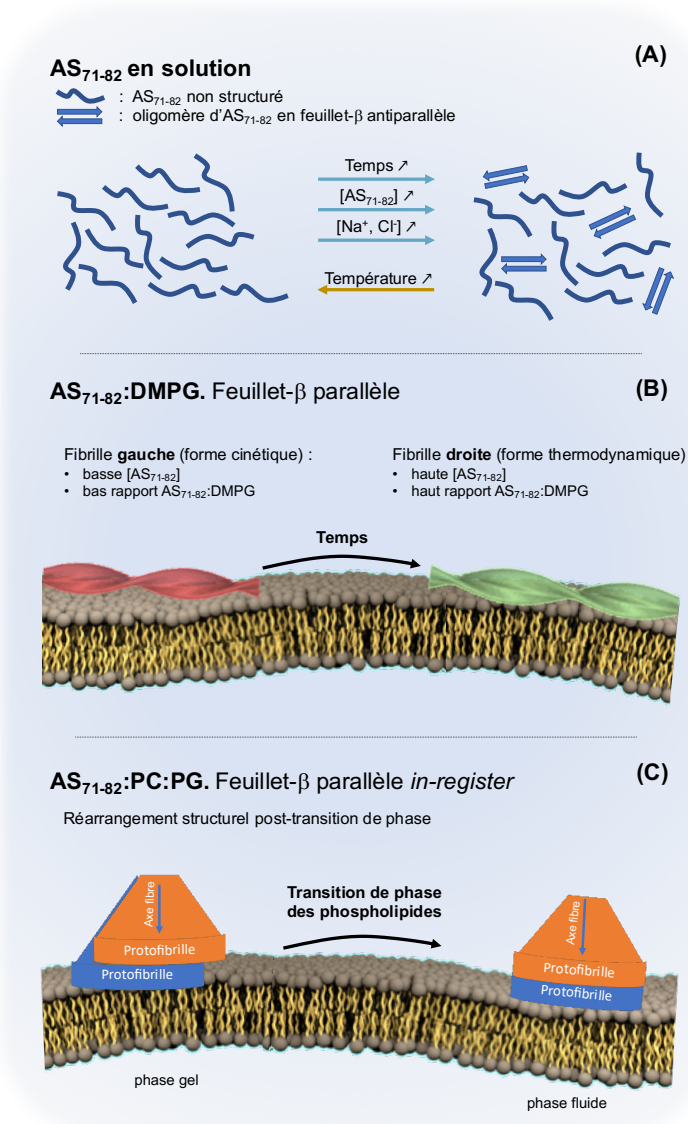


Figure 7.1. Récapitulatif des trois volets de l'étude : (A) Structure de l'AS₇₁₋₈₂ en solution, et les paramètres influençant les proportions des conformations désordonnée/oligomères en feuillet-β antiparallèle. (B) Illustration des paramètres dictant la chiralité supramoléculaire des fibrilles d'AS₇₁₋₈₂. (C) Réarrangement structurel des protofibrilles de l'AS₇₁₋₈₂ permis par la transition de phase des phospholipides composant les membranes (PC:PG).

Perspectives

Les études menées ici ont permis de caractériser la structure et la dynamique de l'AS₇₁₋₈₂ en solution ainsi qu'en présence de membranes modèles. À titre de perspectives futures, les fragments de peptides et protéines amyloïdes restent peu exploités, les chercheurs leur préférant généralement les protéines complètes. Néanmoins, nombre d'études

prometteuses mettant en scène des peptides amyloïdes modifiés ont vu le jour. Leur potentiel rôle d'inhibiteur d'agrégation, en raison de leur homologie séquentielle, et leurs relativement faibles poids moléculaires, font de ces fragments l'une des nombreuses pistes exploitables, et déjà investiguée, en vue d'un traitement possible d'amyloïdoses. À ce titre, appréhender et caractériser les comportements structuraux et dynamiques de ces fragments dans différentes conditions physico-chimiques revêt une importance capitale. L'utilisation de membranes modèles, bien qu'imparfaites et simplifiées, donnent accès à des informations hautement pertinentes qu'il ne serait pas possible d'obtenir autrement.

Dans le cas de l'AS₇₁₋₈₂, une suite possible serait la caractérisation précise et complète de sa structure lorsqu'il se trouve sous forme fibrillaire, notamment via des mesures de distances homo- et hétéronucléaires en RMN-ÉS. Une expérience intéressante et hautement pertinente serait de marquer au ¹⁵N ou au ¹³C la chaîne latérale de l'acide aminé lysine (K₈₀) pour pouvoir procéder à des mesures de distances ³¹P-¹⁵N ou ³¹P-¹³C avec la tête polaire des phospholipides. Ce type d'expérience nécessiterait d'utiliser une séquence RMN telle que la REDOR (*Rotational Echo, DOuble Resonance*), qui est basée sur une mesure du couplage dipolaire hétéronucléaire¹. Toujours dans l'aspect mesure de distances internucléaires, caractériser l'agencement spatial des protofibrilles offrirait une vision tridimensionnelle des fibrilles formées, et viendrait compléter la vision bidimensionnelle obtenue par l'IR et le DQF-DRAWS. Dans cette perspective, la séquence plus complexe 3D-zf-TEDOR s'est révélée particulièrement puissante²⁻⁴. Par la suite, dans une vision au niveau moléculaire, et non plus atomique, procéder à des mesures de potentiel ζ pourrait mener à l'obtention d'une image plus précise des interactions entre AS₇₁₋₈₂ et les membranes modèles. En effet, cela permettrait de sonder plus précisément l'importance des interactions électrostatiques dans le processus d'agrégation, en variant des paramètres tels que la composition des membranes, les rapports peptide:lipide, le pH et la force ionique notamment.

Par ailleurs, il serait intéressant de persister sur différents aspects abordés durant ce doctorat et qui n'ont pas donné suffisamment de résultats, ou pas suffisamment concluants. Ainsi, la spectroscopie Raman d'activité optique (ROA, *Raman optical activity*), utilisée parallèlement au VCD durant mon stage à l'Université Bordeaux I, a fourni quelques résultats préliminaires laissant entrevoir que le système AS₇₁₋₈₂-membranes produirait le phénomène

de ROA de résonance (RROA, *resonance Raman optical activity*)⁵⁻⁶. Malheureusement, le peptide étant synthétisé en laboratoire, la présence d'impuretés (malgré une purification) produisait énormément de fluorescence, compliquant ainsi les études en ROA. De la même manière, quelques expériences en résonance de plasmons de surface (SPR, *surface plasmon resonance*), visant à caractériser les interactions entre AS₇₁₋₈₂ et une bicouche lipidique déposée sur une surface de dextran, ont été menées dans le laboratoire du Pr. Steve Bourgault (UQÀM). Les résultats obtenus n'ont pas été concluants, mais ont permis de mettre en place un protocole. Mener de nouvelles expériences en SPR pourrait potentiellement aboutir à des informations telles que des profils de liaison, des données stœchiométriques, cinétiques et thermodynamiques⁷⁻⁸.

Enfin, en se basant sur ce qui est fait dans la littérature, il serait intéressant de procéder à des modifications du peptide, autant sur la séquence que sur les chaînes latérales, en vue de synthétiser de potentiels inhibiteurs d'agrégation, de manière similaire à ce qui existe dans la littérature⁹⁻¹¹. Par la suite, il conviendrait de mener le même type d'études que celles présentées dans cette thèse, en mélangeant le peptide modifié avec le peptide non modifié pour étudier les interactions résultantes, et passer par la suite à une étude portant sur les interactions entre ce peptide modifié et la protéine parent, l'AS.

Références

1. Gullion, T.; Schaefer, J., Rotational-echo double-resonance NMR. *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 196-200.
2. Jaroniec, C. P.; Filip, C.; Griffin, R. G., 3D TEDOR NMR experiments for the simultaneous measurement of multiple carbon–nitrogen distances in uniformly ¹³C,¹⁵N-labeled solids. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10728-10742.
3. Jaroniec, C. P.; MacPhee, C. E.; Bajaj, V. S.; McMahan, M. T.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G., High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 711-716.
4. Debelouchina, G. T.; Bayro, M. J.; Fitzpatrick, A. W.; Ladizhansky, V.; Colvin, M. T.; Caporini, M. A.; Jaroniec, C. P.; Bajaj, V. S.; Rosay, M.; MacPhee, C. E., et al., Higher order amyloid fibril structure by MAS NMR and DNP spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19237-19247.
5. Nafie, L. A., Theory of resonance Raman optical activity: the single electronic state limit. *Chem. Phys.* **1996**, *205*, 309-322.
6. Vargek, M.; Freedman, T. B.; Lee, E.; Nafie, L. A., Experimental observation of resonance Raman optical activity. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *287*, 359-364.
7. Willander, M.; Al-Hilli, S. In *Micro and Nano Technologies in Bioanalysis*; Foote, R. S.; Lee, J. W., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2009; Vol. 544, pp 201-229.

8. Smith, D. P.; Tew, D. J.; Hill, A. F.; Bottomley, S. P.; Masters, C. L.; Barnham, K. J.; Cappai, R., Formation of a high affinity lipid-binding intermediate during the early aggregation phase of α -synuclein. *Biochemistry* **2008**, *47*, 1425-1434.
9. Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., Design of an N-methylated peptide inhibitor of α -synuclein aggregation guided by solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7873-7881.
10. Levine, P. M.; Galesic, A.; Balana, A. T.; Mahul-Mellier, A.-L.; Navarro, M. X.; De Leon, C. A.; Lashuel, H. A.; Pratt, M. R., α -Synuclein O-GlcNAcylation alters aggregation and toxicity, revealing certain residues as potential inhibitors of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 1511-1519.
11. Ryan, P.; Xu, M.-m.; Davey, A. K.; Kassiou, M.; Mellick, G. D.; Rudrawar, S., O-GlcNAcylation of truncated NAC segment alters peptide-dependent effects on α -synuclein aggregation. *Bioorg. Chem.* **2019**, *94*, 103389.

Bibliographie

Introduction

1. Iadanza, M. G.; Jackson, M. P.; Hewitt, E. W.; Ranson, N. A.; Radford, S. E., A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 755-773.
2. Sipe, J. D.; Cohen, A. S., Review: History of the amyloid fibril. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 88-98.
3. Howie, A. J.; Brewer, D. B., Optical properties of amyloid stained by Congo red: History and mechanisms. *Micron* **2009**, *40*, 285-301.
4. Alzheimer, A., Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt* **1906**, *23*, 1129-1136.
5. Glenner, G. G.; Eanes, E. D.; Bladen, H. A.; Linke, R. P.; Termine, J. D., β -Pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. *J. Histochem. Cytochem.* **1974**, *22*, 1141-1158.
6. Glenner, G. G.; Ein, D.; Eanes, E. D.; Bladen, H. A.; Terry, W.; Page, D. L., Creation of « amyloid » fibrils from Bence Jones proteins in vitro. *Science* **1971**, *174*, 712-714.
7. Glenner, G. G.; Wong, C. W., Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *120*, 885-890.
8. Termine, J. D.; Eanes, E. D.; Ein, D.; Glenner, G. G., Infrared spectroscopy of human amyloid fibrils and immunoglobulin proteins. *Biopolymers* **1972**, *11*, 1103-1113.
9. Parkinson, J., An essay on the shaking palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **2002**, *14*, 223-236.
10. Spillantini, M. G.; Crowther, R. A.; Jakes, R.; Hasegawa, M.; Goedert, M., α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6469-6473.
11. Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M., α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **1997**, *388*, 839-840.
12. Tamgüney, G.; Korczyn, A. D., A critical review of the prion hypothesis of human synucleinopathies. *Cell and Tissue Research* **2018**, *373*, 213-220.
13. McCormack, A. L.; Thiruchelvam, M.; Manning-Bog, A. B.; Thiffault, C.; Langston, J. W.; Cory-Slechta, D. A.; Di Monte, D. A., Environmental risk factors and Parkinson's disease: Selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide Paraquat. *Neurobiol. Dis.* **2002**, *10*, 119-127.
14. Rajput, A. H.; Uitti, R. J.; Stern, W.; Lavery, W.; O'Donnell, K.; O'Donnell, D.; Yuen, W. K.; Dua, A., Geography, drinking water chemistry, pesticides and herbicides and the etiology of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* **1987**, *14*, 414-418.
15. Gorell, J. M.; Johnson, C. C.; Rybicki, B. A.; Peterson, E. L.; Richardson, R. J., The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* **1998**, *50*, 1346.
16. Semchuk, K. M.; Love, E. J.; Lee, R. G., Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology* **1992**, *42*, 1328.
17. Lai, C.-Y.; Chou, M.-C.; Lin, C.-L.; Kao, C.-H., Increased risk of Parkinson disease in patients with carbon monoxide intoxication: a population-based cohort study. *Medicine* **2015**, *94*, e869-e869.
18. Montgomery, E. B., Heavy metals and the etiology of Parkinson's disease and other movement disorders. *Toxicology* **1995**, *97*, 3-9.

19. Geir, B.; Vera, S.; Mauricio, A. U.; Maryam, D.; Salvatore, C.; Joachim, M., Metals and Parkinson's disease: mechanisms and biochemical processes. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 2198-2214.
20. Kopin, I. J.; Markey, S. P., MPTP toxicity: Implications for research in Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **1988**, *11*, 81-96.
21. Langston, W. J., MPTP and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **1985**, *8*, 79-83.
22. Kurth, J. H.; Kurth, M. C.; Poduslo, S. E.; Schwankhaus, J. D., Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **1993**, *33*, 368-372.
23. Lesnick, T. G.; Papapetropoulos, S.; Mash, D. C.; Ffrench-Mullen, J.; Shehadeh, L.; de Andrade, M.; Henley, J. R.; Rocca, W. A.; Ahlskog, J. E.; Maraganore, D. M., A genomic pathway approach to a complex disease: Axon guidance and Parkinson disease. *PLOS Genet.* **2007**, *3*, e98.
24. Allam, M. F.; Del Castillo, A. S.; Navajas, R. F.-C., Parkinson's disease risk factors: genetic, environmental, or both? *Neurol. Res.* **2005**, *27*, 206-208.
25. Pringsheim, T.; Jette, N.; Frolkis, A.; Steeves, T. D. L., The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* **2014**, *29*, 1583-1590.
26. Flagmeier, P.; Meisl, G.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M.; Buell, A. K.; Galvagnion, C., Mutations associated with familial Parkinson's disease alter the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 10328-10333.
27. Nakai, M.; Fujita, M.; Waragai, M.; Sugama, S.; Wei, J.; Akatsu, H.; Ohtaka-Maruyama, C.; Okado, H.; Hashimoto, M., Expression of α -synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *358*, 104-110.
28. Fauvet, B.; Mbefo, M. K.; Fares, M.-B.; Desobry, C.; Michael, S.; Ardah, M. T.; Tsika, E.; Coune, P.; Prudent, M.; Lion, N., et al., α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15345-15364.
29. Cookson, M. R., α -Synuclein and neuronal cell death. *Mol. Neurodegener.* **2009**, *4*, 9.
30. Hoehn, M. M.; Yahr, M. D., Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology* **1967**, *17*, 427-442.
31. Funk, C., LXV.—Synthesis of dl-3 : 4-dihydroxyphenylalanine. *J. Chem. Soc.* **1911**, *99*, 554-557.
32. LeWitt, P. A.; Fahn, S., Levodopa therapy for Parkinson disease. *Neurology* **2016**, *86*, S3.
33. Abbott, A., Levodopa: the story so far. *Nature* **2010**, *466*, S6.
34. Fahn, S., The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. *Mov. Disord.* **2015**, *30*, 4-18.
35. Fahn, S., The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **2008**, *23*, S497-S508.
36. Andén, N. E.; Carlsson, A.; Dahlström, A.; Fuxe, K.; Hillarp, N. Å.; Larsson, K., Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sciences* **1964**, *3*, 523-530.
37. Carlsson, A.; Waldeck, B., A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine.). *Acta Physiol. Scand.* **1958**, *44*, 293-298.
38. Kehr, W.; Carlsson, A.; Lindqvist, M., A method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) in brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1972**, *274*, 273-280.
39. Benabid, A. L., Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2003**, *13*, 696-706.
40. Graat, I.; Figeé, M.; Denys, D., The application of deep brain stimulation in the treatment of psychiatric disorders. *Int. Rev. Psychiatry* **2017**, *29*, 178-190.

41. Goetz, C. G.; Stebbins, G. T.; Klawans, H. L.; Koller, W. C.; Grossman, R. G.; Bakay, R. A. E.; Penn, R. D., United Parkinson Foundation Neurotransplantation Registry on adrenal medullary transplants. *Neurology* **1991**, *41*, 1719.
42. Henchcliffe, C.; Parmar, M., Repairing the brain: Cell replacement using stem cell-based technologies. *J. Parkinson's Dis.* **2018**, *8*, S131-S137.
43. Miller, D. B.; O'Callaghan, J. P., Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. *Metab., Clin. Exp.* **2015**, *64*, S40-S46.
44. Chandra, R.; Hiniker, A.; Kuo, Y.-M.; Nussbaum, R. L.; Liddle, R. A., α -Synuclein in gut endocrine cells and its implications for Parkinson's disease. *JCI Insight* **2017**, *2*.
45. Liddle, R. A., Parkinson's disease from the gut. *Brain Res.* **2018**, *1693*, 201-206.
46. Forsyth, C. B.; Shannon, K. M.; Kordower, J. H.; Voigt, R. M.; Shaikh, M.; Jaglin, J. A.; Estes, J. D.; Dodiya, H. B.; Keshavarzian, A., Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e28032.
47. Guella, I.; Evans, D. M.; Szu-Tu, C.; Nosova, E.; Bortnick, S. F.; Group, S. C. S.; Goldman, J. G.; Dalrymple-Alford, J. C.; Geurtsen, G. J.; Litvan, I., et al., α -synuclein genetic variability: A biomarker for dementia in Parkinson disease. *Ann. Neurol.* **2016**, *79*, 991-999.
48. Parnetti, L.; Castrioto, A.; Chiasserini, D.; Persichetti, E.; Tambasco, N.; El-Agnaf, O.; Calabresi, P., Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2013**, *9*, 131.
49. Maass, F.; Schulz, I.; Lingor, P.; Mollenhauer, B.; Bähr, M., Cerebrospinal fluid biomarker for Parkinson's disease: An overview. *Mol. Cell Neurosci.* **2019**, *97*, 60-66.
50. Chen-Plotkin, A. S.; Albin, R.; Alcalay, R.; Babcock, D.; Bajaj, V.; Bowman, D.; Buko, A.; Cedarbaum, J.; Chelsky, D.; Cookson, M. R., et al., Finding useful biomarkers for Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*, eaam6003.
51. Jin, H.; Kanthasamy, A.; Anantharam, V.; Kanthasamy, A. G. In *Biomarkers in Toxicology (Second Edition)*; Gupta, R. C., Ed.; Academic Press: 2019; pp 895-909.
52. Adler, C. H.; Dugger, B. N.; Hinni, M. L.; Lott, D. G.; Driver-Dunckley, E.; Hidalgo, J.; Henry-Watson, J.; Serrano, G.; Sue, L. I.; Nagel, T., et al., Submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *Neurology* **2014**, *82*, 858.
53. Wang, N.; Gibbons, C. H.; Lafo, J.; Freeman, R., α -Synuclein in cutaneous autonomic nerves. *Neurology* **2013**, *81*, 1604.
54. Wang, X.; Yu, S.; Li, F.; Feng, T., Detection of α -synuclein oligomers in red blood cells as a potential biomarker of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **2015**, *599*, 115-119.
55. Schindlbeck, K. A.; Eidelberg, D., Network imaging biomarkers: insights and clinical applications in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 629-640.
56. Eisele, Y. S.; Monteiro, C.; Fearn, C.; Encalada, S. E.; Wiseman, R. L.; Powers, E. T.; Kelly, J. W., Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2015**, *14*, 759-780.
57. Agerschou, E. D.; Flagmeier, P.; Saridaki, T.; Galvagnion, C.; Komnig, D.; Heid, L.; Prasad, V.; Shaykhalishahi, H.; Willbold, D.; Dobson, C. M., et al., An engineered monomer binding-protein for α -synuclein efficiently inhibits the proliferation of amyloid fibrils. *eLife* **2019**, *8*, e46112.
58. Cheruvara, H.; Allen-Baume, V. L.; Kad, N. M.; Mason, J. M., Intracellular screening of a peptide library to derive a potent peptide inhibitor of α -synuclein aggregation. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 7426-7435.
59. Brown, J. W. P.; Buell, A. K.; Michaels, T. C. T.; Meisl, G.; Carozza, J.; Flagmeier, P.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M.; Galvagnion, C., β -Synuclein suppresses both the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation via competitive binding to surfaces. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36010.

60. Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., Design of an N-methylated peptide inhibitor of α -synuclein aggregation guided by solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7873-7881.
61. Bodles, A. M.; El-Agnaf, O. M. A.; Greer, B.; Guthrie, D. J. S.; Irvine, G. B., Inhibition of fibril formation and toxicity of a fragment of α -synuclein by an N-methylated peptide analogue. *Neurosci. Lett.* **2004**, *359*, 89-93.
62. Collier, T. J.; Srivastava, K. R.; Justman, C.; Grammatopoulos, T.; Hutter-Paier, B.; Prokesh, M.; Havas, D.; Rochet, J.-C.; Liu, F.; Jock, K., et al., Nortriptyline inhibits aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein by enhancing reconfiguration of the monomeric form. *Neurobiol. Dis.* **2017**, *106*, 191-204.
63. Singh, P. K.; Kotia, V.; Ghosh, D.; Mohite, G. M.; Kumar, A.; Maji, S. K., Curcumin modulates α -synuclein aggregation and toxicity. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 393-407.
64. Paul, A.; Zhang, B.-D.; Mohapatra, S.; Li, G.; Li, Y.-M.; Gazit, E.; Segal, D., Novel mannitol-based small molecules for inhibiting aggregation of α -synuclein amyloids in Parkinson's disease. *Front. Mol. Biosci.* **2019**, *6*.
65. Caruana, M.; Högen, T.; Levin, J.; Hillmer, A.; Giese, A.; Vassallo, N., Inhibition and disaggregation of α -synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 1113-1120.
66. Bieschke, J.; Russ, J.; Friedrich, R. P.; Ehrnhoefer, D. E.; Wobst, H.; Neugebauer, K.; Wanker, E. E., EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 7710-7715.
67. Ardah, M. T.; Paleologou, K. E.; Lv, G.; Abul Khair, S. B.; Kazim, A. S.; Minhas, S. T.; Al-Tel, T. H.; Al-Hayani, A. A.; Haque, M. E.; Eliezer, D., et al., Structure activity relationship of phenolic acid inhibitors of α -synuclein fibril formation and toxicity. *Front. Aging Neurosci.* **2014**, *6*.
68. Takahashi, R.; Ono, K.; Takamura, Y.; Mizuguchi, M.; Ikeda, T.; Nishijo, H.; Yamada, M., Phenolic compounds prevent the oligomerization of α -synuclein and reduce synaptic toxicity. *J. Neurochem.* **2015**, *134*, 943-955.
69. Caruana, M.; Neuner, J.; Högen, T.; Schmidt, F.; Kamp, F.; Scerri, C.; Giese, A.; Vassallo, N., Polyphenolic compounds are novel protective agents against lipid membrane damage by α -synuclein aggregates in vitro. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2012**, *1818*, 2502-2510.
70. Price, D. L.; Koike, M. A.; Khan, A.; Wrasidlo, W.; Rockenstein, E.; Masliah, E.; Bonhaus, D., The small molecule alpha-synuclein misfolding inhibitor, NPT200-11, produces multiple benefits in an animal model of Parkinson's disease. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16165.
71. Kurnik, M.; Sahin, C.; Andersen, C. B.; Lorenzen, N.; Giehm, L.; Mohammad-Beigi, H.; Jessen, C. M.; Pedersen, J. S.; Christiansen, G.; Petersen, S. V., et al., Potent α -synuclein aggregation inhibitors, identified by high-throughput screening, mainly target the monomeric state. *Cell. Chem. Biol.* **2018**, *25*, 1389-1402.e9.
72. Temsamani, H.; Krisa, S.; Decossas-Mendoza, M.; Lambert, O.; Mérillon, J.-M.; Richard, T., Piceatannol and other wine stilbenes: A pool of inhibitors against α -synuclein aggregation and cytotoxicity. *Nutrients* **2016**, *8*.
73. Jha, N. N.; Kumar, R.; Panigrahi, R.; Navalkar, A.; Ghosh, D.; Sahay, S.; Mondal, M.; Kumar, A.; Maji, S. K., Comparison of α -synuclein fibril inhibition by four different amyloid inhibitors. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8*, 2722-2733.
74. Stoessel, A. J., Why have we failed in our attempts to develop a neuroprotective therapy for parkinson's? How can we improve this situation? In *World Parkinson Congress*, www.worldpdcongress.org/home/2018/5/14/h9kmk04picf604vzz2lj6va7x3tm6o, 2018.
75. Kirkeby, A.; Barker, R. A., Parkinson disease and growth factors — is GDNF good enough? *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15*, 312-314.

Chapitre 1

1. Otzen, D.; Riek, R., Functional amyloids. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2019**.
2. Knowles, T. P. J.; Mezzenga, R., Amyloid fibrils as building blocks for natural and artificial functional materials. *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 6546-6561.
3. Chavarría, C.; Rodríguez-Bottero, S.; Quijano, C.; Cassina, P.; Souza, J. M., Impact of monomeric, oligomeric and fibrillar alpha-synuclein on astrocyte reactivity and toxicity to neurons. *Biochem. J.* **2018**, *475*, 3153-3169.
4. Roberts, H. L.; Brown, D. R., Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α -synuclein. *Biomolecules* **2015**, *5*, 282-305.
5. Substantia nigra and Parkinson disease. <https://medlineplus.gov/ency/imagepages/19515.htm> (accessed 09/09/2019).
6. Parkinson's dementia vs. dementia with Lewy bodies. <https://www.verywellhealth.com/parkinsons-dementia-vs-lewy-dementia-98766> (accessed 17/10/2019).
7. Wilson, H.; Dervenoulas, G.; Pagano, G.; Koros, C.; Yousaf, T.; Picillo, M.; Polychronis, S.; Simitsi, A.; Giordano, B.; Chappell, Z., et al., Serotonergic pathology and disease burden in the premotor and motor phase of A53T α -synuclein parkinsonism: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* **2019**, *18*, 748-759.
8. Spillantini, M. G.; Crowther, R. A.; Jakes, R.; Hasegawa, M.; Goedert, M., α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6469-6473.
9. Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M., α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **1997**, *388*, 839-840.
10. Theillet, F.-X.; Binolfi, A.; Bekei, B.; Martorana, A.; Rose, H. M.; Stuver, M.; Verzini, S.; Lorenz, D.; van Rossum, M.; Goldfarb, D., et al., Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature* **2016**, *530*, 45-50.
11. Fauvet, B.; Mbefo, M. K.; Fares, M.-B.; Desobry, C.; Michael, S.; Ardah, M. T.; Tsika, E.; Coune, P.; Prudent, M.; Lion, N., et al., α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15345-15364.
12. Bartels, T.; Choi, J. G.; Selkoe, D. J., α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* **2011**, *477*, 107-110.
13. Burré, J.; Vivona, S.; Diao, J.; Sharma, M.; Brunger, A. T.; Südhof, T. C., Properties of native brain α -synuclein. *Nature* **2013**, *498*, E4.
14. Bartels, T.; Selkoe, D. J., Bartels & Selkoe reply. *Nature* **2013**, *498*, E6.
15. Vamvaca, K.; Volles, M. J.; Lansbury, P. T., The first N-terminal amino acids of α -synuclein are essential for α -helical structure formation *in vitro* and membrane binding in yeast. *J. Mol. Biol.* **2009**, *389*, 413-424.
16. Dikiy, I.; Eliezer, D., N-terminal acetylation stabilizes N-terminal helicity in lipid- and micelle-bound α -synuclein and increases its affinity for physiological membranes. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 3652-3665.
17. Fusco, G.; De Simone, A.; Gopinath, T.; Vostrikov, V.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Veglia, G., Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3827.
18. Kessler, J. C.; Rochet, J.-C.; Lansbury, P. T., The N-terminal repeat domain of α -synuclein inhibits β -sheet and amyloid fibril formation. *Biochemistry* **2003**, *42*, 672-678.
19. Han, H.; Weinreb, P. H.; Lansbury, P. T., The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by β -amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease? *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 163-169.

20. Iwai, A.; Masliah, E.; Yoshimoto, M.; Ge, N.; Flanagan, L.; Rohan de Silva, H. A.; Kittel, A.; Saitoh, T., The precursor protein of Non-A β Component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* **1995**, *14*, 467-475.
21. Weinreb, P. H.; Zhen, W.; Poon, A. W.; Conway, K. A.; Lansbury, P. T., NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13709-13715.
22. Culvenor, J. G.; McLean, C. A.; Cutt, S.; Campbell, B. C. V.; Maher, F.; Jäkälä, P.; Hartmann, T.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; Li, Q.-X., Non-A β component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) Revisited : NAC and α -synuclein are not associated with A β amyloid. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 1173-1181.
23. Lautenschläger, J.; Stephens, A. D.; Fusco, G.; Ströhl, F.; Curry, N.; Zacharopoulou, M.; Michel, C. H.; Laine, R.; Nespovitaya, N.; Fantham, M., et al., C-terminal calcium binding of α -synuclein modulates synaptic vesicle interaction. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 712.
24. Tuttle, M. D.; Comellas, G.; Nieuwkoop, A. J.; Covell, D. J.; Berthold, D. A.; Kloepper, K. D.; Courtney, J. M.; Kim, J. K.; Barclay, A. M.; Kendall, A., et al., Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 409-415.
25. Iyer, A.; Roeters, S. J.; Kogan, V.; Woutersen, S.; Claessens, M. M. A. E.; Subramaniam, V., C-Terminal truncated α -synuclein fibrils contain strongly twisted β -sheets. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15392-15400.
26. Ma, L.; Yang, C.; Zhang, X.; Li, Y.; Wang, S.; Zheng, L.; Huang, K., C-terminal truncation exacerbates the aggregation and cytotoxicity of α -Synuclein: A vicious cycle in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 3714-3725.
27. Li, W.; West, N.; Colla, E.; Pletnikova, O.; Troncoso, J. C.; Marsh, L.; Dawson, T. M.; Jäkälä, P.; Hartmann, T.; Price, D. L., et al., Aggregation promoting C-terminal truncation of α -synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 2162-2167.
28. Kim, T. D.; Paik, S. R.; Yang, C.-H., Structural and functional implications of C-terminal regions of α -synuclein. *Biochemistry* **2002**, *41*, 13782-13790.
29. van der Wateren, I. M.; Knowles, T. P. J.; Buell, A. K.; Dobson, C. M.; Galvagnion, C., C-terminal truncation of α -synuclein promotes amyloid fibril amplification at physiological pH. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 5506-5516.
30. Bellani, S.; Sousa, V. L.; Ronzitti, G.; Valtorta, F.; Meldolesi, J.; Chierigatti, E., The regulation of synaptic function by α -synuclein. *Commun. Integr. Biol.* **2010**, *3*, 106-109.
31. Bendor, J. T.; Logan, T. P.; Edwards, R. H., The function of α -synuclein. *Neuron* **2013**, *79*, 1044-1066.
32. Bousset, L.; Pieri, L.; Ruiz-Arlandis, G.; Gath, J.; Jensen, P. H.; Habenstein, B.; Madiona, K.; Olieric, V.; Böckmann, A.; Meier, B. H., et al., Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2575.
33. Gath, J.; Bousset, L.; Habenstein, B.; Melki, R.; Böckmann, A.; Meier, B. H., Unlike twins: an NMR comparison of two α -synuclein polymorphs featuring different toxicity. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e90659.
34. Guerrero-Ferreira, R.; Taylor, N. M. I.; Arteni, A.-A.; Kumari, P.; Mona, D.; Ringler, P.; Britschgi, M.; Lauer, M. E.; Verasdock, J.; Riek, R., et al., Two new polymorphic structures of alpha-synuclein solved by cryo-electron microscopy. *bioRxiv* **2019**, 654582.
35. Li, B.; Ge, P.; Murray, K. A.; Sheth, P.; Zhang, M.; Nair, G.; Sawaya, M. R.; Shin, W. S.; Boyer, D. R.; Ye, S., et al., Cryo-EM of full-length α -synuclein reveals fibril polymorphs with a common structural kernel. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3609.
36. Gath, J.; Bousset, L.; Habenstein, B.; Melki, R.; Meier, B. H.; Böckmann, A., Yet another polymorph of α -synuclein: solid-state sequential assignments. *Biomol. NMR Assignments* **2014**, *8*, 395-404.

37. Watson, M. D.; Lee, J. C., N-Terminal acetylation affects α -synuclein fibril polymorphism. *Biochemistry* **2019**, *58*, 3630-3633.
38. Petkova, A. T.; Leapman, R. D.; Guo, Z.; Yau, W.-M.; Mattson, M. P.; Tycko, R., Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Science* **2005**, *307*, 262-265.
39. Tycko, R., Amyloid polymorphism: Structural basis and neurobiological relevance. *Neuron* **2015**, *86*, 632-645.
40. Fändrich, M.; Nyström, S.; Nilsson, K. P. R.; Böckmann, A.; LeVine, H., 3rd; Hammarström, P., Amyloid fibril polymorphism: a challenge for molecular imaging and therapy. *J. Intern. Med.* **2018**, *283*, 218-237.
41. Sebastiao, M.; Quittot, N.; Bourgault, S., Thioflavin T fluorescence to analyse amyloid formation kinetics: Measurement frequency as a factor explaining irreproducibility. *Anal. Biochem.* **2017**, *532*, 83-86.
42. Bodner, C. R.; Dobson, C. M.; Bax, A., Multiple tight phospholipid-binding modes of α -synuclein revealed by solution NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **2009**, *390*, 775-790.
43. Chandra, S.; Chen, X.; Rizo, J.; Jahn, R.; Südhof, T. C., A broken α -helix in folded α -synuclein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15313-15318.
44. Burré, J.; Sharma, M.; Südhof, T. C., α -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, E4274-E4283.
45. Burré, J.; Sharma, M.; Tsetsenis, T.; Buchman, V.; Etherton, M. R.; Südhof, T. C., α -Synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro*. *Science* **2010**, *329*, 1663-1667.
46. Chandra, S.; Gallardo, G.; Fernández-Chacón, R.; Schlüter, O. M.; Südhof, T. C., α -Synuclein cooperates with CSP α in preventing neurodegeneration. *Cell* **2005**, *123*, 383-396.
47. Choi, B.-K.; Choi, M.-G.; Kim, J.-Y.; Yang, Y.; Lai, Y.; Kweon, D.-H.; Lee, N. K.; Shin, Y.-K., Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 4087.
48. Lai, Y.; Kim, S.; Varkey, J.; Lou, X.; Song, J.-K.; Diao, J.; Langen, R.; Shin, Y.-K., Nonaggregated α -synuclein influences SNARE-dependent vesicle docking via membrane binding. *Biochemistry* **2014**, *53*, 3889-3896.
49. Geng, X.; Lou, H.; Wang, J.; Li, L.; Swanson, A. L.; Sun, M.; Beers-Stolz, D.; Watkins, S.; Perez, R. G.; Drain, P., α -Synuclein binds the KATP channel at insulin-secreting granules and inhibits insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2010**, *300*, E276-E286.
50. Sharma, S. K.; Chorell, E.; Steneberg, P.; Vernersson-Lindahl, E.; Edlund, H.; Wittung-Stafshede, P., Insulin-degrading enzyme prevents α -synuclein fibril formation in a nonproteolytical manner. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12531.
51. Rodriguez-Araujo, G.; Nakagami, H.; Hayashi, H.; Mori, M.; Shiuchi, T.; Minokoshi, Y.; Nakaoka, Y.; Takami, Y.; Komuro, I.; Morishita, R., et al., Alpha-synuclein elicits glucose uptake and utilization in adipocytes through the Gab1/PI3K/Akt transduction pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 1123-1133.
52. Rodriguez-Araujo, G.; Nakagami, H.; Takami, Y.; Katsuya, T.; Akasaka, H.; Saitoh, S.; Shimamoto, K.; Morishita, R.; Rakugi, H.; Kaneda, Y., Low alpha-synuclein levels in the blood are associated with insulin resistance. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12081.
53. Zhu, M.; Qin, Z.-J.; Hu, D.; Munishkina, L. A.; Fink, A. L., α -Synuclein can function as an antioxidant preventing oxidation of unsaturated lipid in vesicles. *Biochemistry* **2006**, *45*, 8135-8142.
54. Hashimoto, M.; Hsu, L. J.; Rockenstein, E.; Takenouchi, T.; Mallory, M.; Masliah, E., α -Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 11465-11472.

55. Jin, H.; Kanthasamy, A.; Ghosh, A.; Yang, Y.; Anantharam, V.; Kanthasamy, A. G., α -Synuclein negatively regulates protein kinase C δ expression to suppress apoptosis in dopaminergic neurons by reducing p300 histone acetyltransferase activity. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 2035.
56. Peng, X. M.; Tehrani, R.; Dietrich, P.; Stefanis, L.; Perez, R. G., α -Synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 3523.
57. Perez, R. G.; Waymire, J. C.; Lin, E.; Liu, J. J.; Guo, F.; Zigmond, M. J., A role for α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 3090.
58. Auluck, P. K.; Caraveo, G.; Lindquist, S., α -Synuclein: Membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 211-233.
59. Andreasen, M.; Lorenzen, N.; Otzen, D., Interactions between misfolded protein oligomers and membranes: A central topic in neurodegenerative diseases? *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2015**, *1848*, 1897-1907.
60. Gorbenko, G. P.; Kinnunen, P. K. J., The role of lipid-protein interactions in amyloid-type protein fibril formation. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *141*, 72-82.
61. Snead, D.; Eliezer, D., Alpha-synuclein function and dysfunction on cellular membranes. *Exp. Neurobiol.* **2014**, *23*, 292-313.
62. Buell, A. K.; Galvagnion, C.; Gaspar, R.; Sparr, E.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Linse, S.; Dobson, C. M., Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 7671-7676.
63. Galvagnion, C., The role of lipids interacting with alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Parkinson's Dis.* **2017**, *7*, 433-450.
64. Galvagnion, C.; Buell, A. K.; Meisl, G.; Michaels, T. C. T.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M., Lipid vesicles trigger α -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 229-234.
65. Dikiy, I.; Eliezer, D., Folding and misfolding of alpha-synuclein on membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2012**, *1818*, 1013-1018.
66. O'Leary, E. I.; Lee, J. C., Interplay between α -synuclein amyloid formation and membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteom.* **2019**, *1867*, 483-491.
67. Comellas, G.; Lemkau, L. R.; Zhou, D. H.; George, J. M.; Rienstra, C. M., Structural intermediates during α -synuclein fibrillogenesis on phospholipid vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5090-5099.
68. Takamori, S.; Holt, M.; Stenius, K.; Lemke, E. A.; Grønborg, M.; Riedel, D.; Urlaub, H.; Schenck, S.; Brügger, B.; Ringler, P., et al., Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **2006**, *127*, 831-846.
69. Shamoto-Nagai, M.; Hisaka, S.; Naoi, M.; Maruyama, W., Modification of α -synuclein by lipid peroxidation products derived from polyunsaturated fatty acids promotes toxic oligomerization: its relevance to Parkinson disease. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2018**, *62*, 207-212.
70. Angelova, P. R.; Horrocks, M. H.; Klenerman, D.; Gandhi, S.; Abramov, A. Y.; Shchepinov, M. S., Lipid peroxidation is essential for α -synuclein-induced cell death. *J. Neurochem.* **2015**, *133*, 582-589.
71. Pan, J.; Dalzini, A.; Khadka, N. K.; Aryal, C. M.; Song, L., Lipid extraction by α -synuclein generates semi-transmembrane defects and lipoprotein nanoparticles. *ACS Omega* **2018**, *3*, 9586-9597.
72. Chaudhary, H.; Iyer, A.; Subramaniam, V.; Claessens, M. M. A. E., α -Synuclein oligomers stabilize pre-existing defects in supported bilayers and propagate membrane damage in a fractal-like pattern. *Langmuir* **2016**, *32*, 11827-11836.

73. Ouberai, M. M.; Wang, J.; Swann, M. J.; Galvagnion, C.; Guilliams, T.; Dobson, C. M.; Welland, M. E., α -Synuclein senses lipid packing defects and induces lateral expansion of lipids leading to membrane remodeling. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 20883-20895.
74. Orth, M.; Bellosta, S., Cholesterol: Its regulation and role in central nervous system disorders. *Cholesterol* **2012**, *2012*, 19.
75. Björkhem, I.; Meaney, S., Brain cholesterol: Long secret life behind a barrier. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 806-815.
76. Goritz, C.; Mauch, D. H.; Pfrieger, F. W., Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol. Cell Neurosci.* **2005**, *29*, 190-201.
77. Mauch, D. H.; Nägler, K.; Schumacher, S.; Göritz, C.; Müller, E.-C.; Otto, A.; Pfrieger, F. W., CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* **2001**, *294*, 1354-1357.
78. Pfrieger, F. W.; Ungerer, N., Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog. Lipid Res.* **2011**, *50*, 357-371.
79. Singer, S. J.; Nicolson, G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **1972**, *175*, 720.
80. Nicolson, G. L., The fluid—mosaic model of membrane structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2014**, *1838*, 1451-1466.
81. Yeagle, P. L., *The structure of biological membranes*. CRC Press: 2004.
82. Chan, Y.-H. M.; Boxer, S. G., Model membrane systems and their applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 581-587.
83. Bitounis, D.; Fanciullino, R.; Iliadis, A.; Ciccolini, J., Optimizing druggability through liposomal formulations: New approaches to an old concept. *ISRN Pharmaceutics* **2012**, *2012*, 11.
84. Jones, M. N.; Chapman, D., *Micelles, monolayers, and biomembranes*. Wiley-Wiss: 1995.
85. Gennis, R. B., *Biomembranes: Molecular structure and function*. Springer Science & Business Media: 2013; p 549.
86. Perutková, Š.; Daniel, M.; Dolinar, G.; Rappolt, M.; Kralj-Iglič, V.; Iglič, A. In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*; Academic Press: 2009; Vol. 9, pp 237-278.
87. Kimura, Y.; Nagai, Y., Infrared spectra of brain phosphatidylserine. *Biochem. J.* **1960**, *77*, 3-4.
88. Park, J.-Y.; Lansbury, P. T., β -Synuclein inhibits formation of α -synuclein protofibrils: A possible therapeutic strategy against Parkinson's disease. *Biochemistry* **2003**, *42*, 3696-3700.
89. Tsigelny, I. F.; Bar-On, P.; Sharikov, Y.; Crews, L.; Hashimoto, M.; Miller, M. A.; Keller, S. H.; Platoshyn, O.; Yuan, J. X. J.; Masliah, E., Dynamics of α -synuclein aggregation and inhibition of pore-like oligomer development by β -synuclein. *FEBS J.* **2007**, *274*, 1862-1877.
90. Bodles, A. M.; El-Agnaf, O. M. A.; Greer, B.; Guthrie, D. J. S.; Irvine, G. B., Inhibition of fibril formation and toxicity of a fragment of α -synuclein by an N-methylated peptide analogue. *Neurosci. Lett.* **2004**, *359*, 89-93.
91. Bodles, A. M.; Guthrie, D. J. S.; Greer, B.; Irvine, G. B., Identification of the region of Non-A β Component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity. *J. Neurochem.* **2001**, *78*, 384-395.
92. Periquet, M.; Fulga, T.; Myllykangas, L.; Schlossmacher, M. G.; Feany, M. B., Aggregated α -synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity *in vivo*. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 3338-3346.
93. Waxman, E. A.; Mazzulli, J. R.; Giasson, B. I., Characterization of hydrophobic residue requirements for α -synuclein fibrillization. *Biochemistry* **2009**, *48*, 9427-9436.
94. Giasson, B. I.; Murray, I. V. J.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y., A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α -synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2380-2386.

95. Park, S.-B.; Yoon, J.-S.; Jang, S.-M.; Lee, K.-H.; Shin, S.-M., Computational study on oligomer formation of fibril-forming peptide of α -synuclein. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, *33*, 848-854.
96. Yoon, J.; Jang, S.; Lee, K.; Shin, S., Dimerization of fibril-forming segments of α -synuclein. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2009**, *30*, 1845-1850.
97. 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 associated with neurodegenerative diseases. *J. Mol. Biol.* **2005**, *350*, 379-392.
98. Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., Design of an N-methylated peptide inhibitor of α -synuclein aggregation guided by solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7873-7881.
99. El-Agnaf, O. M. A.; Paleologou, K. E.; Greer, B.; Abogrein, A. M.; King, J. E.; Salem, S. A.; Fullwood, N. J.; Benson, F. E.; Hewitt, R.; Ford, K. J., et al., A strategy for designing inhibitors of α -synuclein aggregation and toxicity as a novel treatment for Parkinson's disease and related disorders. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1315-1317.
100. Bédard, L.; Lefèvre, T.; Morin-Michaud, É.; Auger, M., Besides fibrillization: Putative role of the peptide fragment 71–82 on the structural and assembly behavior of α -synuclein. *Biochemistry* **2014**, *53*, 6463-6472.

Chapitre 2

1. Madine, J.; Doig, A. J.; Kitmitto, A.; Middleton, D. A., Studies of the aggregation of an amyloidogenic α -synuclein peptide fragment. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 1113-1115.
2. Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., Design of an N-methylated peptide inhibitor of α -synuclein aggregation guided by solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7873-7881.
3. Park, S.-B.; Yoon, J.-S.; Jang, S.-M.; Lee, K.-H.; Shin, S.-M., Computational study on oligomer formation of fibril-forming peptide of α -synuclein. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, *33*, 848-854.
4. Giasson, B. I.; Murray, I. V. J.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y., A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α -synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2380-2386.
5. Madine, J.; Hughes, E.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., The effects of α -synuclein on phospholipid vesicle integrity: a study using ³¹P NMR and electron microscopy. *Mol. Membr. Biol.* **2008**, *25*, 518-527.
6. Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., The aggregation and membrane-binding properties of an α -synuclein peptide fragment. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 1127-1129.
7. McHale, J. L., *Molecular spectroscopy*. CRC Press: 2017; p 457.
8. Mantsch, H. H.; McElhaney, R. N., Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 213-226.
9. Stair, R.; Coblentz, W., Infrared absorption spectra of plant and animal tissue and of various other substances. *J. Res. Nat. Bur. Stand.* **1935**, *15*, 295-316.
10. Klotz, I. M.; Griswold, P.; Gruen, D. M., Infrared spectra of some proteins and related substances. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 1615-1620.
11. Buswell, A.; Krebs, K. F.; Rodebush, W. H., The infrared absorption of proteins in the 3 μ region. XII. *J. Phys. Chem.* **1940**, *44*, 1126-1137.
12. Bath, J. D.; Ellis, J. W., Some features and implications of the near infrared absorption spectra of various proteins: Gelatin, silk fibroin, and zinc insulinate. *J. Phys. Chem.* **1941**, *45*, 204-209.
13. Barth, A., Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073-1101.

14. Gerwert, K., Molecular reaction mechanisms of proteins as monitored by time-resolved FTIR spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 769-773.
15. Lórenz-Fonfría, V. A.; Heberle, J., Proton transfer and protein conformation dynamics in photosensitive proteins by time-resolved step-scan Fourier-transform infrared spectroscopy. *J. Vis. Exp.* **2014**, e51622-e51622.
16. Maeda, A., Application of FTIR spectroscopy to the structural study on the function of bacteriorhodopsin. *Isr. J. Chem.* **1995**, *35*, 387-400.
17. Breton, J., Fourier transform infrared spectroscopy of primary electron donors in type I photosynthetic reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1507*, 180-193.
18. Barth, A.; Kreutz, W.; Mäntele, W., Ca²⁺ release from the phosphorylated and the unphosphorylated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase results in parallel structural changes: An infrared spectroscopic study. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25507-25510.
19. von Germar, F.; Barth, A.; Mäntele, W., Structural changes of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase upon nucleotide binding studied by fourier transform infrared spectroscopy. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1531-1540.
20. Barth, A.; Mäntele, W., ATP-Induced phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase: Molecular interpretation of infrared difference spectra. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 538-544.
21. Barth, A., Phosphoenzyme conversion of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: Molecular interpretation of infrared difference spectra. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22170-22175.
22. Kong, J.; Yu, S., Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 549-559.
23. Brielle, E. S.; Arkin, I. T., Site-specific hydrogen exchange in a membrane environment analyzed by infrared spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 4059-4065.
24. Ma, J.; Pazos, I. M.; Zhang, W.; Culik, R. M.; Gai, F., Site-specific infrared probes of proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2015**, *66*, 357-377.
25. Mendelsohn, R.; Mantsch, H. H. In *Progress in protein-lipid interactions*; Watts, A.; De Pont, J. J. H. H. M., Eds.; Elsevier: 1986; Vol. 2, pp 103-146.
26. Lewis, R. N.; McElhaney, R. N.; Pohle, W.; Mantsch, H. H., Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 2367-2375.
27. Blume, A.; Huebner, W.; Messner, G., Fourier transform infrared spectroscopy of ¹³C=O labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8239-8249.
28. Milosevic, M., Internal reflection and ATR spectroscopy. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2004**, *39*, 365-384.
29. Mantsch, H. H.; Casal, H. L., Biological applications of infrared spectrometry. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1986**, *324*, 655-661.
30. Nafie, L. A.; Cheng, J. C.; Stephens, P. J., Vibrational circular dichroism of 2,2,2-trifluoro-1-phenylethanol. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3842-3843.
31. Hsu, E. C.; Holzwarth, G., Vibrational circular dichroism observed in crystalline α -NiSO₄ · 6H₂O and α -ZnSeO₄ · 6H₂O between 1900 and 5000 cm⁻¹. *J. Chem. Phys.* **1973**, *59*, 4678-4685.
32. Buffeteau, T.; Lagugné-Labarthe, F.; Sourisseau, C., Vibrational circular dichroism in general anisotropic thin solid films: Measurement and theoretical approach. *Appl. Spectrosc.* **2005**, *59*, 732-745.
33. Nafie, L. A., Vibrational optical activity. *Appl. Spectrosc.* **1996**, *50*, 14A-26A.
34. Drake, A. F., Polarisation modulation-the measurement of linear and circular dichroism. *J. Phys. E Sci. Instrum.* **1986**, *19*, 170-181.

35. Polavarapu, P. L. In *Fourier Transform Infrared Spectra*; Ferraro, J. R.; Basile, L. J., Eds.; Academic Press: San Diego, 1985; pp 61-96.
36. Holzwarth, G.; Hsu, E. C.; Mosher, H. S.; Faulkner, T. R.; Moscovitz, A., Infrared circular dichroism of carbon-hydrogen and carbon-deuterium stretching modes. Observations. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 251-252.
37. Polyanichko, A. M.; Andrushchenko, V. V.; Chikhirzhina, E. V.; Vorob'ev, V. I.; Wieser, H., The effect of manganese(II) on DNA structure: electronic and vibrational circular dichroism studies. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 989-996.
38. Zhong, W.; Gulotta, M.; Goss, D. J.; Diem, M., DNA solution conformation via infrared circular dichroism: experimental and theoretical results for B-family polymers. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7485-7491.
39. Wang, L.; Keiderling, T. A., Vibrational circular dichroism studies of the A-to-B conformational transition in DNA. *Biochemistry* **1992**, *31*, 10265-10271.
40. Kypr, J.; Kejnovská, I.; Renčiuk, D.; Vorlíčková, M., Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1713-1725.
41. Nový, J.; Urbanová, M., Vibrational and electronic circular dichroism study of the interactions of cationic porphyrins with (dG-dC)₁₀ and (dA-dT)₁₀. *Biopolymers* **2007**, *85*, 349-358.
42. Tsankov, D.; Krasteva, M.; Andrushchenko, V.; van de Sande, J. H.; Wieser, H., Vibrational circular dichroism signature of hemiprotonated intercalated four-stranded i-DNA. *Biophys. Chem.* **2006**, *119*, 1-6.
43. Birke, S. S.; Moses, M.; Kagalovsky, B.; Jano, D.; Gulotta, M.; Diem, M., Infrared CD of deoxy oligonucleotides. Conformational studies of 5'd(GCGC)3', 5'd(CGCG)3', 5'd(CCGG)3', and 5'd(GGCC)3' in low and high salt aqueous solution. *Biophys. J.* **1993**, *65*, 1262-1271.
44. Boichichio, B.; Tamburro Antonio, M., Polyproline II structure in proteins: Identification by chiroptical spectroscopies, stability, and functions. *Chirality* **2002**, *14*, 782-792.
45. Dukor, R. K.; Keiderling, T. A., Reassessment of the random coil conformation: vibrational CD study of proline oligopeptides and related polypeptides. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1747-1761.
46. Keiderling, T. A., Protein and peptide secondary structure and conformational determination with vibrational circular dichroism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 682-688.
47. Kurouski, D., Advances of vibrational circular dichroism (VCD) in bioanalytical chemistry. A review. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *990*, 54-66.
48. Paterlini, M. G.; Freedman, T. B.; Nafie, L. A., Vibrational circular dichroism spectra of three conformationally distinct states and an unordered state of poly(L-lysine) in deuterated aqueous solution. *Biopolymers* **1986**, *25*, 1751-1765.
49. McBride, W. G., Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* **1961**, *2*, 90927-90928.
50. He, Y.; Wang, B.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A., Determination of Absolute Configuration of Chiral Molecules Using Vibrational Optical Activity: A Review. *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65*, 699-723.
51. Secondary structure of proteins and peptides. <https://www.bruker.com/applications/pharma-biopharma/quality-assurance/vibrational-circular-dichroism/secondary-structure-of-proteins-and-peptides.html> (accessed 10/10/2019).
52. Ma, S.; Cao, X.; Mak, M.; Sadik, A.; Walkner, C.; Freedman, T. B.; Lednev, I. K.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A., Vibrational circular dichroism shows unusual sensitivity to protein fibril formation and development in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12364-12365.
53. Bloch, F., Nuclear induction. *Phys. Rev.* **1946**, *70*, 460-474.
54. Bloch, F.; Nordsieck, A., Note on the radiation field of the electron. *Phys. Rev.* **1937**, *52*, 54-59.

55. Bloembergen, N.; Purcell, E. M.; Pound, R. V., Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. *Phys. Rev.* **1948**, *73*, 679-712.
56. Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V., Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 37-38.
57. Hester, R. K.; Ackerman, J. L.; Cross, V. R.; Waugh, J. S., Resolved dipolar coupling spectra of dilute nuclear spins in solids. *Phys. Rev. Lett.* **1975**, *34*, 993-995.
58. Hester, R. K.; Ackerman, J. L.; Neff, B. L.; Waugh, J. S., Separated local field spectra in NMR: Determination of structure of solids. *Phys. Rev. Lett.* **1976**, *36*, 1081-1083.
59. Rybaczewski, E. F.; Neff, B. L.; Waugh, J. S.; Sherfinski, J. S., High resolution ^{13}C NMR in solids: ^{13}C local fields of CH, CH₂, and CH₃. *J. Chem. Phys.* **1977**, *67*, 1231-1236.
60. Waugh, J. S., Uncoupling of local field spectra in nuclear magnetic resonance: determination of atomic positions in solids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1976**, *73*, 1394-1397.
61. Waugh, J. S.; Huber, L. M.; Haerberlen, U., Approach to high-resolution NMR in solids. *Phys. Rev. Lett.* **1968**, *20*, 180-182.
62. Atta-Ur-Rahman, T., *Nuclear magnetic resonance: basic principles*. Springer Science & Business Media: 2012.
63. Teng, Q., *Structural biology: practical NMR applications*. Springer Science & Business Media: 2012.
64. Levitt, M. H., *Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance*. John Wiley & Sons: 2001.
65. Cavanagh, J.; Fairbrother, W. J.; Palmer III, A. G.; Skelton, N. J., *Protein NMR spectroscopy: principles and practice*. Elsevier: 1995.
66. Jelinski, L. W.; Melchior, M. T., High-resolution NMR of solids. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2004**, *35*, 25-93.
67. Gagnon, M.-C.; Auger, M.; Paquin, J.-F., Progress in the synthesis of fluorinated phosphatidylcholines for biological applications. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 4925-4941.
68. Berden, J. A.; Cullis, P. R.; Hoult, D. I.; McLaughlin, A. C.; Radda, G. K.; Richards, R. E., Frequency dependence of ^{31}P NMR linewidths in sonicated phospholipid vesicles: Effects of chemical shift anisotropy. *FEBS Lett.* **1974**, *46*, 55-58.
69. McLaughlin, A. C.; Cullis, P. R.; Berden, J. A.; Richards, R. E., ^{31}P NMR of phospholipid membranes: Effects of chemical and anisotropy at high magnetic field strengths. *J. Magn. Reson.* **1975**, *20*, 146-165.
70. McLaughlin, A. C.; Cullis, P. R.; Hemminga, M. A.; Hoult, D. I.; Radda, G. K.; Ritchie, G. A.; Seeley, P. J.; Richards, R. E., Application of ^{31}P NMR to model and biological membrane systems. *FEBS Lett.* **1975**, *57*, 213-218.
71. Hahn, E. L., Spin echoes. *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 580-594.
72. Warschawski, D. E.; Arnold, A. A.; Marcotte, I., A new method of assessing lipid mixtures by ^{31}P magic-angle spinning NMR. *Biophys. J.* **2018**, *114*, 1368-1376.
73. Lee, Y. K.; Kurur, N. D.; Helmle, M.; Johannessen, O. G.; Nielsen, N. C.; Levitt, M. H., Efficient dipolar recoupling in the NMR of rotating solids. A sevenfold symmetric radiofrequency pulse sequence. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *242*, 304-309.
74. Edén, M.; Levitt, M. H., Pulse sequence symmetries in the nuclear magnetic resonance of spinning solids: Application to heteronuclear decoupling. *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 1511-1519.
75. Brinkmann, A.; Edén, M.; Levitt, M. H., Synchronous helical pulse sequences in magic-angle spinning nuclear magnetic resonance: Double quantum recoupling of multiple-spin systems. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 8539-8554.
76. Chan, J. C. C.; Tycko, R., Recoupling of chemical shift anisotropies in solid-state NMR under high-speed magic-angle spinning and in uniformly ^{13}C -labeled systems. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 8378-8389.

77. Hartmann, S. R.; Hahn, E. L., Nuclear double resonance in the rotating frame. *Phys. Rev.* **1962**, *128*, 2042-2053.
78. Tycko, R.; Dabbagh, G., Measurement of nuclear magnetic dipole—dipole couplings in magic angle spinning NMR. *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *173*, 461-465.
79. Gregory, D. M.; Mitchell, D. J.; Stringer, J. A.; Kiihne, S.; Shiels, J. C.; Callahan, J.; Mehta, M. A.; Drobny, G. P., Windowless dipolar recoupling: the detection of weak dipolar couplings between spin 1/2 nuclei with large chemical shift anisotropies. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *246*, 654-663.
80. Caporini, M. A.; Bajaj, V. S.; Veshtort, M.; Fitzpatrick, A.; MacPhee, C. E.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G., Accurate determination of interstrand distances and alignment in amyloid fibrils by magic angle spinning NMR. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 13555-13561.
81. Long, J. R.; Mills, F. D.; Raucci, F., A high resolution structure of the putative hinge region in M2 channel-lining segments of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2007**, *1768*, 2961-2970.
82. Bak, M.; Rasmussen, J. T.; Nielsen, N. C., SIMPSON: A general simulation program for solid-state NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 296-330.
83. Benzinger, T. L. S.; Gregory, D. M.; Burkoth, T. S.; Miller-Auer, H.; Lynn, D. G.; Botto, R. E.; Meredith, S. C., Propagating structure of Alzheimer's β -amyloid(10–35) is parallel β -sheet with residues in exact register. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 13407-13412.
84. Merrifield, R. B., Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
85. Ten Kortenaar, P. B. W.; Van Dijk, B. G.; Peeters, J. M.; Raaben, B. J.; Adams, P. J. H. M.; Tesser, G. I., Rapid and efficient method for the preparation of Fmoc-amino acids starting from 9-fluorenylmethanol. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27*, 398-400.
86. Buseck, P.; Cowley, J.; Eyring, L., *High-resolution transmission electron microscopy: and associated techniques*. Oxford University Press: 1989; p 670.
87. Jiang, Y.; Chen, Z.; Han, Y.; Deb, P.; Gao, H.; Xie, S.; Purohit, P.; Tate, M. W.; Park, J.; Gruner, S. M., et al., Electron ptychography of 2D materials to deep sub-ångström resolution. *Nature* **2018**, *559*, 343-349.

Chapitre 3

1. Selkoe, D. J. In *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease (Fifth Edition)*; Pascual, J. M., Ed.; Academic Press: Boston, 2015; pp 753-768.
2. Alzheimer, A., Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt* **1906**, *23*, 1129-1136.
3. Parkinson, J., An essay on the shaking palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **2002**, *14*, 223-236.
4. Eisenberg, D.; Jucker, M., The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* **2012**, *148*, 1188-1203.
5. Sherrington, R.; Rogaev, E. I.; Liang, Y.; Rogaeva, E. A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Chi, H.; Lin, C.; Li, G.; Holman, K., et al., Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **1995**, *375*, 754-760.
6. Valente, E. M.; Abou-Sleiman, P. M.; Caputo, V.; Muqit, M. M. K.; Harvey, K.; Gispert, S.; Ali, Z.; Del Turco, D.; Bentivoglio, A. R.; Healy, D. G., et al., Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **2004**, *304*, 1158-1160.
7. Walker, F. O., Huntington's disease. *The Lancet* **2007**, *369*, 218-228.
8. Selkoe, D. J.; Hardy, J., The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 595-608.

9. Chen, J.; Armstrong, A. H.; Koehler, A. N.; Hecht, M. H., Small molecule microarrays enable the discovery of compounds that bind the Alzheimer's A β peptide and reduce its cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17015-17022.
10. Johnson, S. M.; Connelly, S.; Fearn, C.; Powers, E. T.; Kelly, J. W., The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug. *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 185-203.
11. Collier, T. J.; Srivastava, K. R.; Justman, C.; Grammatopoulos, T.; Hutter-Paier, B.; Prokesh, M.; Havas, D.; Rochet, J.-C.; Liu, F.; Jock, K., et al., Nortriptyline inhibits aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein by enhancing reconfiguration of the monomeric form. *Neurobiol. Dis.* **2017**, *106*, 191-204.
12. Hoyer, W.; Grönwall, C.; Jonsson, A.; Ståhl, S.; Härd, T., Stabilization of a β -hairpin in monomeric Alzheimer's amyloid- β peptide inhibits amyloid formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 5099-5104.
13. Eisele, Y. S.; Monteiro, C.; Fearn, C.; Encalada, S. E.; Wiseman, R. L.; Powers, E. T.; Kelly, J. W., Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2015**, *14*, 759-780.
14. Giasson, B. I.; Murray, I. V. J.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y., A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α -synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2380-2386.
15. Bédard, L.; Lefèvre, T.; Morin-Michaud, É.; Auger, M., Besides fibrillization: Putative role of the peptide fragment 71–82 on the structural and assembly behavior of α -synuclein. *Biochemistry* **2014**, *53*, 6463-6472.
16. Tagliavini, F.; Prelli, F.; Verga, L.; Giaccone, G.; Sarma, R.; Gorevic, P.; Ghetti, B.; Passerini, F.; Ghibaudi, E.; Forloni, G., Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 9678-9682.
17. Guenther, E. L.; Ge, P.; Trinh, H.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Boyer, D. R.; Gonen, T.; Zhou, Z. H.; Eisenberg, D. S., Atomic-level evidence for packing and positional amyloid polymorphism by segment from TDP-43 RRM2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 311-319.
18. Rodriguez, J. A.; Ivanova, M. I.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Reyes, F. E.; Shi, D.; Sangwan, S.; Guenther, E. L.; Johnson, L. M.; Zhang, M., et al., Structure of the toxic core of α -synuclein from invisible crystals. *Nature* **2015**, *525*, 486-490.
19. Soriaga, A. B.; Sangwan, S.; Macdonald, R.; Sawaya, M. R.; Eisenberg, D., Crystal structures of IAPP amyloidogenic segments reveal a novel packing motif of out-of-register beta sheets. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 5810-5816.
20. Astbury, W. T.; Dickinson, S.; Bailey, K., The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *Biochem. J.* **1935**, *29*, 2351-2360.
21. Eisenberg, D. S.; Sawaya, M. R., Structural studies of amyloid proteins at the molecular level. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 69-95.
22. Hoyer, W.; Antony, T.; Cherny, D.; Heim, G.; Jovin, T. M.; Subramaniam, V., Dependence of α -synuclein aggregate morphology on solution conditions. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 383-393.
23. Petkova, A. T.; Leapman, R. D.; Guo, Z.; Yau, W.-M.; Mattson, M. P.; Tycko, R., Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Science* **2005**, *307*, 262-265.
24. Meier, B. H.; Riek, R.; Böckmann, A., Emerging structural understanding of amyloid fibrils by solid-state NMR. *Trends Biochem. Sci.* **2017**, *42*, 777-787.
25. Tycko, R., Amyloid polymorphism: Structural basis and neurobiological relevance. *Neuron* **2015**, *86*, 632-645.

26. Bousset, L.; Pieri, L.; Ruiz-Arlandis, G.; Gath, J.; Jensen, P. H.; Habenstein, B.; Madiona, K.; Olieric, V.; Böckmann, A.; Meier, B. H., et al., Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2575.
27. Gath, J.; Bousset, L.; Habenstein, B.; Melki, R.; Böckmann, A.; Meier, B. H., Unlike twins: an NMR comparison of two α -synuclein polymorphs featuring different toxicity. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e90659.
28. Fitzpatrick, A. W. P.; Debelouchina, G. T.; Bayro, M. J.; Clare, D. K.; Caporini, M. A.; Bajaj, V. S.; Jaroniec, C. P.; Wang, L.; Ladizhansky, V.; Müller, S. A., et al., Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 5468-5473.
29. Maiti, N. C.; Apetri, M. M.; Zagorski, M. G.; Carey, P. R.; Anderson, V. E., Raman spectroscopic characterization of secondary structure in natively unfolded proteins: α -synuclein. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2399-2408.
30. Miura, T.; Hori-i, A.; Mototani, H.; Takeuchi, H., Raman spectroscopic study on the copper(II) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence. *Biochemistry* **1999**, *38*, 11560-11569.
31. Miura, T.; Suzuki, K.; Takeuchi, H., Binding of iron(III) to the single tyrosine residue of amyloid β -peptide probed by Raman spectroscopy. *J. Mol. Struct.* **2001**, *598*, 79-84.
32. Viles, J. H., Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases. Copper, zinc and iron in Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2271-2284.
33. Oladepo, S. A.; Xiong, K.; Hong, Z.; Asher, S. A.; Handen, J.; Lednev, I. K., UV resonance Raman investigations of peptide and protein structure and dynamics. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2604-2628.
34. Chi, Z.; Chen, X. G.; Holtz, J. S. W.; Asher, S. A., UV Resonance Raman-selective amide vibrational enhancement: quantitative methodology for determining protein secondary structure. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2854-2864.
35. Lednev, I. K.; Ermolenkov, V. V.; He, W.; Xu, M., Deep-UV Raman spectrometer tunable between 193 and 205 nm for structural characterization of proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 431-437.
36. Kurouski, D.; Van Duyne, R. P.; Lednev, I. K., Exploring the structure and formation mechanism of amyloid fibrils by Raman spectroscopy: a review. *Analyst* **2015**, *140*, 4967-4980.
37. Mikhonin, A. V.; Bykov, S. V.; Myshakina, N. S.; Asher, S. A., Peptide secondary structure folding reaction coordinate: correlation between UV Raman amide III frequency, Ψ Ramachandran angle, and hydrogen bonding. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 1928-1943.
38. Popova, L. A.; Kodali, R.; Wetzel, R.; Lednev, I. K., Structural variations in the cross- β core of amyloid β fibrils revealed by deep UV resonance Raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6324-6328.
39. Punihaole, D.; Workman, R. J.; Hong, Z.; Madura, J. D.; Asher, S. A., Polyglutamine fibrils: new insights into antiparallel β -sheet conformational preference and side chain structure. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 3012-3026.
40. Barron, L. D.; Hecht, L.; Blanch, E. W.; Bell, A. F., Solution structure and dynamics of biomolecules from Raman optical activity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2000**, *73*, 1-49.
41. Blanch, E. W.; Gill, A. C.; Rhie, A. G. O.; Hope, J.; Hecht, L.; Nielsen, K.; Barron, L. D., Raman optical activity demonstrates poly(L-proline) II helix in the N-terminal region of the ovine prion protein: implications for function and misfunction. *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 467-476.
42. Eker, F.; Griebenow, K.; Schweitzer-Stenner, R., A β_{1-28} fragment of the amyloid peptide predominantly adopts a polyproline II conformation in an acidic solution. *Biochemistry* **2004**, *43*, 6893-6898.

43. Dornhaus, R.; Benner, R. E.; Chang, R. K.; Chabay, I., Surface plasmon contribution to SERS. *Surf. Sci.* **1980**, *101*, 367-373.
44. Yugay, D.; Goronzy, D. P.; Kawakami, L. M.; Claridge, S. A.; Song, T.-B.; Yan, Z.; Xie, Y.-H.; Gilles, J.; Yang, Y.; Weiss, P. S., Copper ion binding site in β -amyloid peptide. *Nano Lett.* **2016**, *16*, 6282-6289.
45. Krasnoslobodtsev, A. V.; Deckert-Gaudig, T.; Zhang, Y.; Deckert, V.; Lyubchenko, Y. L., Polymorphism of amyloid fibrils formed by a peptide from the yeast prion protein Sup35: AFM and Tip-Enhanced Raman Scattering studies. *Ultramicroscopy* **2016**, *165*, 26-33.
46. Paulite, M.; Blum, C.; Schmid, T.; Opilik, L.; Eyer, K.; Walker, G. C.; Zenobi, R., Full spectroscopic tip-enhanced Raman imaging of single nanotapes formed from β -amyloid(1-40) peptide fragments. *ACS Nano* **2013**, *7*, 911-920.
47. Krimm, S.; Bandekar, J. In *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C. B.; Edsall, J. T.; Richards, F. M., Eds.; Academic Press: 1986; Vol. 38, pp 181-364.
48. Schweitzer-Stenner, R.; Measey, T. J., Simulation of IR, Raman and VCD amide I band profiles of self-assembled peptides. *Spectroscopy* **2010**, *24*, 25-36.
49. Welch, W. R. W.; Kubelka, J.; Keiderling, T. A., Infrared, vibrational circular dichroism, and Raman spectral simulations for β -sheet structures with various isotopic labels, interstrand, and stacking arrangements using density functional theory. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 10343-10358.
50. Sarroukh, R.; Goormaghtigh, E.; Ruyschaert, J.-M.; Raussens, V., ATR-FTIR: a "rejuvenated" tool to investigate amyloid proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2013**, *1828*, 2328-2338.
51. Glenner, G. G.; Eanes, E. D.; Bladen, H. A.; Linke, R. P.; Termine, J. D., β -Pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. *J. Histochem. Cytochem.* **1974**, *22*, 1141-1158.
52. Termine, J. D.; Eanes, E. D.; Ein, D.; Glenner, G. G., Infrared spectroscopy of human amyloid fibrils and immunoglobulin proteins. *Biopolymers* **1972**, *11*, 1103-1113.
53. Glenner, G. G.; Wong, C. W., Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *120*, 885-890.
54. Prusiner, S. B.; Groth, D. F.; Bolton, D. C.; Kent, S. B.; Hood, L. E., Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* **1984**, *38*, 127-134.
55. Halverson, K.; Fraser, P. E.; Kirschner, D. A.; Lansbury, P. T., Molecular determinants of amyloid deposition in Alzheimer's disease: conformational studies of synthetic β -protein fragments. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2639-2644.
56. Ashburn, T. T.; Auger, M.; Lansbury, P. T., The structural basis of pancreatic amyloid formation: isotope-edited spectroscopy in the solid state. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 790-791.
57. Halverson, K. J.; Sucholeiki, I.; Ashburn, T. T.; Lansbury, P. T., Location of β -sheet-forming sequences in amyloid proteins by FTIR. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6701-6703.
58. Petty, S. A.; Decatur, S. M., Intersheet rearrangement of polypeptides during nucleation of β -sheet aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 14272-14277.
59. Decatur, S. M., Elucidation of residue-level structure and dynamics of polypeptides via isotope-edited infrared spectroscopy. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 169-175.
60. Welch, W. R. W.; Keiderling, T. A.; Kubelka, J., Structural analyses of experimental ^{13}C edited amide I' IR and VCD for peptide β -sheet aggregates and fibrils using DFT-based spectral simulations. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 10359-10369.
61. Dunkelberger, E. B.; Buchanan, L. E.; Marek, P.; Cao, P.; Raleigh, D. P.; Zanni, M. T., Deamidation accelerates amyloid formation and alters amylin fiber structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12658-12667.

62. Lomont, J. P.; Rich, K. L.; Maj, M.; Ho, J.-J.; Ostrander, J. S.; Zanni, M. T., Spectroscopic signature for stable β -amyloid fibrils versus β -sheet-rich oligomers. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 144-153.
63. Jackson, M.; Mantsch, H. H., The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *30*, 95-120.
64. Berthelot, K.; Lecomte, S.; Géan, J.; Immel, F.; Cullin, C., A yeast toxic mutant of HET-S₍₂₁₈₋₂₈₉₎ prion displays alternative intermediates of amyloidogenesis. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 1239-1246.
65. Perálvarez-Marín, A.; Barth, A.; Gräslund, A., Time-resolved infrared spectroscopy of pH-induced aggregation of the Alzheimer A β ₁₋₂₈ peptide. *J. Mol. Biol.* **2008**, *379*, 589-596.
66. Guo, Y.; Wang, J., Spectroscopic evidence for polymorphic aggregates formed by amyloid- β fragments. *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 3901-3908.
67. Labbé, J.-F.; Lefèvre, T.; Guay-Bégin, A.-A.; Auger, M., Structure and membrane interactions of the β -amyloid fragment 25-35 as viewed using spectroscopic approaches. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 7228-7239.
68. Conway, K. A.; Harper, J. D.; Lansbury, P. T., Fibrils formed in vitro from α -synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* **2000**, *39*, 2552-2563.
69. Uversky, V. N.; Li, J.; Fink, A. L., Evidence for a partially folded intermediate in α -synuclein fibril formation. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10737-10744.
70. Galvagnion, C., The role of lipids interacting with alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Parkinson's Dis.* **2017**, *7*, 433-450.
71. Murphy, R. M., Kinetics of amyloid formation and membrane interaction with amyloidogenic proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2007**, *1768*, 1923-1934.
72. Andreasen, M.; Lorenzen, N.; Otzen, D., Interactions between misfolded protein oligomers and membranes: A central topic in neurodegenerative diseases? *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2015**, *1848*, 1897-1907.
73. Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Chapman, D., Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* **1993**, *32*, 389-394.
74. Kong, J.; Yu, S., Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 549-559.
75. Juszczak, P.; Kołodziejczyk, A. S.; Grzonka, Z., FTIR spectroscopic studies on aggregation process of the β -amyloid 11-28 fragment and its variants. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 23-29.
76. Dzwolak, W.; Lokszejn, A.; Smirnovas, V., New insights into the self-assembly of insulin amyloid fibrils: an H-D exchange FT-IR study. *Biochemistry* **2006**, *45*, 8143-8151.
77. Amenabar, I.; Poly, S.; Nuansing, W.; Hubrich, E. H.; Govyadinov, A. A.; Huth, F.; Krutokhvostov, R.; Zhang, L.; Knez, M.; Heberle, J., et al., Structural analysis and mapping of individual protein complexes by infrared nanospectroscopy. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2890.
78. Henry, S.; Bercu, N. B.; Bobo, C.; Cullin, C.; Molinari, M.; Lecomte, S., Interaction of A β ₁₋₄₂ peptide or their variant with model membrane of different composition probed by infrared nanospectroscopy. *Nanoscale* **2018**, *10*, 936-940.
79. Gelfand, P.; Smith, R. J.; Stavitski, E.; Borchelt, D. R.; Miller, L. M., Characterization of protein structural changes in living cells using time-lapsed FTIR imaging. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6025-6031.
80. Ami, D.; Lavatelli, F.; Rognoni, P.; Palladini, G.; Raimondi, S.; Giorgetti, S.; Monti, L.; Doglia, S. M.; Natalello, A.; Merlini, G., In situ characterization of protein aggregates in human tissues affected by light chain amyloidosis: a FTIR microspectroscopy study. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29096.

81. Polyanichko, A. M. In *Methods in protein structure and stability analysis: vibrational spectroscopy*; Uversky, V. N.; Permyakov, E. A., Eds.; Nova Science Publishers, Inc.: 2007; pp 267-302.
82. Ma, S.; Cao, X.; Mak, M.; Sadik, A.; Walkner, C.; Freedman, T. B.; Lednev, I. K.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A., Vibrational circular dichroism shows unusual sensitivity to protein fibril formation and development in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12364-12365.
83. Measey, T. J.; Schweitzer-Stenner, R., Vibrational circular dichroism as a probe of fibrillogenesis: The origin of the anomalous intensity enhancement of amyloid-like fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1066-1076.
84. Volpatti, L. R.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J., A clear view of polymorphism, twist, and chirality in amyloid fibril formation. *ACS Nano* **2013**, *7*, 10443-10448.
85. Kurouski, D.; Dukor, R. K.; Lu, X.; Nafie, L. A.; Lednev, I. K., Spontaneous inter-conversion of insulin fibril chirality. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2837-2839.
86. Shanmugasundaram, M.; Kurouski, D.; Wan, W.; Stubbs, G.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A.; Lednev, I. K., Rapid filament supramolecular chirality reversal of HET-s (218–289) prion fibrils driven by pH elevation. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 8521-8525.
87. Kurouski, D.; Lu, X.; Popova, L.; Wan, W.; Shanmugasundaram, M.; Stubbs, G.; Dukor, R. K.; Lednev, I. K.; Nafie, L. A., Is supramolecular filament chirality the underlying cause of major morphology differences in amyloid fibrils? *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2302-2312.
88. Bates, G., Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *The Lancet* **2003**, *361*, 1642-1644.
89. Ross, C. A., Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron* **2002**, *35*, 819-822.
90. Kurouski, D.; Kar, K.; Wetzel, R.; Dukor, R. K.; Lednev, I. K.; Nafie, L. A., Levels of supramolecular chirality of polyglutamine aggregates revealed by vibrational circular dichroism. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1638-1643.
91. Kurouski, D.; Handen, J. D.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A.; Lednev, I. K., Supramolecular chirality in peptide microcrystals. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 89-92.
92. Wiltzius, J. J. W.; Sievers, S. A.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Popov, D.; Riek, C.; Eisenberg, D., Atomic structure of the cross- β spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein Sci.* **2008**, *17*, 1467-1474.
93. Shanmugam, G.; Polavarapu, P. L., Structure of A β (25-35) peptide in different environments. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 622-630.
94. Shanmugam, G.; Polavarapu, P. L., Isotope-assisted vibrational circular dichroism investigations of amyloid β peptide fragment, A β (16–22). *J. Struct. Biol.* **2011**, *176*, 212-219.
95. Dukor, R. K.; Keiderling, T. A., Reassessment of the random coil conformation: vibrational CD study of proline oligopeptides and related polypeptides. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1747-1761.
96. Paterlini, M. G.; Freedman Teresa, B.; Nafie Laurence, A., Vibrational circular dichroism spectra of three conformationally distinct states and an unordered state of poly(L-lysine) in deuterated aqueous solution. *Biopolymers* **1986**, *25*, 1751-1765.
97. Stanek, J.; Andreas, L. B.; Jaudzems, K.; Cala, D.; Lalli, D.; Bertarello, A.; Schubeis, T.; Akopjana, I.; Kotelovica, S.; Tars, K., et al., NMR spectroscopic assignment of backbone and side-chain protons in fully protonated proteins: microcrystals, sedimented assemblies, and amyloid fibrils. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 15504-15509.
98. Smith, A. A.; Ravotti, F.; Testori, E.; Cadalbert, R.; Ernst, M.; Böckmann, A.; Meier, B. H., Partially-deuterated samples of HET-s(218–289) fibrils: assignment and deuterium isotope effect. *J. Biomol. NMR* **2017**, *67*, 109-119.

99. Van Melckebeke, H.; Wasmer, C.; Lange, A.; AB, E.; Loquet, A.; Böckmann, A.; Meier, B. H., Atomic-resolution three-dimensional structure of HET-s(218–289) amyloid fibrils by solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13765-13775.
100. Griffiths, J. M.; Ashburn, T. T.; Auger, M.; Costa, P. R.; Griffin, R. G.; Lansbury, P. T., Rotational resonance solid-state NMR elucidates a structural model of pancreatic amyloid. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3539-3546.
101. Andrew, E. R.; Clough, S.; Farnell, L. F.; Gledhill, T. D.; Roberts, I., Resonant rotational broadening of nuclear magnetic resonance spectra. *Phys. Lett.* **1966**, *21*, 505-506.
102. Gullion, T.; Schaefer, J., Rotational-echo double-resonance NMR. *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 196-200.
103. Hing, A. W.; Vega, S.; Schaefer, J., Transferred-echo double-resonance NMR. *J. Magn. Reson.* **1992**, *96*, 205-209.
104. Spencer, R. G. S.; Halverson, K. J.; Auger, M.; McDermott, A. E.; Griffin, R. G.; Lansbury, P. T., An unusual peptide conformation may precipitate amyloid formation in Alzheimer's disease: application of solid-state NMR to the determination of protein secondary structure. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10382-10387.
105. Lansbury Jr, P. T.; Costa, P. R.; Griffiths, J. M.; Simon, E. J.; Auger, M.; Halverson, K. J.; Kocisko, D. A.; Hendsch, Z. S.; Ashburn, T. T.; Spencer, R. G. S., et al., Structural model for the β -amyloid fibril based on interstrand alignment of an antiparallel-sheet comprising a C-terminal peptide. *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 990-998.
106. Balbach, J. J.; Ishii, Y.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Rizzo, N. W.; Dyda, F.; Reed, J.; Tycko, R., Amyloid fibril formation by A β ₁₆₋₂₂, a seven-residue fragment of the Alzheimer's β -amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR. *Biochemistry* **2000**, *39*, 13748-13759.
107. Benzinger, T. L. S.; Gregory, D. M.; Burkoth, T. S.; Miller-Auer, H.; Lynn, D. G.; Botto, R. E.; Meredith, S. C., Propagating structure of Alzheimer's β -amyloid(10–35) is parallel β -sheet with residues in exact register. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 13407-13412.
108. Colvin, M. T.; Silvers, R.; Ni, Q. Z.; Can, T. V.; Sergeev, I.; Rosay, M.; Donovan, K. J.; Michael, B.; Wall, J.; Linse, S., et al., Atomic resolution structure of monomorphic A β ₄₂ amyloid fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9663-9674.
109. Ravotti, F.; Wälti, M. A.; Güntert, P.; Riek, R.; Böckmann, A.; Meier, B. H., Solid-state NMR sequential assignment of an Amyloid- β (1–42) fibril polymorph. *Biomol. NMR Assignments* **2016**, *10*, 269-276.
110. Wälti, M. A.; Ravotti, F.; Arai, H.; Glabe, C. G.; Wall, J. S.; Böckmann, A.; Güntert, P.; Meier, B. H.; Riek, R., Atomic-resolution structure of a disease-relevant A β (1–42) amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E4976-E4984.
111. Xiao, Y.; Ma, B.; McElheny, D.; Parthasarathy, S.; Long, F.; Hoshi, M.; Nussinov, R.; Ishii, Y., A β (1–42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer's disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 499-505.
112. Jaroniec, C. P.; MacPhee, C. E.; Bajaj, V. S.; McMahon, M. T.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G., High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 711-716.
113. Jaroniec, C. P.; Filip, C.; Griffin, R. G., 3D TEDOR NMR experiments for the simultaneous measurement of multiple carbon–nitrogen distances in uniformly ¹³C,¹⁵N-labeled solids. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10728-10742.
114. Jaroniec, C. P.; MacPhee, C. E.; Astrof, N. S.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G., Molecular conformation of a peptide fragment of transthyretin in an amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 16748-16753.
115. Nielsen, J. T.; Bjerring, M.; Jeppesen, M. D.; Pedersen, R. O.; Pedersen, J. M.; Hein, K. L.; Vosegaard, T.; Skrydstrup, T.; Otzen, D. E.; Nielsen, N. C., Unique identification of

- supramolecular structures in amyloid fibrils by solid-state NMR spectroscopy. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 2118-2121.
116. 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. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14990-15001.
 117. Takegoshi, K.; Nakamura, S.; Terao, T., ^{13}C - ^1H dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *344*, 631-637.
 118. van der Wel, P. C. A.; Lewandowski, J. R.; Griffin, R. G., Structural characterization of GNNQQNY amyloid fibrils by magic angle spinning NMR. *Biochemistry* **2010**, *49*, 9457-9469.
 119. Walsh, P.; Simonetti, K.; Sharpe, S., Core structure of amyloid fibrils formed by residues 106-126 of the human prion protein. *Structure* **2009**, *17*, 417-426.
 120. Yau, J.; Sharpe, S., Structures of amyloid fibrils formed by the prion protein derived peptides PrP(244–249) and PrP(245–250). *J. Struct. Biol.* **2012**, *180*, 290-302.
 121. Jones, M.; Wight, D.; McLoughlin, V.; Norrby, K.; Ironside, J. W.; Connolly, J. G.; Farquhar, C. F.; MacGregor, I. R.; Head, M. W., An antibody to the aggregated synthetic prion protein peptide (PrP106–126) selectively recognizes disease-associated prion protein (PrP^{Sc}) from human brain specimens. *Brain Pathol.* **2009**, *19*, 293-302.
 122. Tycko, R., Symmetry-based constant-time homonuclear dipolar recoupling in solid state NMR. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 064506.
 123. Wishart, D. S.; Sykes, B. D., The ^{13}C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 171-180.
 124. Cornilescu, G.; Delaglio, F.; Bax, A., Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 289-302.
 125. Maly, T.; Debelouchina, G. T.; Bajaj, V. S.; Hu, K.-N.; Joo, C.-G.; Mak–Jurkauskas, M. L.; Sirigiri, J. R.; van der Wel, P. C. A.; Herzfeld, J.; Temkin, R. J., et al., Dynamic nuclear polarization at high magnetic fields. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 052211.
 126. Debelouchina, G. T.; Bayro, M. J.; Fitzpatrick, A. W.; Ladizhansky, V.; Colvin, M. T.; Caporini, M. A.; Jaroniec, C. P.; Bajaj, V. S.; Rosay, M.; MacPhee, C. E., et al., Higher order amyloid fibril structure by MAS NMR and DNP spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19237-19247.
 127. Tycko, R., Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR. *Q. Rev. Biophys.* **2006**, *39*, 1-55.
 128. Usov, I.; Adamcik, J.; Mezzenga, R., Polymorphism complexity and handedness inversion in serum albumin amyloid fibrils. *ACS Nano* **2013**, *7*, 10465-10474.
 129. Goldsbury, C.; Baxa, U.; Simon, M. N.; Steven, A. C.; Engel, A.; Wall, J. S.; Aebi, U.; Müller, S. A., Amyloid structure and assembly: insights from scanning transmission electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **2011**, *173*, 1-13.
 130. Jiménez, J. L.; Nettleton, E. J.; Bouchard, M.; Robinson, C. V.; Dobson, C. M.; Saibil, H. R., The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 9196-9201.

Chapitre 4

1. Bochicchio, B.; Tamburro Antonio, M., Polyproline II structure in proteins: Identification by chiroptical spectroscopies, stability, and functions. *Chirality* **2002**, *14*, 782-792.

2. Dukor, R. K.; Keiderling, T. A., Reassessment of the random coil conformation: vibrational CD study of proline oligopeptides and related polypeptides. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1747-1761.
3. Paterlini, M. G.; Freedman, T. B.; Nafie, L. A., Vibrational circular dichroism spectra of three conformationally distinct states and an unordered state of poly(L-lysine) in deuterated aqueous solution. *Biopolymers* **1986**, *25*, 1751-1765.
4. Smith, L. J.; Fiebig, K. M.; Schwalbe, H.; Dobson, C. M., The concept of a random coil: Residual structure in peptides and denatured proteins. *Folding and Design* **1996**, *1*, R95-R106.
5. Shi, Z.; Olson, C. A.; Rose, G. D.; Baldwin, R. L.; Kallenbach, N. R., Polyproline II structure in a sequence of seven alanine residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 9190.
6. Whittington, S. J.; Chellgren, B. W.; Hermann, V. M.; Creamer, T. P., Urea promotes polyproline II helix formation: Implications for protein denatured states. *Biochemistry* **2005**, *44*, 6269-6275.
7. Kentsis, A.; Mezei, M.; Gindin, T.; Osman, R., Unfolded state of polyalanine is a segmented polyproline II helix. *Proteins* **2004**, *55*, 493-501.
8. Kurouski, D.; Kar, K.; Wetzel, R.; Dukor, R. K.; Lednev, I. K.; Nafie, L. A., Levels of supramolecular chirality of polyglutamine aggregates revealed by vibrational circular dichroism. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1638-1643.
9. Barth, A., Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073-1101.
10. Moradi, M.; Babin, V.; Roland, C.; Sagui, C., A classical molecular dynamics investigation of the free energy and structure of short polyproline conformers. *J. Chem. Phys.* **2010**, *133*, 125104.
11. Martial, B.; Lefèvre, T.; Buffeteau, T.; Auger, M., Vibrational circular dichroism reveals supramolecular chirality inversion of α -synuclein peptide assemblies upon interactions with anionic membranes. *ACS Nano* **2019**, *13*, 3232-3242.
12. Dehsorkhi, A.; Castelletto, V.; Hamley, I. W., Self-assembling amphiphilic peptides. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 453-467.
13. Shtilerman, M. D.; Ding, T. T.; Lansbury, P. T., Molecular crowding accelerates fibrillization of α -synuclein: Could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry* **2002**, *41*, 3855-3860.
14. Aggeli, A.; Nyrkova, I. A.; Bell, M.; Harding, R.; Carrick, L.; McLeish, T. C. B.; Semenov, A. N.; Boden, N., Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide β -sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 11857.
15. Baujard-Lamotte, L.; Noinville, S.; Goubard, F.; Marque, P.; Pauthe, E., Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces. *Colloids Surf. B* **2008**, *63*, 129-137.
16. Buell, A. K.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J., The physical chemistry of the amyloid phenomenon: thermodynamics and kinetics of filamentous protein aggregation. *Essays Biochem.* **2014**, *56*, 11-39.
17. Ikenoue, T.; Lee, Y.-H.; Kardos, J.; Yagi, H.; Ikegami, T.; Naiki, H.; Goto, Y., Heat of supersaturation-limited amyloid burst directly monitored by isothermal titration calorimetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 6654-6659.
18. De Simone, A.; Esposito, L.; Pedone, C.; Vitagliano, L., Insights into stability and toxicity of amyloid-like oligomers by replica exchange molecular dynamics analyses. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 1965-1973.
19. Berhanu, W. M.; Hansmann, U. H. E. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Karabencheva-Christova, T., Ed.; Academic Press: 2014; Vol. 96, pp 113-141.

20. Paslawski, W.; Andreasen, M.; Nielsen, S. B.; Lorenzen, N.; Thomsen, K.; Kaspersen, J. D.; Pedersen, J. S.; Otzen, D. E., High stability and cooperative unfolding of α -synuclein oligomers. *Biochemistry* **2014**, *53*, 6252-6263.
21. Arora, A.; Ha, C.; Park, C. B., Insulin amyloid fibrillation at above 100°C: New insights into protein folding under extreme temperatures. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 2429-2436.
22. Amunson, K. E.; Kubelka, J., On the temperature dependence of amide I frequencies of peptides in solution. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 9993-9998.
23. Novo, M.; Freire, S.; Al-Soufi, W., Critical aggregation concentration for the formation of early Amyloid- β (1-42) oligomers. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1783.
24. Clark, A. H.; Judge, F. J.; Richards, J. B.; Stubbs, J. M.; Suggett, A., Electron microscopy of network structures in thermally-induced globular protein gels. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1981**, *17*, 380-392.
25. Casal, H. L.; Köhler, U.; Mantsch, H. H., Structural and conformational changes of β -lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Struc. Mol. Enzymol.* **1988**, *957*, 11-20.
26. Adamcik, J.; Mezzenga, R., Adjustable twisting periodic pitch of amyloid fibrils. *Soft Matter* **2011**, *7*, 5437-5443.
27. 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*, 8478-8490.
28. Sikkink, L. A.; Ramirez-Alvarado, M., Salts enhance both protein stability and amyloid formation of an immunoglobulin light chain. *Biophys. Chem.* **2008**, *135*, 25-31.
29. Zurdo, J.; Guijarro, J. I.; Jiménez, J. L.; Saibil, H. R.; Dobson, C. M., Dependence on solution conditions of aggregation and amyloid formation by an SH3 domain. *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 325-340.
30. Ullner, M.; Woodward, C. E.; Jönsson, B., A Debye-Hückel theory for electrostatic interactions in proteins. *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 2056-2065.
31. Baldwin, R. L., How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2056-2063.
32. Collins, K. D., Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods* **2004**, *34*, 300-311.
33. Park, S.-B.; Yoon, J.-S.; Jang, S.-M.; Lee, K.-H.; Shin, S.-M., Computational study on oligomer formation of fibril-forming peptide of α -synuclein. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, *33*, 848-854.
34. Yoon, J.; Jang, S.; Lee, K.; Shin, S., Dimerization of fibril-forming segments of α -synuclein. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2009**, *30*, 1845-1850.
35. Fauvet, B.; Mbefo, M. K.; Fares, M.-B.; Desobry, C.; Michael, S.; Ardah, M. T.; Tsika, E.; Coune, P.; Prudent, M.; Lion, N., et al., α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15345-15364.
36. Davidson, W. S.; Jonas, A.; Clayton, D. F.; George, J. M., Stabilization of α -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9443-9449.
37. Eliezer, D.; Kutluay, E.; Bussell Jr, R.; Browne, G., Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 1061-1073.
38. Deleersnijder, A.; Gerard, M.; Debyser, Z.; Baekelandt, V., The remarkable conformational plasticity of alpha-synuclein: blessing or curse? *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 368-377.
39. Celej, María S.; Sarroukh, R.; Goormaghtigh, E.; Fidelio, Gerardo D.; Ruyschaert, J.-M.; Raussens, V., Toxic prefibrillar α -synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel β -sheet structure. *Biochem. J.* **2012**, *443*, 719-726.

40. Klucken, J.; Outeiro, T. F.; Nguyen, P.; McLean, P. J.; Hyman, B. T., Detection of novel intracellular α -synuclein oligomeric species by fluorescence lifetime imaging. *FASEB J.* **2006**, *20*, 2050-2057.
41. Roberts, H. L.; Brown, D. R., Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α -synuclein. *Biomolecules* **2015**, *5*, 282-305.
42. Gallea, J. I.; Celej, M. S., Structural insights into amyloid oligomers of the Parkinson disease-related protein α -synuclein. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 26733-26742.

Chapitre 5

1. Iwai, A.; Masliah, E.; Yoshimoto, M.; Ge, N.; Flanagan, L.; Rohan de Silva, H. A.; Kittel, A.; Saitoh, T., The precursor protein of Non-A β Component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* **1995**, *14*, 467-475.
2. Spillantini, M. G.; Crowther, R. A.; Jakes, R.; Hasegawa, M.; Goedert, M., α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6469-6473.
3. Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M. Y.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M., α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **1997**, *388*, 839-840.
4. Chiti, F.; Dobson, C. M., Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: A summary of progress over the last decade. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 27-68.
5. Parkinson, J., An Essay on the Shaking Palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **2002**, *14*, 223-236.
6. Sarkar, S.; Raymick, J.; Imam, S., Neuroprotective and therapeutic strategies against Parkinson's disease: Recent perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 904.
7. Miller, D. B.; O'Callaghan, J. P., Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. *Metab., Clin. Exp.* **2015**, *64*, S40-S46.
8. Tycko, R., Amyloid polymorphism: Structural basis and neurobiological relevance. *Neuron* **2015**, *86*, 632-645.
9. Pujols, J.; Peña-Díaz, S.; Lázaro, D. F.; Peccati, F.; Pinheiro, F.; González, D.; Carija, A.; Navarro, S.; Conde-Giménez, M.; García, J., et al., Small molecule inhibits α -synuclein aggregation, disrupts amyloid fibrils, and prevents degeneration of dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, 10481-10486.
10. Fauvet, B.; Mbefo, M. K.; Fares, M.-B.; Desobry, C.; Michael, S.; Ardah, M. T.; Tsika, E.; Coune, P.; Prudent, M.; Lion, N., et al., α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15345-15364.
11. Theillet, F.-X.; Binolfi, A.; Bekei, B.; Martorana, A.; Rose, H. M.; Stuver, M.; Verzini, S.; Lorenz, D.; van Rossum, M.; Goldfarb, D., et al., Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature* **2016**, *530*, 45-50.
12. Weinreb, P. H.; Zhen, W.; Poon, A. W.; Conway, K. A.; Lansbury, P. T., NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13709-13715.
13. Davidson, W. S.; Jonas, A.; Clayton, D. F.; George, J. M., Stabilization of α -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9443-9449.
14. Eliezer, D.; Kutluay, E.; Bussell Jr, R.; Browne, G., Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 1061-1073.
15. Fusco, G.; De Simone, A.; Gopinath, T.; Vostrikov, V.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Veglia, G., Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3827.

16. Burré, J.; Sharma, M.; Südhof, T. C., Definition of a molecular pathway mediating α -synuclein neurotoxicity. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 5221-5232.
17. Zhu, M.; Fink, A. L., Lipid binding inhibits α -synuclein fibril formation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 16873-16877.
18. Abedini, A.; Raleigh, D. P., A role for helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded polypeptides? *Phys. Biol.* **2009**, *6*, 015005.
19. Comellas, G.; Lemkau, L. R.; Zhou, D. H.; George, J. M.; Rienstra, C. M., Structural Intermediates during α -Synuclein Fibrillogenesis on Phospholipid Vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5090-5099.
20. Ghosh, D.; Singh, P. K.; Sahay, S.; Jha, N. N.; Jacob, R. S.; Sen, S.; Kumar, A.; Riek, R.; Maji, S. K., Structure based aggregation studies reveal the presence of helix-rich intermediate during α -synuclein aggregation. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9228.
21. Tang, M.; Comellas, G.; Rienstra, C. M., Advanced solid-state NMR approaches for structure determination of membrane proteins and amyloid fibrils. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2080-2088.
22. Tuttle, M. D.; Comellas, G.; Nieuwkoop, A. J.; Covell, D. J.; Berthold, D. A.; Kloepper, K. D.; Courtney, J. M.; Kim, J. K.; Barclay, A. M.; Kendall, A., et al., Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 409-415.
23. Iyer, A.; Roeters, S. J.; Kogan, V.; Woutersen, S.; Claessens, M. M. A. E.; Subramaniam, V., C-Terminal truncated α -synuclein fibrils contain strongly twisted β -sheets. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15392-15400.
24. Kessler, J. C.; Rochet, J.-C.; Lansbury, P. T., The N-terminal repeat domain of α -synuclein inhibits β -sheet and amyloid fibril formation. *Biochemistry* **2003**, *42*, 672-678.
25. Uéda, K.; Fukushima, H.; Masliah, E.; Xia, Y.; Iwai, A.; Yoshimoto, M.; Otero, D. A.; Kondo, J.; Ihara, Y.; Saitoh, T., Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 11282-11286.
26. Culvenor, J. G.; McLean, C. A.; Cutt, S.; Campbell, B. C. V.; Maher, F.; Jäkälä, P.; Hartmann, T.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; Li, Q.-X., Non-A β component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) Revisited : NAC and α -synuclein are not associated with A β amyloid. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 1173-1181.
27. Giasson, B. I.; Murray, I. V. J.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y., A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α -synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2380-2386.
28. Periquet, M.; Fulga, T.; Myllykangas, L.; Schlossmacher, M. G.; Feany, M. B., Aggregated α -synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity *in vivo*. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 3338-3346.
29. Brown, J. W. P.; Buell, A. K.; Michaels, T. C. T.; Meisl, G.; Carozza, J.; Flagmeier, P.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M.; Galvagnion, C., β -Synuclein suppresses both the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation *via* competitive binding to surfaces. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36010.
30. Bédard, L.; Lefèvre, T.; Morin-Michaud, É.; Auger, M., Besides fibrillization: Putative role of the peptide fragment 71–82 on the structural and assembly behavior of α -synuclein. *Biochemistry* **2014**, *53*, 6463-6472.
31. Martial, B.; Lefèvre, T.; Auger, M., Understanding amyloid fibril formation using protein fragments: Structural investigations *via* vibrational spectroscopy and solid-state NMR. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 1133-1149.
32. Gazit, E., Mechanisms of amyloid fibril self-assembly and inhibition. *FEBS J.* **2005**, *272*, 5971-5978.
33. Gazit, E., Self assembly of short aromatic peptides into amyloid fibrils and related nanostructures. *Prion* **2007**, *1*, 32-35.

34. López de la Paz, M.; Serrano, L., Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 87-92.
35. Andreasen, M.; Lorenzen, N.; Otzen, D., Interactions between misfolded protein oligomers and membranes: A central topic in neurodegenerative diseases? *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2015**, *1848*, 1897-1907.
36. Galvagnion, C.; Buell, A. K.; Meisl, G.; Michaels, T. C. T.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M., Lipid vesicles trigger α -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 229-234.
37. Perni, M.; Galvagnion, C.; Maltsev, A.; Meisl, G.; Müller, M. B. D.; Challa, P. K.; Kirkegaard, J. B.; Flagmeier, P.; Cohen, S. I. A.; Cascella, R., et al., A natural product inhibits the initiation of α -synuclein aggregation and suppresses its toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, E1009-E1017.
38. Shtilerman, M. D.; Ding, T. T.; Lansbury, P. T., Molecular crowding accelerates fibrillization of α -synuclein: Could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry* **2002**, *41*, 3855-3860.
39. Kocourková, L.; Novotná, P.; Čujová, S.; Čerovský, V.; Urbanová, M.; Setnička, V., Conformational study of melectin and antapin antimicrobial peptides in model membrane environments. *Spectrochim. Acta, Part A* **2017**, *170*, 247-255.
40. Novotná, P.; Goncharova, I.; Urbanová, M., Mutual structural effect of bilirubin and model membranes by vibrational circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2014**, *1838*, 831-841.
41. Novotná, P.; Urbanová, M., Vibrational circular dichroism study of polypeptide model-membrane systems. *Anal. Biochem.* **2012**, *427*, 211-218.
42. Ma, S.; Cao, X.; Mak, M.; Sadik, A.; Walkner, C.; Freedman, T. B.; Lednev, I. K.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A., Vibrational Circular Dichroism Shows Unusual Sensitivity to Protein Fibril Formation and Development in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12364-12365.
43. Rath, A.; Davidson, A. R.; Deber, C. M., The structure of "unstructured" regions in peptides and proteins: Role of the polyproline ii helix in protein folding and recognition*. *Biopolymers* **2005**, *80*, 179-185.
44. Woolfson, D. N.; Bartlett, G. J.; Bruning, M.; Thomson, A. R., New currency for old rope: From coiled-coil assemblies to α -helical barrels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 432-441.
45. Ferreón, J. C.; Hilser, V. J., The effect of the polyproline II (PPII) conformation on the denatured state entropy. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 447-457.
46. Dukor, R. K.; Keiderling, T. A., Reassessment of the random coil conformation: vibrational CD study of proline oligopeptides and related polypeptides. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1747-1761.
47. Paterlini, M. G.; Freedman, T. B.; Nafie, L. A., Vibrational circular dichroism spectra of three conformationally distinct states and an unordered state of poly(L-lysine) in deuterated aqueous solution. *Biopolymers* **1986**, *25*, 1751-1765.
48. Barth, A., Infrared Spectroscopy of Proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073-1101.
49. Roeters, S. J.; Iyer, A.; Pletikapić, G.; Kogan, V.; Subramaniam, V.; Woutersen, S., Evidence for intramolecular antiparallel beta-sheet structure in alpha-synuclein fibrils from a combination of two-dimensional infrared spectroscopy and atomic force microscopy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41051.
50. Bouchard, M.; Zurdo, J.; Nettleton, E. J.; Dobson, C. M.; Robinson, C. V., Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1960-1967.
51. Kurouski, D.; Lu, X.; Popova, L.; Wan, W.; Shanmugasundaram, M.; Stubbs, G.; Dukor, R. K.; Lednev, I. K.; Nafie, L. A., Is supramolecular filament chirality the underlying cause of major morphology differences in amyloid fibrils? *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2302-2312.

52. Labbé, J.-F.; Lefèvre, T.; Guay-Bégin, A.-A.; Auger, M., Structure and membrane interactions of the β -amyloid fragment 25-35 as viewed using spectroscopic approaches. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 7228-7239.
53. Shanmugam, G.; Polavarapu, P. L., Site-specific structure of A β (25–35) peptide: Isotope-assisted vibrational circular dichroism study. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteom.* **2013**, *1834*, 308-316.
54. Surmacz-Chwedoruk, W.; Babenko, V.; Dec, R.; Szymczak, P.; Dzwolak, W., The emergence of superstructural order in insulin amyloid fibrils upon multiple rounds of self-seeding. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32022.
55. Galvagnion, C., The role of lipids interacting with alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Parkinson's Dis.* **2017**, *7*, 433-450.
56. Sinha, S.; Lopes, D. H. J.; Bitan, G., A key role for lysine residues in amyloid β -protein folding, assembly, and toxicity. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 473-481.
57. Measey, T. J.; Schweitzer-Stenner, R., Vibrational circular dichroism as a probe of fibrillogenesis: The origin of the anomalous intensity enhancement of amyloid-like fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1066-1076.
58. Welch, W. R. W.; Kubelka, J.; Keiderling, T. A., Infrared, vibrational circular dichroism, and Raman spectral simulations for β -sheet structures with various isotopic labels, interstrand, and stacking arrangements using density functional theory. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 10343-10358.
59. Shanmugasundaram, M.; Kurouski, D.; Wan, W.; Stubbs, G.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A.; Lednev, I. K., Rapid filament supramolecular chirality reversal of HET-s (218–289) prion fibrils driven by pH elevation. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 8521-8525.
60. Hoyer, W.; Antony, T.; Cherny, D.; Heim, G.; Jovin, T. M.; Subramaniam, V., Dependence of α -synuclein aggregate morphology on solution conditions. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 383-393.
61. Vilar, M.; Chou, H.-T.; Lührs, T.; Maji, S. K.; Riek-Loher, D.; Verel, R.; Manning, G.; Stahlberg, H.; Riek, R., The fold of α -synuclein fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 8637-8642.
62. Bousset, L.; Pieri, L.; Ruiz-Arlandis, G.; Gath, J.; Jensen, P. H.; Habenstein, B.; Madiona, K.; Olieric, V.; Böckmann, A.; Meier, B. H., et al., Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2575.
63. Fändrich, M.; Meinhardt, J.; Grigorieff, N., Structural polymorphism of Alzheimer A β and other amyloid fibrils. *Prion* **2009**, *3*, 89-93.
64. Petkova, A. T.; Leapman, R. D.; Guo, Z.; Yau, W.-M.; Mattson, M. P.; Tycko, R., Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Science* **2005**, *307*, 262-265.
65. Antzutkin Oleg, N., Amyloidosis of Alzheimer's A β peptides: solid-state nuclear magnetic resonance, electron paramagnetic resonance, transmission electron microscopy, scanning transmission electron microscopy and atomic force microscopy studies. *Magn. Reson. Chem.* **2004**, *42*, 231-246.
66. Aparicio, F.; Nieto-Ortega, B.; Nájera, F.; Ramírez Francisco, J.; López Navarrete Juan, T.; Casado, J.; Sánchez, L., Inversion of supramolecular helicity in oligo-*p*-phenylene-based supramolecular polymers: Influence of molecular atropisomerism. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *53*, 1373-1377.
67. Volpatti, L. R.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J., A clear view of polymorphism, twist, and chirality in amyloid fibril formation. *ACS Nano* **2013**, *7*, 10443-10448.
68. Kurouski, D. In *Exploring New Findings on Amyloidosis*; Fernandez-Escamilla, A. M., Ed.; IntechOpen: 2016; pp 73-98.

69. Knowles, T. P. J.; Waudby, C. A.; Devlin, G. L.; Cohen, S. I. A.; Aguzzi, A.; Vendruscolo, M.; Terentjev, E. M.; Welland, M. E.; Dobson, C. M., An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science* **2009**, *326*, 1533-1537.
70. Jansen, R.; Dzwolak, W.; Winter, R., Amyloidogenic self-assembly of insulin aggregates probed by high resolution atomic force microscopy. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 1344-1353.
71. Kurouski, D.; Dukor, R. K.; Lu, X.; Nafie, L. A.; Lednev, I. K., Spontaneous inter-conversion of insulin fibril chirality. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2837-2839.
72. Wischik, C. M.; Crowther, R. A.; Stewart, M.; Roth, M., Subunit structure of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 1905-1912.
73. Usov, I.; Adamcik, J.; Mezzenga, R., Polymorphism complexity and handedness inversion in serum albumin amyloid fibrils. *ACS Nano* **2013**, *7*, 10465-10474.
74. Dzwolak, W.; Lokszejn, A.; Galinska-Rakoczy, A.; Adachi, R.; Goto, Y.; Rupnicki, L., Conformational indeterminism in protein misfolding: Chiral amplification on amyloidogenic pathway of insulin. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7517-7522.
75. Buffeteau, T.; Laguné-Labarthet, F.; Sourisseau, C., Vibrational circular dichroism in general anisotropic thin solid films: Measurement and theoretical approach. *Appl. Spectrosc.* **2005**, *59*, 732-745.

Chapitre 6

1. Spillantini, M. G.; Crowther, R. A.; Jakes, R.; Hasegawa, M.; Goedert, M., α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6469-6473.
2. Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M., α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **1997**, *388*, 839-840.
3. Bendor, J. T.; Logan, T. P.; Edwards, R. H., The function of α -synuclein. *Neuron* **2013**, *79*, 1044-1066.
4. Eliezer, D.; Kutluay, E.; Bussell Jr, R.; Browne, G., Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 1061-1073.
5. Fusco, G.; De Simone, A.; Gopinath, T.; Vostrikov, V.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Veglia, G., Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3827.
6. Vamvaca, K.; Volles, M. J.; Lansbury, P. T., The first N-terminal amino acids of α -synuclein are essential for α -helical structure formation *in vitro* and membrane binding in yeast. *J. Mol. Biol.* **2009**, *389*, 413-424.
7. Iyer, A.; Roeters, S. J.; Kogan, V.; Woutersen, S.; Claessens, M. M. A. E.; Subramaniam, V., C-Terminal truncated α -synuclein fibrils contain strongly twisted β -sheets. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15392-15400.
8. Giasson, B. I.; Murray, I. V. J.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y., A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α -synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2380-2386.
9. Brown, J. W. P.; Buell, A. K.; Michaels, T. C. T.; Meisl, G.; Carozza, J.; Flagmeier, P.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M.; Galvagnion, C., β -Synuclein suppresses both the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation *via* competitive binding to surfaces. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36010.
10. Roberts, H. L.; Brown, D. R., Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α -synuclein. *Biomolecules* **2015**, *5*, 282-305.
11. Tang, M.; Comellas, G.; Rienstra, C. M., Advanced solid-state NMR approaches for structure determination of membrane proteins and amyloid fibrils. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2080-2088.

12. Martial, B.; Lefèvre, T.; Auger, M., Understanding amyloid fibril formation using protein fragments: Structural investigations *via* vibrational spectroscopy and solid-state NMR. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 1133-1149.
13. Bédard, L.; Lefèvre, T.; Morin-Michaud, É.; Auger, M., Besides fibrillization: Putative role of the peptide fragment 71–82 on the structural and assembly behavior of α -synuclein. *Biochemistry* **2014**, *53*, 6463-6472.
14. Martial, B.; Lefèvre, T.; Buffeteau, T.; Auger, M., Vibrational circular dichroism reveals supramolecular chirality inversion of α -synuclein peptide assemblies upon interactions with anionic membranes. *ACS Nano* **2019**, *13*, 3232-3242.
15. Ten Kortenaar, P. B. W.; Van Dijk, B. G.; Peeters, J. M.; Raaben, B. J.; Adams, P. J. H. M.; Tesser, G. I., Rapid and efficient method for the preparation of Fmoc-amino acids starting from 9-fluorenylmethanol. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27*, 398-400.
16. Takamori, S.; Holt, M.; Stenius, K.; Lemke, E. A.; Grønborg, M.; Riedel, D.; Urlaub, H.; Schenck, S.; Brügger, B.; Ringler, P., et al., Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **2006**, *127*, 831-846.
17. Kimura, Y.; Nagai, Y., Infrared spectra of brain phosphatidylserine. *Biochem. J.* **1960**, *77*, 3-4.
18. Mills, F. D.; Antharam, V. C.; Ganesh, O. K.; Elliott, D. W.; McNeill, S. A.; Long, J. R., The helical structure of surfactant peptide KL4 when bound to POPC: POPG lipid vesicles. *Biochemistry* **2008**, *47*, 8292-8300.
19. Bak, M.; Rasmussen, J. T.; Nielsen, N. C., SIMPSON: A general simulation program for solid-state NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 296-330.
20. Caporini, M. A.; Bajaj, V. S.; Veshtort, M.; Fitzpatrick, A.; MacPhee, C. E.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G., Accurate determination of interstrand distances and alignment in amyloid fibrils by magic angle spinning NMR. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 13555-13561.
21. Liang, C.; Ni, R.; Smith, J. E.; Childers, W. S.; Mehta, A. K.; Lynn, D. G., Kinetic intermediates in amyloid assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15146-15149.
22. Gregory, D. M.; Benzinger, T. L. S.; Burkoth, T. S.; Miller-Auer, H.; Lynn, D. G.; Meredith, S. C.; Botto, R. E., Dipolar recoupling NMR of biomolecular self-assemblies: determining inter- and intrastrand distances in fibrilized Alzheimer's β -amyloid peptide. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **1998**, *13*, 149-166.
23. Karlsson, T.; Popham, J. M.; Long, J. R.; Oyler, N.; Drobny, G. P., A study of homonuclear dipolar recoupling pulse sequences in solid-state nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7394-7407.
24. Warschawski, D. E.; Arnold, A. A.; Marcotte, I., A new method of assessing lipid mixtures by ^{31}P magic-angle spinning NMR. *Biophys. J.* **2018**, *114*, 1368-1376.
25. Barth, A., Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073-1101.
26. Kurouski, D.; Kar, K.; Wetzel, R.; Dukor, R. K.; Lednev, I. K.; Nafie, L. A., Levels of supramolecular chirality of polyglutamine aggregates revealed by vibrational circular dichroism. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1638-1643.
27. Labbé, J.-F.; Lefèvre, T.; Guay-Bégin, A.-A.; Auger, M., Structure and membrane interactions of the β -amyloid fragment 25-35 as viewed using spectroscopic approaches. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 7228-7239.
28. Ashburn, T. T.; Auger, M.; Lansbury, P. T., The structural basis of pancreatic amyloid formation: isotope-edited spectroscopy in the solid state. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 790-791.
29. Moran, S. D.; Zanni, M. T., How to get insight into amyloid structure and formation from infrared spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1984-1993.

30. Welch, W. R. W.; Kubelka, J.; Keiderling, T. A., Infrared, vibrational circular dichroism, and Raman spectral simulations for β -sheet structures with various isotopic labels, interstrand, and stacking arrangements using density functional theory. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 10343-10358.
31. Welch, W. R. W.; Keiderling, T. A.; Kubelka, J., Structural analyses of experimental ^{13}C edited amide I' IR and VCD for peptide β -sheet aggregates and fibrils using DFT-based spectral simulations. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 10359-10369.
32. Decatur, S. M., Elucidation of residue-level structure and dynamics of polypeptides via isotope-edited infrared spectroscopy. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 169-175.
33. Tycko, R., Amyloid polymorphism: Structural basis and neurobiological relevance. *Neuron* **2015**, *86*, 632-645.
34. Benzinger, T. L. S.; Gregory, D. M.; Burkoth, T. S.; Miller-Auer, H.; Lynn, D. G.; Botto, R. E.; Meredith, S. C., Propagating structure of Alzheimer's β -amyloid(10-35) is parallel β -sheet with residues in exact register. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 13407-13412.
35. Debelouchina, G. T.; Bayro, M. J.; Fitzpatrick, A. W.; Ladizhansky, V.; Colvin, M. T.; Caporini, M. A.; Jaroniec, C. P.; Bajaj, V. S.; Rosay, M.; MacPhee, C. E., et al., Higher order amyloid fibril structure by MAS NMR and DNP spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19237-19247.
36. Gregory, D. M.; Mehta, M. A.; Shiels, J. C.; Drobny, G. P., Determination of local structure in solid nucleic acids using double quantum nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 28-42.
37. Mehta, M. A.; Eddy, M. T.; McNeill, S. A.; Mills, F. D.; Long, J. R., Determination of peptide backbone torsion angles using double-quantum dipolar recoupling solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2202-2212.
38. Long, J. R.; Mills, F. D.; Raucci, F., A high resolution structure of the putative hinge region in M2 channel-lining segments of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2007**, *1768*, 2961-2970.
39. Fitzpatrick, A. W. P.; Debelouchina, G. T.; Bayro, M. J.; Clare, D. K.; Caporini, M. A.; Bajaj, V. S.; Jaroniec, C. P.; Wang, L.; Ladizhansky, V.; Müller, S. A., et al., Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 5468-5473.
40. Tuttle, M. D.; Comellas, G.; Nieuwkoop, A. J.; Covell, D. J.; Berthold, D. A.; Kloepper, K. D.; Courtney, J. M.; Kim, J. K.; Barclay, A. M.; Kendall, A., et al., Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 409-415.
41. Vilar, M.; Chou, H.-T.; Lührs, T.; Maji, S. K.; Riek-Loher, D.; Verel, R.; Manning, G.; Stahlberg, H.; Riek, R., The fold of α -synuclein fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 8637-8642.
42. Nabet, A.; Auger, M.; Pézolet, M., Investigation of the temperature behavior of the bands due to the methylene stretching vibrations of phospholipid acyl chains by two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 948-955.
43. Kodati, V. R.; El-Jastimi, R.; Lafleur, M., Contribution of the intermolecular coupling and librotorsional mobility in the methylene stretching modes in the infrared spectra of acyl chains. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 12191-12197.
44. Kodati, V. R.; Lafleur, M., Comparison between orientational and conformational orders in fluid lipid bilayers. *Biophys. J.* **1993**, *64*, 163-170.
45. Umemura, J.; Cameron, D. G.; Mantsch, H. H., A Fourier transform infrared spectroscopic study of the molecular interaction of cholesterol with 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1980**, *602*, 32-44.

46. Asher, I. M.; Levin, I. W., Effects of temperature and molecular interactions on the vibrational infrared spectra of phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1977**, *468*, 63-72.
47. Mantsch, H. H.; McElhaney, R. N., Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 213-226.
48. Lewis, R. N.; McElhaney, R. N.; Pohle, W.; Mantsch, H. H., Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 2367-2375.
49. Casal, H. L.; Mantsch, H. H., Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* **1984**, *779*, 381-401.
50. Janiak, M. J.; Small, D. M.; Shipley, G. G., Nature of the thermal pretransition of synthetic phospholipids: dimyristoyl- and dipalmitoyllecithin. *Biochemistry* **1976**, *15*, 4575-4580.
51. Heimburg, T., A model for the lipid pretransition: Coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1154-1165.
52. Smith, I. C. P.; Ekiel, I. H. In *Phosphorous-31 NMR*; Gorenstein, D. G., Ed.; Academic Press: San Diego, 1984; pp 447-475.
53. Chan, J. C. C.; Tycko, R., Recoupling of chemical shift anisotropies in solid-state NMR under high-speed magic-angle spinning and in uniformly ¹³C-labeled systems. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 8378-8389.
54. Yan, X.; Noel, F.; Marcotte, I.; DeWolf, C. E.; Warschawski, D. E.; Boisselier, E., AHNAK C-Terminal peptide membrane binding-interactions between the residues 5654-5673 of AHNAK and phospholipid monolayers and bilayers. *Langmuir* **2020**, *36*, 362-369.
55. Joanne, P.; Galanth, C.; Goasdoué, N.; Nicolas, P.; Sagan, S.; Lavielle, S.; Chassaing, G.; El Amri, C.; Alves, I. D., Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, *1788*, 1772-1781.
56. Epand, R. F.; Schmitt, M. A.; Gellman, S. H.; Epand, R. M., Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two α/β -antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2006**, *1758*, 1343-1350.
57. Amunson, K. E.; Kubelka, J., On the temperature dependence of amide I frequencies of peptides in solution. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 9993-9998.
58. Van Dijck, P. W. M.; Kaper, A. J.; Oonk, H. A. J.; De Gier, J., Miscibility properties of binary phosphatidylcholine mixtures. A calorimetric study. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1977**, *470*, 58-69.
59. Sneideris, T.; Darguzis, D.; Botyriute, A.; Grigaliunas, M.; Winter, R.; Smirnovas, V., pH-Driven polymorphism of insulin amyloid-like fibrils. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0136602.
60. Buchanan, L. E.; Carr, J. K.; Fluitt, A. M.; Hoganson, A. J.; Moran, S. D.; de Pablo, J. J.; Skinner, J. L.; Zanni, M. T., Structural motif of polyglutamine amyloid fibrils discerned with mixed-isotope infrared spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 5796-5801.
61. Buchete, N.-V.; Hummer, G., Structure and dynamics of parallel β -sheets, hydrophobic core, and loops in Alzheimer's A β fibrils. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 3032-3039.
62. Lerch-Bader, M.; Lundin, C.; Kim, H.; Nilsson, I.; von Heijne, G., Contribution of positively charged flanking residues to the insertion of transmembrane helices into the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 4127-4132.
63. Rousseau, F.; Serrano, L.; Schymkowitz, J. W. H., How evolutionary pressure against protein aggregation shaped chaperone specificity. *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 1037-1047.
64. Viennet, T.; Wördehoff, M. M.; Uluca, B.; Poojari, C.; Shaykhalishahi, H.; Willbold, D.; Strodel, B.; Heise, H.; Buell, A. K.; Hoyer, W., et al., Structural insights from lipid-bilayer nanodiscs link α -Synuclein membrane-binding modes to amyloid fibril formation. *Commun. Biol.* **2018**, *1*, 44.

65. Hertel, C.; Terzi, E.; Hauser, N.; Jakob-Rotne, R.; Seelig, J.; Kemp, J. A., Inhibition of the electrostatic interaction between beta-amyloid peptide and membranes prevents beta-amyloid-induced toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 9412-9416.
66. Grey, M.; Linse, S.; Nilsson, H.; Brundin, P.; Sparr, E., Membrane interaction of alpha-synuclein in different aggregation states. *J. Parkinson's Dis.* **2011**, *1*, 359-371.
67. Pfefferkorn, C. M.; Jiang, Z.; Lee, J. C., Biophysics of alpha-synuclein membrane interactions. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2012**, *1818*, 162-171.
68. Auluck, P. K.; Caraveo, G.; Lindquist, S., α -Synuclein: Membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 211-233.
69. Iyer, A.; Claessens, M., Disruptive membrane interactions of alpha-synuclein aggregates. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteom.* **2019**, *1867*, 468-482.
70. O'Leary, E. I.; Lee, J. C., Interplay between α -synuclein amyloid formation and membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteom.* **2019**, *1867*, 483-491.
71. Stöckl, M.; Fischer, P.; Wanker, E.; Herrmann, A., α -Synuclein selectively binds to anionic phospholipids embedded in liquid-disordered domains. *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 1394-1404.
72. Galvagnion, C., The role of lipids interacting with alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Parkinson's Dis.* **2017**, *7*, 433-450.
73. Shanmugasundaram, M.; Kurouski, D.; Wan, W.; Stubbs, G.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A.; Lednev, I. K., Rapid filament supramolecular chirality reversal of HET-s (218–289) prion fibrils driven by pH elevation. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 8521-8525.
74. Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., Design of an N-methylated peptide inhibitor of α -synuclein aggregation guided by solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7873-7881.
75. Ryan, P.; Xu, M.-m.; Davey, A. K.; Kassiou, M.; Mellick, G. D.; Rudrawar, S., O-GlcNAcylation of truncated NAC segment alters peptide-dependent effects on α -synuclein aggregation. *Bioorg. Chem.* **2019**, *94*, 103389.
76. Levine, P. M.; Galesic, A.; Balana, A. T.; Mahul-Mellier, A.-L.; Navarro, M. X.; De Leon, C. A.; Lashuel, H. A.; Pratt, M. R., α -Synuclein O-GlcNAcylation alters aggregation and toxicity, revealing certain residues as potential inhibitors of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 1511-1519.

Conclusion

1. Gullion, T.; Schaefer, J., Rotational-echo double-resonance NMR. *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 196-200.
2. Jaroniec, C. P.; Filip, C.; Griffin, R. G., 3D TEDOR NMR experiments for the simultaneous measurement of multiple carbon–nitrogen distances in uniformly ^{13}C , ^{15}N -labeled solids. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10728-10742.
3. Jaroniec, C. P.; MacPhee, C. E.; Bajaj, V. S.; McMahan, M. T.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G., High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 711-716.
4. Debelouchina, G. T.; Bayro, M. J.; Fitzpatrick, A. W.; Ladizhansky, V.; Colvin, M. T.; Caporini, M. A.; Jaroniec, C. P.; Bajaj, V. S.; Rosay, M.; MacPhee, C. E., et al., Higher order amyloid fibril structure by MAS NMR and DNP spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19237-19247.
5. Nafie, L. A., Theory of resonance Raman optical activity: the single electronic state limit. *Chem. Phys.* **1996**, *205*, 309-322.
6. Vargek, M.; Freedman, T. B.; Lee, E.; Nafie, L. A., Experimental observation of resonance Raman optical activity. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *287*, 359-364.
7. Willander, M.; Al-Hilli, S. In *Micro and Nano Technologies in Bioanalysis*; Foote, R. S.; Lee, J. W., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2009; Vol. 544, pp 201-229.

8. Smith, D. P.; Tew, D. J.; Hill, A. F.; Bottomley, S. P.; Masters, C. L.; Barnham, K. J.; Cappai, R., Formation of a high affinity lipid-binding intermediate during the early aggregation phase of α -synuclein. *Biochemistry* **2008**, *47*, 1425-1434.
9. Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A., Design of an N-methylated peptide inhibitor of α -synuclein aggregation guided by solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7873-7881.
10. Levine, P. M.; Galesic, A.; Balana, A. T.; Mahul-Mellier, A.-L.; Navarro, M. X.; De Leon, C. A.; Lashuel, H. A.; Pratt, M. R., α -Synuclein O-GlcNAcylation alters aggregation and toxicity, revealing certain residues as potential inhibitors of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 1511-1519.
11. Ryan, P.; Xu, M.-m.; Davey, A. K.; Kassiou, M.; Mellick, G. D.; Rudrawar, S., O-GlcNAcylation of truncated NAC segment alters peptide-dependent effects on α -synuclein aggregation. *Bioorg. Chem.* **2019**, *94*, 103389.

Annexe A : Fichiers SIMPSON DQF-DRAWS

Fichier de simulation DQF-DRAWS_sim.in

```
spinsys {
    channels 13C
    nuclei 13C 13C 13C
    dipole 1 2 -90 0 34 111
    dipole 1 3 -90 0 34 111
    dipole 2 3 -90 0 34 111
}
#=====
# Valeurs de tenseurs de CSA pris de Journal of Magnetic Resonance 164 (2003) 270–285
#=====

par {
    # =====
    # Description des paramètres de cette section
    #
    # spin_rate      : Vitesse de rotation (en Hz) de l'échantillon à l'angle magique
    # sw             : Largeur spectrale (en Hz) du spectre à simuler
    # Ce paramètre est requis, mais la simulation ne calcule pas le spectre en entier,
    # seulement le premier point du FID. On utilise ici la propriété que l'intensité du
    # premier point est proportionnelle à l'aire totale du spectre
    # np              : Nombre de FID - incréments - à simuler
    # crystal_file   : Ensemble d'orientations cristallines dans la poudre à considérer
    # gamma_angles  : Nombre de recalcul de l'opérateur pendant une période de rotor
    # (doit être élevé)
    # start_operator : état des spins au début de la simulation : lnx indique que tous
    # les spins sont sur l'axe X (donc après le CP)
    # detect_operator : l1p*l2p*l3p+l1m*l2m*l3m simule tous les spins en quadrature
    # verbose       : SIMPSON affiche des messages au cours de la simulation
    # =====
    spin_rate 5882
    sw spin_rate
    np 11
    crystal_file zcw232
    gamma_angles 16
    start_operator lnx
    detect_operator l1p*l2p*l3p+l1m*l2m*l3m
    variable T2 0.01
    dipole_check false
}

proc pulseseq {} {
    #=====
    # DQF-DRAWS recoupling pulse sequence
    #=====
    global par
    maxdt 1.0
    #=====
    # Pulses synchronisés avec la vitesse de rotation
    #=====
    set rf [expr 8.5*$par(spin_rate)]
    set t360 [expr 1e6/$rf]
    set t90 [expr $t360/4]
```

```

#=====
# Supercycle DQF-DRAWS
# Enregistre l'intensité des spins immédiatement après le CP
#=====
reset
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t360 $rf -y
    pulse $t90 $rf x
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t360 $rf -y
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t90 $rf x
    pulse $t360 $rf -y
    pulse $t360 $rf y

store 1

reset
    pulse $t360 $rf -y
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t90 $rf -x
    pulse $t360 $rf -y
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t360 $rf -y
    pulse $t90 $rf -x
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t360 $rf -y

store 2

reset
    prop 1
    prop 2
    prop 2
    prop 1
    prop 1
    prop 2
    prop 2
    prop 1

store 4

reset
    pulse $t90 $rf y
    pulse $t90 $rf y

store 3
#=====
# La simulation commence ici
#=====
for {set i 1} {$i < [expr $par(np)+1]} {incr i} {
    reset
    for {set j 1} {$j < [expr $i+1]} {incr j} {
        prop 4
    }
    pulseid $t90 $rf y
    pulseid $t90 $rf -y
}

```

```

for {set k 1} {$k < [expr $i+1]} {incr k} {
    prop 4
}
acq
}
}

proc main {} {
    global par spinsys
    set f [fsimpson]
    set inc [expr 16.0/$par(spin_rate)]
    for {set i 1} {$i < [expr $par(np)+1]} {incr i} {
        set val [findex $f $i -re]
        set vali [findex $f $i -im]
        set valexp [expr exp(-$inc*$i/$par(T2))]
        fsetindex $f $i [expr $val*$valexp] [expr $vali*$valexp]
    }
}

#=====
# Normalise à 1
#=====

    set max -1000.0
    for {set i 0} {$i < $par(np)} {incr i} {
        if {[findex $f [expr $i+1] -re] > $max} { set max [findex $f [expr $i+1] -re] }
    }
    set fp [open $par(name)_dev70_facteur1000T2supprime.csv "w" ]
    puts $fp "Simulation Parameters"
    puts $fp "=====;"
    puts $fp "Spinsys section:"
    foreach item [array names spinsys] {
        puts $fp "$item; $spinsys($item)"
    }
    puts $fp "=====;"
    puts $fp "Par section:"
    foreach item [array names par] {
        puts $fp "$item; $par($item)"
    }
    set str "Normalisation factor; [expr 1/$max]"
    puts $fp [regsub -all {\.} $str ","]
    puts $fp "=====;"
    puts $fp "Simulated data"
    set str "delay(ms);intensity"
    set str [regsub -all {\.} $str ","]
    puts $fp $str

    for {set i 0} {$i < $par(np)} {incr i} {
        set ch "[expr ($i+1)*8000.0/$par(spin_rate)]; [expr [findex $f [expr $i+1] -re] / $max]"
        set ch [regsub -all {\.} $ch ","]
        puts $fp $ch
    }
    close $fp
    funload $f
}

```

Fichier d'optimisation DQF-DRAWS_opt.in

```
spinsys {
  channels 13C
  nuclei 13C 13C 13C
  dipole 1 2 -90 0 34 111
  dipole 1 3 -90 0 34 111
  dipole 2 3 -90 0 34 111
}
#=====
# Valeurs de tenseurs de CSA pris de Journal of Magnetic Resonance 164 (2003) 270–285
#=====

par {
  # =====
  # Description des paramètres de cette section
  #
  # spin_rate      : Vitesse de rotation (en Hz) de l'échantillon à l'angle magique
  # sw            : Largeur spectrale (en Hz) du spectre à simuler
  # Ce paramètre est requis, mais la simulation ne calcule pas le spectre en entier,
  # seulement le premier point du FID. On utilise ici la propriété que le l'intensité du
  # premier point est proportionnelle à l'aire totale du spectre
  # np            : Nombre de FID - incréments - à simuler
  # crystal_file  : Ensemble d'orientations cristallines dans la poudre à considérer
  # gamma_angles : Nombre de recalcul de l'opérateur pendant une période de rotor
  # (doit être élevé)
  # start_operator : état des spins au début de la simulation : lnx indique que tous
  # les spins sont sur l'axe X (donc après le CP)
  # detect_operator : l1p*l2p*l3p+l1m*l2m*l3m simule tous les spins en quadrature
  # verbose      : SIMPSON affiche des messages au cours de la simulation
  # =====
  spin_rate 5882
  sw spin_rate
  np 11
  crystal_file zcw232
  gamma_angles 16
  start_operator lnx
  detect_operator l1p*l2p*l3p+l1m*l2m*l3m
  variable T2 0.01
  dipole_check false
}

proc pulseseq {} {
#=====
# DQF-DRAWS recoupling pulse sequence
#=====
  global par
  maxdt 1.0
#=====
# Pulses synchronisés avec la vitesse de rotation
#=====
  set rf [expr 8.5*$par(spin_rate)]
  set t360 [expr 1e6/$rf]
  set t90 [expr $t360/4]
```

```

#=====
# Supercycle DQF-DRAWS
# Enregistre l'intensité des spins immédiatement après le CP
#=====
reset
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t360 $rf -y
    pulse $t90 $rf x
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t360 $rf -y
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t90 $rf x
    pulse $t360 $rf -y
    pulse $t360 $rf y

store 1

reset
    pulse $t360 $rf -y
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t90 $rf -x
    pulse $t360 $rf -y
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t360 $rf -y
    pulse $t90 $rf -x
    pulse $t360 $rf y
    pulse $t360 $rf -y

store 2

reset
    prop 1
    prop 2
    prop 2
    prop 1
    prop 1
    prop 2
    prop 2
    prop 1

store 4

reset
    pulse $t90 $rf y
    pulse $t90 $rf y

store 3
#=====
# La simulation commence ici
#=====
for {set i 1} {$i < [expr $par(np)+1]} {incr i} {
    reset
    for {set j 1} {$j < [expr $i+1]} {incr j} {
        prop 4
    }
    pulseid $t90 $rf y
    pulseid $t90 $rf -y
}

```



```

set dist12 [dip2dist 13C 13C -$opt::dipole12]
  puts [format "Dipole_1_2: %3.0f Hz == Distance of %3.1f A " $opt::dipole12 $dist12]
  puts [format "Dipole_1_3: %3.0f Hz == Distance of %3.1f A " $opt::dipole12 $dist12]
  puts [format "Dipole_2_3: %3.0f Hz == Distance of %3.1f A " $opt::dipole12 $dist12]
  puts [format "T2: %6.1f ms" [expr 1000/$opt::T2]]
#=====
# Save FID file
#=====
  fsave $f $par(name).fid
#=====
# Save a CSV file
#=====
  set fp [open $par(name).csv "w" ]
  puts $fp "Simulation Parameters"
  puts $fp "=====;=====
  puts $fp "Spinsys section:"
  foreach item [array names spinsys] {
    puts $fp "$item; $spinsys($item)"
  }
  puts $fp "=====;=====
  puts $fp "Par section:"
  foreach item [array names par] {
    puts $fp "$item; $par($item)"
  }
  puts $fp "=====;=====
  puts $fp "Optimized parameters:"
  puts $fp [format "Dipole_1_2; %3.0f Hz;Distance of; %3.2f A " $opt::dipole12 $dist12]
  puts $fp [format "Dipole_1_3; %3.0f Hz;Distance of; %3.2f A " $opt::dipole12 $dist12]
  puts $fp [format "Dipole_2_3; %3.0f Hz;Distance of; %3.2f A " $opt::dipole12 $dist12]
  puts $fp [format "T2; %6.1f ms" [expr 1000/$opt::T2]]
  puts $fp "=====;=====
  puts $fp "Simulated data"
  set str "delay(ms);experimental; best fit"
  set str [regsub -all {\.} $str ","]
  puts $fp $str
  for {set i 0} {$i < $par(np)} {incr i} {
    set ch "[expr ($i+1)*8000.0/$par(spin_rate)]; [findex $par(exp) [expr $i+1] -re]; [findex
    $f [expr $i+1] -re]"
    set ch [regsub -all {\.} $ch ","]
    puts $fp $ch
  }
  close $fp

#=====
# Convert dipole to distance
#=====
} else {
  puts [format "\[%s\] %10.3f \174 %6.1fHz <=> %3.1fA \174 %6.1fHz <=> %3.1fA \174
%6.1fHz <=> %3.1fA \174 %6.1f ms \015" [progress] $rms $opt::dipole12 [dip2dist 13C 13C -
$opt::dipole12] $opt::dipole12 [dip2dist 13C 13C -$opt::dipole12] $opt::dipole12 [dip2dist 13C
13C -$opt::dipole12] [expr 1000/$opt::T2] ]
}
flush stdout
funload $f
return $rms
}

```



```
proc main {} {
  global par spinsys mn
  set par(exp) [fload experimental,1.spe]
  opt::function rms
  puts " Progress   rms      Dipole_1_2      Dipole_1_3      Dipole_2_3      T2(ms)"
  opt::newpar T2 120.0 1.0 40.0 500.0
  opt::newpar dipole12 67 1 40 100
  opt::minimize 1.0e-3
  rms 1
}
```