

Université de Montréal

**Caractérisation du rôle de l'amyline (IAPP) dans le diabète
de type 2 : études de dérivés peptidiques et de composés
inhibiteurs de la formation d'amyloïde**

par

Jessica Fortin

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.)
en sciences vétérinaires
option pathologie

Juin, 2015

© Jessica Fortin, 2015

Résumé court

Le diabète de type 2 est une maladie commune affectant à la fois les êtres humains et les animaux. Chez la plupart des patients diabétiques de type 2, on retrouve des dépôts d'amyloïde dans les îlots de Langerhans. Ces dépôts proviennent d'une protéine, soit l'amyline, aussi nommé le polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques (IAPP). Dans des conditions physiologiques normales, l'IAPP est une hormone de satiété produite par les cellules bêta du pancréas. Dans certaines conditions pathologiques (diabète de type 2, insulinome), l'IAPP change de conformation structurelle et forme des fibrilles insolubles. Les dépôts ainsi formés dans les îlots de Langerhans sont associés à la mort des cellules bêta, contribuant ainsi à la progression du diabète de type 2. Toutefois, les mécanismes qui induisent la conversion de l'IAPP en amyloïde (AIAPP) ne sont pas complètement compris. La première hypothèse du projet est qu'il existe certaines variations critiques présentes dans les séquences peptidiques de l'IAPP provenant de différentes espèces animales pouvant jouer un rôle dans l'agrégation fibrillaire. La seconde hypothèse du projet est que plusieurs composés chimiques aromatiques sont capables d'abroger la formation de dépôts d'amyloïde. L'objectif général du projet de recherche consiste donc à développer et valider des nouvelles approches thérapeutiques *in vitro* de l'amyloïdose pancréatique. L'objectif 1 consiste à séquencer l'IAPP chez plusieurs espèces animales et identifier les variations en acides aminés critiques pour la formation de l'amyloïde pancréatique. L'objectif 2 inclut le criblage de trois classes pharmacologiques sur l'IAPP : les hypoglycémiantes, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), et les aryles éthyloxy urées (EU). De cette étude émergent quatre séquences peptidiques non-amyloïdogéniques et 11 composés permettant l'abrogation de la formation *in vitro* de l'amyloïde pancréatique. Ce projet de recherche pourrait ouvrir la porte à de nouvelles stratégies de traitement chez les patients souffrant de diabète de type 2.

Résumé long

L'amyloïdose, une maladie progressive et incurable, implique une vaste panoplie de pathologies et de pathogénèses, qui est expliquée par la grande variabilité biologique et structurale des protéines responsables de la formation des dépôts d'amyloïde. L'amyline (polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques, IAPP) est une protéine très susceptible de subir des changements de conformation impliquant les feuillettes bêta et conférant aussi des propriétés physicochimiques distinctes. Cette protéine prend alors une forme fibrillaire et se dépose dans les îlots de Langerhans chez les humains atteints de diabète de type 2 ou d'insulinome. Ces dépôts d'amyloïde pancréatique (AIAPP) ont été décrits chez certaines espèces animales telles que les félins domestiques, les grands félins, le raton laveur et les primates non humains. La formation de dépôts d'amyloïde contribue à la pathogénèse du diabète de type 2, mais les mécanismes qui induisent la conversion de l'amyline (IAPP) en amyloïde (AIAPP) ne sont pas complètement compris.

Les hypothèses du projet sont que certaines variations présentes dans les séquences peptidiques de l'IAPP provenant de différentes espèces animales jouent un rôle critique pour la formation de fibrilles et que plusieurs composés chimiques aromatiques/phénoliques sont capables d'abroger la formation de dépôts d'amyloïde. Le projet de recherche consiste donc à caractériser la propension des différentes isoformes animales d'IAPP à former de l'amyloïde *in vitro* afin d'identifier les acides aminés jouant un rôle clé dans cette transformation structurale et ultimement d'inhiber la formation d'amyloïde pancréatique.

Le projet se divise en deux volets principaux. Le premier consiste à identifier les différentes séquences peptidiques de l'IAPP retrouvées chez les espèces animales. L'objectif est d'identifier les acides aminés jouant un rôle clé dans la formation d'amyloïde. Le gène de l'IAPP a été séquencé chez plus d'une quarantaine d'espèces. Le potentiel d'agrégation des séquences obtenues a été simulé à l'aide d'outils bioinformatique. Une librairie de 23 peptides a été commandée afin de procéder à des analyses physicochimiques *in vitro* permettant d'évaluer le potentiel amyloïdogénique (test fluorimétrique à la thioflavine T, essai de liaison au rouge Congo, dichroïsme circulaire, microscopie électronique à transmission) et cytotoxique (sur une lignée cellulaire provenant d'insulinome : INS-1). Les analyses

effectuées à partir de la librairie constituée de 23 peptides ont permis d'identifier trois séquences ne formant pas d'amyloïde et qui proviennent des espèces animales suivantes : le tamarin lion doré (*Leontopithecus rosalia*), le grand dauphin (*Tursiops truncatus*) et l'alpaga (*Vicugna pacos*). Un site potentiellement critique est le segment 8-20 présentant le motif NFLVH qui ne forme plus d'amyloïde lorsqu'il est remplacé par le motif DFLGR ou KFLIR. Les acides aminés 29P, 14K et 18R sont également impliqués dans l'inhibition de la transformation structurale en fibrille.

La dernière partie du projet consiste à inhiber la formation de l'amyloïde en utilisant des composés chimiques commercialisés (hypoglycémiant, anti-inflammatoires non stéroïdiens) ou nouvellement synthétisés dans notre laboratoire (les aryles éthyles urées). Un criblage d'une soixantaine de composés chimiques a été conduit dans cette étude. Leur efficacité a été testée sur l'IAPP humaine, qui possède un fort potentiel amyloïdogénique. Les techniques utilisées sont les mêmes que celles exploitées précédemment. L'essai de liaison croisée photo-induite ("*photo-induced cross-linking of unmodified proteins*", PICUP) a été réalisé afin d'étudier les formes intermédiaires (monomères, oligomères). Un total de 11 composés chimiques a démontré un potentiel à inhiber l'agrégation des fibrilles. Pour la classe des hypoglycémiant, le glyburide, le répaglinide et la troglitazone ont montré l'activité thérapeutique la plus élevée pour retarder et réduire la formation de fibrilles. Les anti-inflammatoires anti-amyloïdogènes actifs incluaient le diclofenac, le méloxicam, le phénylbutazone, le sulindac et le ténoxiam. Les aryles éthyles urées les plus intéressantes étaient la EU-362 et la EU-418. Tous ces composés ont conféré une protection cellulaire contre l'activité cytotoxique des fibrilles. Les molécules actives possèdent des éléments structuraux communs tels des substituants donneurs d'électrons (alcool, amine, halogène) sur un noyau benzène.

En conclusion, ce projet de recherche a permis de caractériser l'IAPP chez diverses espèces animales, dont plusieurs chez lesquelles elle n'avait pas encore été décrite, de déterminer les sites jouant un rôle clé dans sa transformation en amyloïde et, ultimement, de tester le potentiel thérapeutique de nouveaux agents anti-amyloïdogènes dans le diabète de type 2. Nous espérons que ce projet ouvrira ainsi la porte à de nouvelles stratégies de traitement.

Mots-clés : amyline, amyloïde, analogues peptidiques, diabète de type 2, inhibiteurs de l'agrégation fibrillaire, îlot de Langerhans, pancréas.

Abstract

Amyloidosis is a progressive and, as of now, incurable disease caused by the deposition of insoluble proteins. Amyloid research over the past decades focused on the characterization of the substantive biological variability of amyloid deposits. Amyloidosis encompasses a diversity of pathological manifestations, explained by the diversity of underlying causal proteins. In the pancreas of susceptible species, islet amyloid polypeptide (IAPP) is a precursor for an amyloid protein (AIAPP), which has a characteristic fibrillar structure and resistance to physical agents. This folded protein deposits in the islets of Langerhans of patients with type 2 diabetes or islet cell tumors (insulinoma). Amyloid deposits have also been well characterized, anatomically, in feline and non-human primate species. Amyloid fibril formation contributes to the pathogenesis of diabetes mellitus but the precise pathophysiologic factors involved in the fibrillization of IAPP as well as resultant islet injury remain to be elucidated. Further understanding of the causative factors in the fibrillogenesis of IAPP will be requisite in the development of therapeutic strategies to disrupt the amyloidosis process.

This project hypothesizes that the specific variations found in IAPP peptide sequences among different animal species are critical for IAPP fibrillization. Also, some aromatic/polyphenolic compounds can abrogate fibrillization. The main objective forms the basis for development of new therapeutic tactics to impede amyloid formation and associated cellular injury. Thus this project has two specific aims.

The first specific aim was to identify critical variations in IAPP amino acid sequences from different animal species and to assess their amyloidogenic potential. To accomplish this, the IAPP gene was isolated and sequenced from paraffin-embedded tissues from various animals (40 species). The aggregation potency was assessed for each sequence using *in silico* analysis. A library of 23 peptides was prepared from sequences that were distinctly different and their amyloidogenic potential was assessed *in vitro* using physicochemical analysis (thioflavin-T assay, Congo red binding assay, far-UV circular dichroism, transmission electron microscopy) and cytotoxicity assays (insulinoma cell line INS-1). Among this peptide library, three were non-amyloidogenic and corresponded to the following animal species: golden lion

tamarin (*Leontopithecus rosalia*), common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and alpaca (*Vicugna pacos*). Segment 8-20 of the peptide was critical for amyloid formation and the substitution of the NFLVH motif found in this region by a DFLGR or KFLIR motif impeded fibrillization. The amino acids 29P, 14K and 18R were also demonstrated to abrogate fibril formation.

The second objective consisted in abrogating IAPP fibrillogenesis using conceptualized aromatic/polyphenolic structures, specifically hypoglycemic, non-steroidal anti-inflammatory and aryl ethyl urea agents. This part of the project involved molecular screening of more than 60 compounds. Their efficacy at inhibiting amyloid formation was assessed *in vitro* on human IAPP, which exhibits the highest amyloidogenic potential. Techniques included the above-mentioned methods, with the addition of photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP). A total of 11 compounds showed potential in abrogating IAPP aggregation. Among the hypoglycemic agents evaluated, glyburide, repaglinide and troglitazone showed the highest potency in reducing fibril formation. The NSAIDs that displayed anti-amyloidogenic activity were diclofenac, meloxicam, phenylbutazone, sulindac and tenoxicam. EU-362 and EU-418 were the hit compounds resulting from the screening of the aryl ethyl urea (EU) class. Additionally, these anti-amyloidogenic molecules conferred a protection against fibril cytotoxicity. All of the active molecules bear a common motif composed of benzene ring with electron donor moieties, such as alcohol, amine or halide.

To conclude, this project characterized IAPP in several animal species in which it has not been previously described and improves our understanding of the amyloidogenesis process. Moreover, the therapeutic potential of hypoglycemic, non-steroidal anti-inflammatory and aryl ethyl ureas agents as anti-amyloidogenic compounds was evaluated. It is conceivable that the additional information hereby gained on the regulation of amyloidogenesis may point towards new therapeutic strategies for diabetic patients.

Keywords: amyloid, islet amyloid polypeptide (IAPP), inhibitors of fibrillization, pancreas, islets of Langerhans, peptide analogues, type 2 diabetes.

Table des matières

Résumé court	ii
Résumé long.....	iii
Abstract.....	vi
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures	xiv
Liste des sigles et abréviations.....	xv
Remerciements.....	xix
Avant-propos.....	xx
Chapitre I	22
1. Introduction.....	22
1.1 L'amyloïde et l'amyloïdose	22
1.1.1 Histoire et avancées scientifiques dans le domaine de l'amyloïdose	24
1.1.2 Les différentes maladies associées à l'amyloïde	27
1.1.3 Les caractéristiques physicochimiques et structurales des fibrilles	30
1.1.4 La formation de l'amyloïde	33
1.1.5 Les effets toxiques	36
1.1.6 L'amyloïde fonctionnelle.....	38
1.2 Le diabète de type 2 et l'amyloïdose pancréatique.....	42
1.2.1 Le polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques (IAPP).....	43
1.2.2 Synthèse et modification post-traductionnelle de l'IAPP	46
1.2.3 L'IAPP et son rôle dans la pathogénèse du diabète de type 2	49
1.2.4 Les modèles moléculaires de la formation des fibrilles.....	53
1.2.5 Les modèles animaux transgéniques de l'amyloïdose pancréatique.....	58
1.3 Les principaux agents inhibiteurs de l'amyloïdose.....	62
1.3.1 Les petites molécules inhibitrices de l'agrégation fibrillaire	64
1.3.1.1 Les agents de la classe polyphénolique	70
1.3.1.2 Les agents de la classe non phénolique.....	73

1.3.2 Les inhibiteurs peptidiques	75
1.3.3 L'immunothérapie.....	77
1.3.4 Les nanoparticules	78
Chapitre II.....	81
2. Hypothèses et objectifs du projet de recherche.....	81
2.1 Hypothèses soutenant le projet de recherche	81
2.2 Objectifs du projet de recherche	82
Méthodologie et Résultats.....	86
Chapitre III.....	86
Article 1- Séquençage du polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques (IAPP) chez différentes espèces animales afin d'identifier les variations critiques pour l'agrégation fibrillaire	86
Contribution	86
Résumé.....	86
Wildlife sequences of islet amyloid polypeptide (IAPP) identify critical species variants for fibrillization.....	87
Abstract	87
Introduction.....	88
Materials and methods	90
Results.....	94
Discussion.....	102
Conclusion	103
Acknowledgements.....	103
References.....	103
Supplementary materials.....	107
Chapitre IV.....	115
Article 2- Évaluation <i>in vitro</i> d'agents hypoglycémisants afin de cibler le polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques humains : une protéine clé impliquée dans les dépôts d'amyloïde et la perte des cellules bêta	115
Contribution	115
Résumé.....	115

<i>In vitro</i> evaluation of hypoglycemic agents to target human islet amyloid polypeptide: A key protein involved in amyloid deposition and beta-cell loss.....	116
Abstract.....	116
Introduction.....	117
Methods.....	119
Results.....	125
Discussion.....	133
Conclusion	137
Acknowledgements.....	137
References.....	137
Supplementary materials.....	142
Chapitre V.....	143
Article 3- Inhibition de l'agrégation et de la cytotoxicité associée au polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques (IAPP) par les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS).....	143
Contribution	143
Résumé.....	143
Inhibition of islet amyloid polypeptide (IAPP) aggregation and associated cytotoxicity by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)	144
Abstract.....	144
Introduction.....	145
Methods.....	147
Results.....	154
Discussion.....	170
Acknowledgements.....	175
References.....	175
Chapitre VI.....	181
Article 4- Découverte de dérivés éthyle urée comme inhibiteurs de l'agrégation fibrillaire et de la cytotoxicité.....	181
Contribution	181
Résumé.....	181

Discovery of ethyl urea derivatives as inhibitors of islet amyloid polypeptide fibrillization and cytotoxicity	182
Abstract.....	182
Introduction.....	182
Methods.....	185
Results.....	187
Discussion.....	194
Acknowledgements.....	195
References.....	195
Chapitre VII	198
7. Discussion générale	198
Chapitre VIII.....	211
8. Conclusion	211
Bibliographie.....	212
Annexe I.....	xxii
Article 5- Caractérisation d'une tumeur des îlots pancréatiques chez un ours polaire (<i>Ursus maritimus</i>).....	xxii
Contribution	xxii
Résumé.....	xxii
Characterization of a pancreatic islet cell tumor in a polar bear (<i>Ursus maritimus</i>)	xxiii
Abstract.....	xxiii
Introduction.....	xxiii
Case history.....	xxiv
Methods.....	xxiv
Results.....	xxvi
Discussion.....	xxxii
Acknowledgements.....	xxxiv
References.....	xxxiv
Annexe II	xxxvii
Article 6- Caractérisation anatomique et moléculaire du pancréas endocrin d'un poisson téléostéen : le loup de l'Atlantique (<i>Anarhichas lupus</i>).....	xxxvii

Contribution	xxxvii
Résumé.....	xxxvii
Anatomic and molecular characterization of the endocrine pancreas of a teleostean fish: Atlantic wolffish (<i>Anarhichas lupus</i>).....	xxxviii
Abstract.....	xxxviii
Introduction.....	xxxix
Methods.....	xli
Results.....	xliii
Discussion.....	xlvi
Acknowledgements.....	xlix
References.....	xlix

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de quelques formes d'amyloïdose selon les différents types, la distribution et les conditions cliniques associées.....	28
Tableau 2 : Classification de quelques inclusions intracellulaires pouvant adopter les propriétés de l'amyloïde.....	28
Tableau 3 : Séquence primaire de l'IAPP provenant de différentes espèces animales....	45
Tableau 4 : Les principaux modèles transgéniques applicables à l'étude de l'amyloïdose pancréatique.....	61
Tableau 5 : Les principales molécules ayant démontrées un potentiel à inhiber l'agrégation fibrillaire d'une ou de plusieurs protéines.....	66

Liste des figures

Figure 1 : Coloration au rouge Congo provenant d'une coupe histologique de l'endocarde chez un patient atteint d'amyloïdose cardiaque.	25
Figure 2 : Découvertes et progressions majeures dans le domaine de la recherche sur l'amyloïdose depuis 150 ans.	26
Figure 3 : Fibrilles d'amyloïde provenant d'une extraction des chaînes légères d'immunoglobulines κ visualisées en microscopie électronique à transmission.	31
Figure 4 : Cascade de la formation d'amyloïde illustrant les différentes structures intermédiaires et leurs niveaux hiérarchiques.	32
Figure 5 : Formation des fibrilles d'amyloïde dépendante de la nucléation.	33
Figure 6 : Exemple d'un paysage énergétique illustrant les niveaux d'énergie en fonction des différentes conformations impliquées dans le repliement et l'agrégation fibrillaire d'une protéine.	35
Figure 7 : Système curli retrouvé dans la bactérie <i>Escherichia Coli</i>	41
Figure 8 : Coloration au rouge Congo d'une coupe histologique présentant un îlot pancréatique chez un sujet en santé (A) et un patient diabétique de type 2 (B).	46
Figure 9 : Modifications post-translationnelles menant à la forme mature de l'hIAPP....	48
Figure 10 : Quelques modèles structuraux proposés dans la formation des fibrilles de l'hIAPP.	56
Figure 11 : Les modèles structuraux des différents conformères de l'hIAPP.	57
Figure 12 : Différentes stratégies afin de rompre le cycle de la formation d'une fibrille.	64

Liste des sigles et abréviations

α : Alpha

α -syn : α -synucléine

A1C : Hémoglobine glyquée

AA : Amyloïde dérivée de la protéine amyloïde sérique A

AANF : Amyloïde atriale isolée

A β : Peptide β -amyloïde

A β 2M : " *β 2-Microglobulin-derived amyloidosis*"

ACal : Amyloïde de la calcitonine

AFib : Amyloïde du fibrinogène

Agrp : "*Agouti-related peptide*"

AH : "*Amyloid Heavy-chain (AH) amyloidosis*"

AIAPP : Amyloïdose pancréatique

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

AIns : Amyloïdose localisée au site d'injection de l'insuline

AL : "*Amyloid Light-chain (AL) amyloidosis*"

AApoAI : "*Apolipoprotein AI-derived amyloidosis*"

AApoAII : "*Apolipoprotein AII-derived amyloidosis*"

AApoAIV : "*Apolipoprotein AIV-derived amyloidosis*"

Apo ϵ : Apolipoprotéine E

ApoSAA : "*Serum amyloid A apolipoprotein*"

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATTR : Amyloïdose de la transthyrétine

β : Beta

CA : Acide caféique

CEU : Chroloéthyle urée

CD : Dichroïsme circulaire

CGA : Acide chlorogénique

CR : Rouge Congo

CsgA : Curline
CsgB : "*Curlin nucleator protein*"
CT : Calcitonine
DMSO : Diméthyle sulphoxide
EGC : Ester de gallate
EGCG : Épigallocatechine gallate
EPR : Résonance paramagnétique électronique
EU : Éthyle urée
FAP : Polyneuropathie amyloïde familiale
FTIR : Infrarouge à transformée de Fourier
FuBA : Amyloïde fonctionnelle bactérienne
GAG : Glycoaminoglycane
HFIP : 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
hIAPP : Polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques humain
IAPP : Polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques
IL- : Interleukine
INS-1 : Lignée cellulaire provenant d'insulinome de rat
JNK : Kinase de la partie N-terminale de la protéine c-jun
MAPK : Protéine-kinase activée par les mitogènes
MET : Microscopie électronique en transmission
MIN-6 : Lignée cellulaire provenant d'insulinome de souris
NiPAM:BAM : *N*-isopropylacrylamide:*N*-*tert*-butylacrylamide
ob/ob : "*Obese mouse*"
RAMP : "*Receptor activity-modifying protein*"
PAM : "*Peptidylglycine α -amidating mono-oxygenase*"
PC : Prohormone convertase
PICUP : Essai de liaison croisée photo-induite
PreProIAPP : Préprohormone du polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques
PRGC- : Peptide relié au gène de la calcitonine
ProIAPP : Prohormone du polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques
PrP : Protéine prion

PrP^c : "Celular prion protein"

PrP^{sc} : "Celular prion protein altered isoform"

rIAPP : Polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques provenant du rat

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SAA : "*serum amyloïde-associated*"

SAP : "*serum amyloid protein*"

SAR : Relation structure-activité

Tau : "*Tubule-associated unit*"

TFE : 2,2,2-trifluoroethanol

ThT : Thioflavine T

TTR : Transthyréline

UTR : Région non traduite

UV : Ultraviolet-visible

À mon père, Guy-Norbert Fortin (1951-2015)

Ton courage est pour moi une éternelle source d'inspiration...

Remerciements

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, la Dre Marie-Odile Benoit-Biancamano, ma co-directrice, la Dre Brigitte Guérin, ainsi que les membres de mon comité conseil, le Dr Derek Boerboom et le Dr Jacques Lussier, pour leur confiance et leur soutien pendant ma formation doctorale en sciences vétérinaires (PhD). Je voudrais aussi souligner la collaboration avec le Dr René C.-Gaudreault pour la réalisation d'une importante section de ce projet. Je remercie le soutien du coordonnateur des laboratoires de la Faculté de médecine vétérinaire, M. Frédéric Berthiaume, pour sa disponibilité et l'assistance technique très précieuse, ainsi que les nombreux conseils prodigués. J'adresse aussi mes sincères remerciements aux professionnels de recherche, Mme Chantale Provost (laboratoire du Dr Gagnon) et M. Philippe Garneau (laboratoire du Dr Harel), pour m'avoir conseillé et encouragé pendant mes études graduées à la Faculté de médecine vétérinaire. Je souligne aussi l'implication du Dr Carl A. Gagnon, Dre Marie Archambault et Dre Josée Harel en me donnant accès à leur laboratoire pour l'utilisation de plusieurs appareils importants pour la réussite de mon projet. Je remercie l'aide apportée par M. Donald Tremblay (laboratoire de diagnostic moléculaire), Mme Nancy Veilleux (laboratoire d'histopathologie), Mme Diane Rodier (secrétariat aux affaires étudiantes), Mme Christine Blondin (secrétariat aux affaires étudiantes), Mme Johanne Forgues (secrétariat du département de pathologie et microbiologie) et Mme Cécile Seyer (secrétariat du département de pathologie et microbiologie). Finalement, je voudrais remercier la Faculté de médecine vétérinaire (les Fonds du Centenaire) et l'Association Diabète Québec qui ont supporté mes travaux de recherche.

Avant-propos

Cette thèse est constituée d'un total de huit chapitres ainsi que de deux annexes. Mes travaux de recherche ont permis d'écrire et de soumettre quatre manuscrits, dont trois d'entre eux sont actuellement publiés. Je suis la première auteure de ces manuscrits. J'ai planifié et réalisé la majorité des expériences qui ont permis d'obtenir les résultats contenus dans ces manuscrits. La contribution spécifique des auteurs est indiquée au début de chaque chapitre. J'ai écrit la première version des manuscrits insérés dans cette thèse et participé à la correction des autres versions sous la supervision du Dr Marie-Odile Benoit-Biancamano.

Le premier manuscrit, *Wildlife Sequences of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) Identify Critical Species Variants for Fibrillization*, soumis dans le journal *Amyloid: the Journal of Protein Folding Disorders* constitue le chapitre III. Ce manuscrit présente les variations dans la séquence peptidique de l'IAPP provenant de différentes espèces animales. Les variations présentées sont requises pour provoquer un changement de conformation menant à la formation d'amyloïde ou pour stabiliser la forme native. De plus, ce document rapporte des séquences peptidiques pouvant potentiellement être modifiées chimiquement par des chimistes médicaux afin de mettre au point des inhibiteurs peptidiques de l'agrégation fibrillaire.

Le deuxième manuscrit, intitulé *In Vitro Evaluation of Hypoglycemic Agents to Target Human Islet Amyloid Polypeptide: A Key Protein Involved in Amyloid Deposition and β -cell Loss*, est présenté au chapitre IV. Il a été publié dans le *Canadian Journal of Diabetes*. Cet article scientifique décrit les relations structure-activité potentiellement impliquées dans l'inhibition de l'agrégation fibrillaire de l'hIAPP avec les principaux représentants des hypoglycémifiants. Les molécules qui présentent des propriétés inhibitrices intéressantes sont le glyburide, le répaglinide et la troglitazone.

Le troisième manuscrit, *Inhibition of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) Aggregation and Associated Cytotoxicity by Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs)*, est inclus dans le chapitre V. Ce dernier a été publié dans le *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. Nos travaux montrent les relations structure-activité possiblement impliquées

dans l'abrogation de l'agrégation fibrillaire de l'hIAPP par les agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens. Le manuscrit présente deux familles différentes de composés qui sont efficaces dans l'inhibition de la formation de fibrilles, soit la classe des acides enoliques (méloxicam, piroxicam, tenoxicam et phénylbutazone) et des acides acétiques (acide niflumique, nimésulide, diclofénac et sulindac).

Le quatrième manuscrit, *Discovery of Ethyl Urea Derivatives as Inhibitors of Islet Amyloid Polypeptide Fibrillization and Cytotoxicity*, a été soumis dans le *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. Les travaux constituant le chapitre VI sont très intéressants puisqu'ils incluent une grande majorité des molécules préparées dans le cadre de ma maîtrise effectuée à la Faculté de pharmacie de l'Université Laval. Cet article décrit l'activité de molécules provenant d'une toute nouvelle classe, soit les aryles éthyles urées (EUs), qui sont capables d'abroger l'agrégation fibrillaire de l'hIAPP.

Le cinquième manuscrit, *Characterization of a Pancreatic Islet Cell Tumor in a Polar Bear (Ursus Maritimus)*, est publié dans le journal *Zoo Biology*. Ce dernier, présenté dans l'annexe I, rapporte une tumeur rare des îlots bêta pancréatiques chez l'ours polaire. L'amyloïde a été rapportée dans ce type de tumeur chez l'humain, les primates non humains et les canins. La tumeur chez cet ours polaire ne contenait pas de dépôts d'amyloïde. Le séquençage de l'IAPP et l'analyse *in silico* ont été effectués. L'article est inclus dans cette thèse puisque l'IAPP provenant de l'ours polaire démontre un potentiel amyloïdogénique.

Le sixième manuscrit, *Anatomic and Molecular Characterization of the Endocrine Pancreas of a Teleostean Fish: Atlantic Wolffish (Anarhichas Lupus)*, est présenté dans l'annexe II. Ce dernier est publié dans le journal *Zoological Studies*. Ces travaux sont très intéressants puisqu'ils décrivent le pancréas endocrin chez une espèce de poisson téléostéen et rapportent une distribution inusitée de l'IAPP.

Chapitre I

1. Introduction

1.1 L'amyloïde et l'amyloïdose

L'intérêt pour le domaine de recherche sur l'amyloïdose a augmenté de façon fulgurante depuis les dernières années, propulsant cette thématique parmi les disciplines majeures de recherche, notamment la chimie, les sciences des matériaux, la biologie, l'imagerie et la médecine. Les raisons soutenant cet intérêt marqué proviennent du lien entre la formation de l'amyloïde et les maladies dégénératives de hautes importances (maladie d'Alzheimer, diabète de type 2), des avancées que procurent les études sur la nature des formes fonctionnelles des protéines dans un système vivant et de l'opportunité de générer des nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans un contexte différent, la reconnaissance de l'habileté à convertir une grande variété de peptides et de protéines en polymères filamenteux d'une régularité extraordinaire a permis de générer des nouveaux matériaux possédant des propriétés intéressantes et remarquables (Knowles et Buehler, 2011).

L'agrégation des protéines en fibrilles formant des dépôts (plaques) extracellulaires ou des inclusions intracellulaires est impliquée dans la pathogénèse de plus d'une vingtaine de maladies, regroupées sous le terme d'amyloïdose (Sipe et al., 2014). La substance amyloïde qui provient du mauvais repliement d'une protéine, sans considérer la séquence en acide aminée ou la structure de l'état natif, se manifeste typiquement par une forme fibrillaire qui ressemble à un filetage. En plus de son importance en médecine et des sciences en matériaux, l'état d'amyloïde des peptides est à la fois particulier, fondamental et intrigant en raison des propriétés caractéristiques qu'il démontre. En plus de ces propriétés inusitées, la panoplie de structures tridimensionnelles distinctes que génère la cascade de la formation de l'amyloïde met au défi plusieurs concepts établis sur la nature de l'état fonctionnel des protéines (Dobson, 1999). Les travaux menés en laboratoire ont permis de constater qu'une variété de protéines possède la capacité de former des structures fibrillaires (Dobson, 1999; Dobson, 2003; Chiti et Dobson, 2006). De surcroît, la formation d'amyloïde n'est pas seulement un rare phénomène

associé avec un faible nombre de maladie (Chiti et Dobson, 2006). Au contraire, l'état d'amyloïde émerge d'une forme structurelle alternative bien définie qui peut être adoptée sous quelques circonstances par plusieurs séquences peptidiques. Dans un autre ordre d'idées, l'usage thérapeutique d'analogues synthétiques de ces protéines est limité par la propension à former des fibrilles et à s'agréger.

Dans la communauté scientifique, plusieurs laboratoires de recherche s'attardent à bien comprendre comment les systèmes biologiques sont capables d'assurer que les protéines individuelles adoptent un état approprié en fonction des besoins de l'organisme sous des conditions spécifiques. L'organisme doit être capable d'activer les protéines à exécuter une fonction spécifique ou de cibler les protéines inadéquates pour les mener à la dégradation. Il est nécessaire de définir la nature et la propriété des états multiples qui sont, en principe, accessibles à une séquence donnée dans la cascade de la formation de l'amyloïde (Wilson et Easterbrook Smith, 2000; Dobson, 2003). Notamment, il est primordial de comprendre comment un système vivant est capable d'éviter la conversion des protéines de l'état natif à un état fibrillaire. Dans le contexte où ce processus peut entraîner la maladie, la nature de la structure de l'amyloïde doit être définie (Dobson, 2003; Vendruscolo et Dobson, 2005; Chiti et Dobson, 2006). Il convient toutefois de bien préciser que la séquence peptidique et l'état natif des protéines responsables de l'amyloïdose sont différents entre eux, contrairement à la substance amyloïde qui possède une architecture universelle, très rapprochée et hautement organisée. Toutefois, les détails spécifiques de la composition et les propriétés de la structure fibrillaire demeurent à ce jour une énigme.

Plusieurs évidences supportent l'hypothèse selon laquelle l'état d'amyloïde offre un état plus stable que l'état fonctionnel natif pour plusieurs protéines, même sous des conditions physiologiques. Ceci indique que l'état natif de ces protéines ne représente peut être pas l'énergie minimale globale sur les surfaces d'énergie libre des chaînes polypeptidiques correspondantes dans un organisme vivant, mais simplement des états métastables qui sont séparés de la forme amyloïde par le fait que leurs valeurs d'énergie d'activation sont élevées (Baldwin et al., 2011). Selon ce principe, les systèmes biologiques seraient notamment impliqués dans l'activation des protéines dans un état fonctionnel et soluble pour des périodes de temps prolongées sous des conditions normales physiologiques, au lieu de les convertir en

substance d'amyloïde. À l'exception, il existe un petit nombre relatif de cas où l'amyloïde est utilisée pour des raisons fonctionnelles puisque ces structures peuvent servir, entre autres, de gabarit structurel ou d'entreposage moléculaire (Chiti et Dobson, 2006; Fowler et al., 2007; Maji et al., 2009).

Quelques mécanismes de protection sont assurément encodés dans la séquence, notamment par l'habileté d'une protéine globulaire à adopter une conformation possédant un état stable et coopératif. Les régions promouvant l'agrégation de la protéine sont séquestrées à l'intérieur de la molécule. Ceci permet d'augmenter la barrière énergétique pour la conversion en espèces engendrant l'agrégation (Broome et Hecht, 2000; Pawar et al., 2005; Baldwin et al., 2011). Il est important de souligner que plusieurs mécanismes de protection sont associés avec l'environnement cellulaire, comme l'existence de chaperonnes et des mécanismes de dégradation mis en place pour prévenir la formation et l'accumulation des protéines fibrillaires (Wilson et Easterbrook Smith, 2000; Morimoto, 2008; Hartl et al., 2011). En effet, il est évident que ces mécanismes de maintenance de l'homéostasie cellulaire, plus spécifiquement de la protéostasie, sont vitaux, non seulement lors des changements de conformation suivant la biosynthèse, mais à tous les différents stades du cycle de vie des protéines.

1.1.1 Histoire et avancées scientifiques dans le domaine de l'amyloïdose

Depuis les dernières années, il y a eu d'énormes avancées permettant de mieux comprendre la nature et la structure de l'amyloïde, le mécanisme de formation et la pathogénicité. La plupart des progrès résultent de l'introduction de nouvelles techniques et approches; plusieurs ont été adaptées de méthodes développées afin d'étudier les systèmes moléculaires comme la nanotechnologie (Knowles et Buehler, 2011; Knowles et al., 2011). L'histoire moléculaire de l'amyloïdose est certes fascinante et souligne la contribution des avancées technologiques.

La découverte de l'amyloïde remonte à l'époque descriptive. Le physicien Rudolph Virchow a décrit pour la première fois la substance d'amyloïde en colorant des tissus humains avec de l'iode et de l'acide sulfurique (Virchow, 1851). Suite à cette coloration spéciale, l'aspect des tissus contenant les dépôts d'amyloïde était typiquement semblable à la coloration résultante de la cellulose, arborant une teinte bleutée. Il est important de mentionner que les

dépôts d'amyloïde sont homogènes et éosinophiles à la coloration histologique conventionnelle (hématoxyline et éosine). Quelques années plus tard, Friedreich et Kekulé ont démontré que ces dépôts étaient constitués de protéines (Friedreich et Kekule, 1859). En 1922, Bennhold a introduit l'utilisation de la coloration spéciale au rouge Congo, puisque l'amyloïde possède une affinité pour ce pigment (Bennhold, 1922). Par la suite, Divry et Florkin ont démontré que la liaison entre le rouge Congo et l'amyloïde conférait la propriété d'augmenter l'anisotropie, conférant la propriété de biréfringence (Divry et Florkin, 1927). En effet, la coloration au rouge Congo d'un tissu contenant de l'amyloïde devient vert pomme lorsque soumis à la lumière polarisée (**Figure 1**).

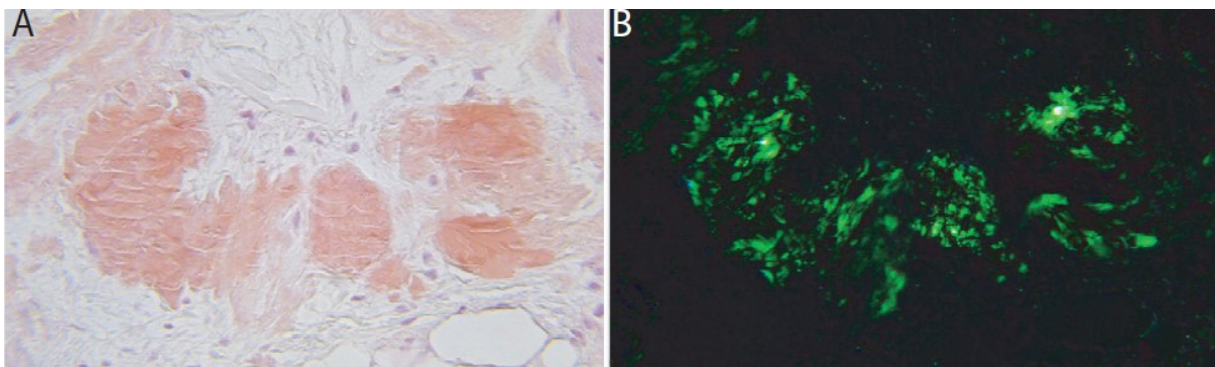


Figure 1 : Coloration au rouge Congo provenant d'une coupe histologique de l'endocarde chez un patient atteint d'amyloïdose cardiaque.

A) La coloration au rouge Congo de la section histologique montre un dépôt amorphe éosinophile au microscope optique. B) Lorsque soumis à la lumière polarisée, les dépôts d'amyloïde sont biréfringents, arborant un aspect vert pomme. Adaptée de Buxbaum et Linke, 2012.

La description de l'amyloïde à l'échelle du nanomètre a été effectuée par Cohen et Calkins en utilisant la microscopie électronique à transmission (MET) avec des sections de tissus paraffinés provenant de patients atteints d'amyloïdose (Cohen et Calkins, 1959). Ils ont été les premiers scientifiques à décrire l'aspect des agrégats fibrillaires. En fait, les fibrilles sont non branchées, d'un diamètre d'environ 10 nm et de longueur variable. Quelques années plus tard, les études sur la structure des fibrilles d'amyloïde ont été facilitées par la mise au point d'une méthode d'extraction en milieu aqueux par Pras et ses collaborateurs (Pras et al., 1968). Également, les travaux effectués en diffraction des rayons X sur un insecte, soit une chrysope (*Crysopa flava*), par Geddes et ses collaborateurs ont introduit le concept de

structure en feuillet β croisé ("*cross- β sheet*") (Geddes et al., 1968). Cette structure est constituée de brins β qui sont arrangés perpendiculairement à l'axe des fibrilles et empilés ensemble en feuillet β , formant ainsi un filament pouvant s'allonger jusqu'à l'infini. L'interprétation initiale de ce modèle a eu définitivement un impact significatif pour la compréhension de la structure de l'amyloïde.

Par la suite, les filaments d'amyloïde purifiés en provenance de la rate et du foie de patients souffrants d'amyloïdose ont été étudiés en utilisant la diffraction aux rayons X. Ce sont les premiers travaux qui ont mis en corrélation les lésions tissulaires provenant de patients souffrant d'amyloïdose avec la visualisation des fibrilles en diffraction aux rayons X. Les fibres créaient un patron associé avec l'architecture classique de feuillet β croisé. Eanes et Glenner sont les premiers scientifiques démontrant l'association de l'amyloïde *in vivo* avec l'architecture en feuillet β croisé (Eanes et Glenner, 1968; Glenner et al., 1969). La **Figure 2** résume les découvertes et progrès qui ont permis de définir la nature moléculaire de l'amyloïde. Elle souligne aussi la découverte des différents types d'amyloïdose les plus fréquemment rencontrés en médecine humaine et vétérinaire (Buxbaum et Reinhold, 2012).

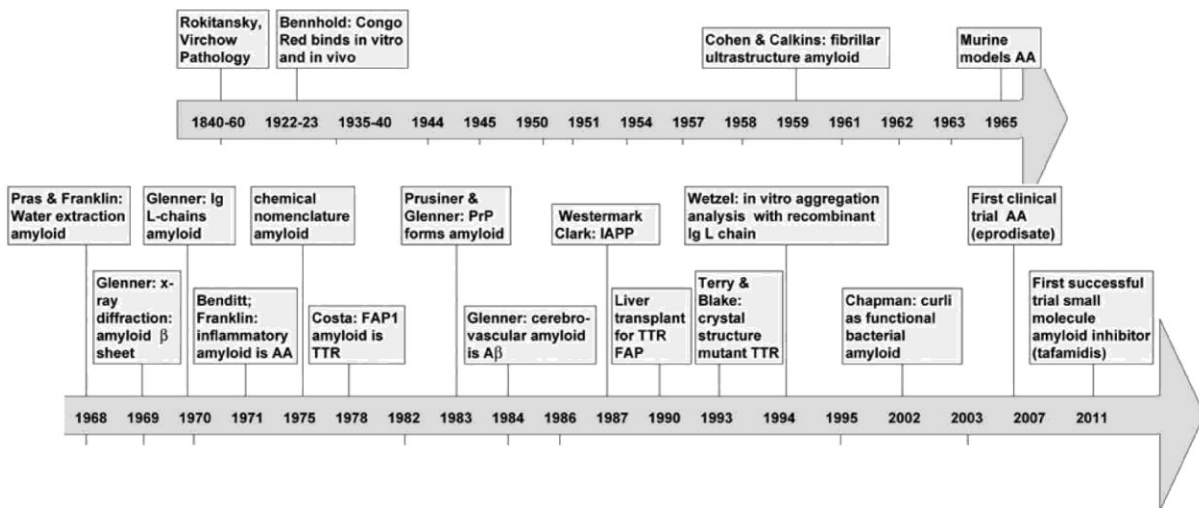


Figure 2 : Découvertes et progressions majeures dans le domaine de la recherche sur l'amyloïdose depuis 150 ans.

Adaptée de Buxbaum et Linke, 2012.

1.1.2 Les différentes maladies associées à l'amyloïde

L'amyloïdose est une maladie progressive et incurable qui peut être causée par différentes protéines. Environ 31 différentes protéines ont démontré le potentiel à former de l'amyloïde (amyloïdogéniques), mais elles ne sont pas toutes associées à une maladie cliniquement significative (Sipe et al., 2014). Ces protéines subissent un mauvais repliement ou changement de conformation ainsi qu'un processus d'élongation en fibrilles. L'amyloïdose décrit donc un groupe de désordres causés par un changement de conformation anormal entraînant l'agrégation et l'accumulation de certaines protéines dans les tissus, connue sous le terme de dépôts d'amyloïde. Ces dépôts sont composés de fibres de protéines anormales (fibrilles), qui s'accumulent plus rapidement qu'elles ne sont éliminées. Dans les conditions physiologiques normales, les protéines sont éliminées environ au même rythme que leur production. À l'opposé, les protéines qui forment l'amyloïde sont détruites très lentement. Progressivement, elles interfèrent avec la structure et la fonction des organes affectés. Ces dépôts engendrent ainsi des dommages à la membrane cellulaire, produisant des espèces oxygénées réactives (ROS) et provoquant l'apoptose.

Les dépôts d'amyloïde peuvent être localisés dans un organe particulier ou être généralisés dans tout l'organisme, dépendamment de la protéine initiatrice du processus. La vaste panoplie de pathologies et pathogénèses de l'amyloïdose s'explique donc par la grande variabilité biologique des dépôts d'amyloïde. Les symptômes apparaissent comme le résultat d'un dommage progressif aux tissus et organes affectés, comme par exemple le cœur ou le rein, et peuvent varier d'un patient à un autre. Les **Tableaux 1** et **2** présentent les principaux types d'amyloïde, leur distribution et les conditions cliniques auxquelles ils sont associés. L'amyloïdose est classifiée en accord avec la protéine précurseur.

Tableau 1 : Classification de quelques formes d'amyloïdose selon les différents types, la distribution et les conditions cliniques associées.

Type d'amyloïde	Protéine précurseur	Distribution	Forme clinique/syndrome
AL	Chaîne légère d'Ig (κ , λ)	G, L	(Primitive) isolée ou associée au myélome
AH	Chaîne lourde d'IgG (γ)	G, L	Isolée (polyneuropathie amyloïde familiale, Portugais)
AA	ApoSAA	G	Secondaire, Fièvre méditerranéenne familiale
ATTR	Transthyrétine mutée	G	Héréditaire (cardiomyopathie amyloïde familiale de type Danois)
	Transthyrétine normale	G	Sénile
Aβ2M	β 2-microglobuline	G	Associée à l'insuffisance rénale chronique terminale
AApoAI	Apolipoprotéine AI	G	Héréditaire (polyneuropathie amyloïde familiale de type Iowa)
		L	Aortique
AApoAII	Apolipoprotéine AII	G	Héréditaire
AApoAIV	Apolipoprotéine AIV	G	Sénile
AFib	Fibrinogène	G	Héréditaire
Aβ	A β PP	L	Maladie d'Alzheimer, syndrome de Down
APrP^{sc}	PrP ^c	L	Encéphalopathies spongiformes
ACal	Procalcitonine	L	Cancer médullaire de la thyroïde
AANF	Facteur atriale natriurétique	L	Amyloïdose atriale isolée
AIAPP	IAPP (Amyline)	L	Diabète de type 2, insulinome
Alns	Insuline	L	Iatrogénique (amyloïdose localisée au site d'injection)

G = amyloïdose généralisée, L = amyloïdose localisée. Adapté de Buxbaum et Linke, 2012; Hard et Lendel, 2012; Sipe et al., 2014; Woldemeskel, 2012.

Tableau 2 : Classification de quelques inclusions intracellulaires pouvant adopter les propriétés de l'amyloïde.

Corps d'inclusion	Protéine	Site	Forme clinique/syndrome
Corps de Lewy	α -synucléine (α -syn)	Neurone, intracytoplasmique	Maladie de Parkinson
Enchevêtrements neurofibrillaires	Tau	Neurone, intracytoplasmique	Maladie d'Alzheimer, démence, vieillissement
Corps de Huntington	Huntingtine	Neurone, intranucléaire	Maladie de Huntington

Adapté de Sipe et al., 2014.

Les protéines responsables de l'amyloïdose systémique incluent, entre autres, les protéines AL et AH qui proviennent des chaînes légères (L) et lourdes (H) d'immunoglobulines (Glennner, 1980a, 1980b). Les fragments d'immunoglobuline des chaînes légères ou lourdes entraînent la formation de fibrilles (WHO-IUIS, 1993; Gertz, 2004; Sipe et al., 2014). Il existe aussi l'amyloïdose A systémique, causée par la protéine SAA ("*serum amyloid-associated*"). L'AA peut être secondaire à l'inflammation chronique et les fibrilles proviennent de l'amyloïde sérique A (ApoSAA) (Benditt et Eriksen, 1972; Hazenberg et Van Rijswijk, 1994; Sipe et al., 2014). Les amyloïdoses systémiques communes en médecine humaine et vétérinaire surviennent souvent en concomitance avec une inflammation ou une néoplasie (Kim et al., 2005; Snyder, 2007). En médecine humaine, l'amyloïdose systémique AA est diagnostiquée chez certains patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques, notamment l'arthrite rhumatoïde. Les patients avec l'amyloïdose systémique AL souffrent parfois d'un désordre sous-jacent de la moelle osseuse, dont le myélome multiple, ou d'autres formes de dyscrasies lymphocytaires (WHO-IUIS, 1993, Sipe et al., 2014).

Plusieurs types d'amyloïdose systémique ont une base génétique; la plupart peut être identifiée à partir d'un test génétique. L'amyloïde transthyrétine (ATTR) est un exemple d'amyloïdose qui peut être héréditaire. La polyneuropathie amyloïde familiale (FAP) est causée par la mutation de la protéine transthyrétine amyloïdogénique et provoque une atteinte cardiaque et nerveuse périphérique sévère (Plante-Bordeneuve et Said, 2011). Au cours de la dernière décennie, il y a eu une progression dans la compréhension du type non héréditaire, soit l'amyloïdose sénile dont la protéine précurseur est la transthyrétine (TTR), menant ainsi à une augmentation de la fréquence de diagnostic de cette condition médicale. L'amyloïdose systémique sénile n'est pas reliée à une maladie sous-jacente ou à une transmission héréditaire (Cornwell et al., 1983; Westermark et al., 1990a).

Les formes d'amyloïdose localisées peuvent déclencher des pathologies de gravité variable, mais pouvant être importante selon l'organe touché et la sévérité des lésions. Jusqu'à tout récemment, presque tous les patients en stade terminal d'insuffisance rénale traités avec la dialyse pendant plus de cinq ans développaient de l'amyloïdose reliée à la dialyse. Dans cette condition, les dépôts d'amyloïde, qui se retrouvent dans les os et les articulations, sont formés par une protéine nommée β_2 -microglobuline (Gejyo et al., 1985). Ce type d'amyloïdose est

devenu moins commune grâce aux procédures modernes de dialyse, qui ont amélioré l'élimination de la β_2 -microglobuline (Gejyo et al., 1985). Un autre exemple d'amyloïdose localisée est la maladie d'Alzheimer, impliquant deux protéines, A β et Tau, retrouvées dans le cerveau des patients (Sipe et al., 2014). Pour le diabète de type 2, le polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques humains (IAPP) est à l'origine des dépôts d'amyloïde dans les îlots de Langerhans (Sipe et al., 2014).

Un obstacle majeur au diagnostic et à la prise en charge précoce de l'amyloïdose est la manifestation des symptômes, qui sont plutôt non spécifiques. Le diagnostic est alors souvent retardé jusqu'à ce que plusieurs investigations soient effectuées, impliquant la biopsie d'un organe. Plusieurs laboratoires de recherche travaillent actuellement sur le développement de radiotraceurs comme outil de diagnostic précoce pour l'imagerie non invasive de l'amyloïde.

1.1.3 Les caractéristiques physicochimiques et structurales des fibrilles

Les différents types d'amyloïde sont constitués d'agrégats fibrillaires qui partagent une architecture universelle plutôt qu'une séquence d'acides aminés commune. Les fibrilles possèdent des propriétés physicochimiques caractéristiques : un diamètre d'environ 10 nm, une structure de base riche en feuillet β et un motif de diffraction aux rayons X de type croisé β (Sipe et al., 2014). La substance amyloïde interagit avec les colorations spéciales comme le rouge Congo et la thioflavine T, permettant ainsi d'effectuer un diagnostic à partir des lames histologiques (Sipe et al., 2014). L'architecture de l'amyloïde comporte une hiérarchie filamenteuse constituée de protofibrilles, de protofilaments et de fibrilles (Murphy, 2007). Les protofibrilles sont de petites structures immatures, linéaires et courbées qui ne sont pas définies structurellement comme des fibrilles. Pour qu'une fibrille soit considérée mature, elle doit avoir un diamètre d'environ 10 nm et une longueur variable. Généralement, les fibrilles sont droites et non branchées. Quant aux protofilaments, ils sont constitués de sous filaments rapprochés qui s'associent afin de former une fibrille mature avec une structure de base définie et riche en feuillet β (Murphy, 2007).

Les fibrilles d'amyloïde examinées par microscopie électronique ou force atomique sont caractérisées par des structures semblables à du filetage qui ont un diamètre de quelques nanomètres et une longueur de l'ordre du micromètre (**Figure 3**). La structure fibrillaire est

constituée de feuillets β qui s'empilent ou se croisent de manière parallèle ou antiparallèle ("*cross- β sheet*"). Les fibrilles sont composées d'un nombre de protofilaments qui s'enroule les uns sur les autres afin de former une fibrille mature. Le noyau de chaque protofilament adopte une structure de type "*cross- β sheet*" (Sunde et al., 1997; Jimenez et al., 2002; Petkova et al., 2002; Nelson et al., 2005; Sachse et al., 2008). Les brins β (" *β -strands*") sont orientés perpendiculairement à l'axe des protofilaments. Cette organisation structurale permet de former de façon efficace des liaisons hydrogène entre les feuillets β qui continuent à s'empiler sur la longueur de la fibrille (Sunde et al., 1997; Jimenez et al., 2002; Petkova et al., 2002; Nelson et al., 2005; Sachse et al., 2008). Les études sur la conformation structurale de l'amyloïde révèlent qu'elle présente des variations sur un élément commun, soit la manière dont s'incorpore les chaînes latérales des résidus aminés ("*side-chain*") pour former les brins β . L'incorporation est déterminée par les propriétés de la chaîne principale du polypeptide (Fandrich et Dobson, 2002; Chiti et Dobson, 2006).

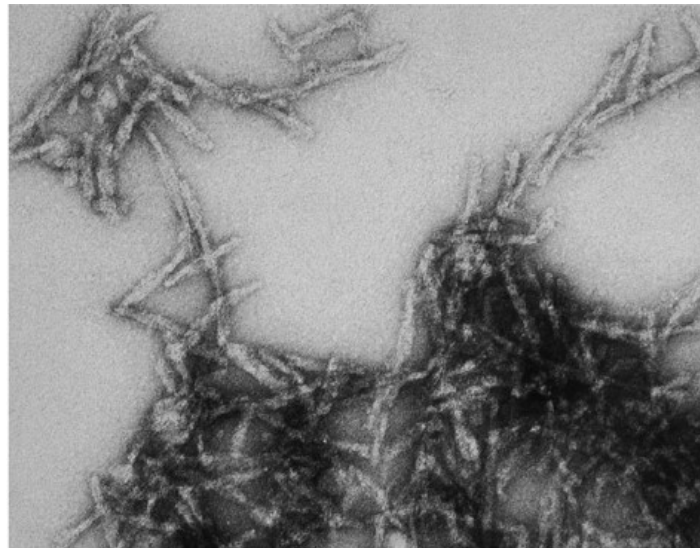


Figure 3 : Fibrilles d'amyloïde provenant d'une extraction des chaînes légères d'immunoglobulines κ visualisées en microscopie électronique à transmission.

Tirée de Buxbaum et Linke, 2012.

L'architecture croisée β décrit un feuillet β s'étendant à l'infini où les brins β sont arrangés perpendiculairement à l'axe des fibres qu'ils forment. La distance inter-brin est typiquement de 4,7 Å. Chaque brin est stabilisé via des ponts hydrogène. Les feuillets β peuvent alors s'associer latéralement pour former des filaments plus larges. La distance inter-

feuillet β est d'environ 10 Å. Les forces non covalentes contribuent à stabiliser cette distance et comprennent les effets d'encombrements stériques, du caractère hydrophobique et des interactions électrostatiques des chaînes latérales de certains résidus. L'architecture universelle procure une grande stabilité aux fibrilles. Les fibrilles sont très résistantes à la dégradation enzymatique (protéolytique) et à la dénaturation chimique (Knowles et al., 2007). Outre la structure moléculaire, la substance amyloïde implique des constituants biochimiques, soit le composant amyloïde P, les glycoaminoglycanes (GAG), l'apolipoprotéine E (Apo E), des inhibiteurs de protéases et d'autres composants de la matrice extracellulaire (Tennent et al., 1995; Charge et al., 1996; Zhang et Li, 2010). La **Figure 4** présente les structures intermédiaires et les niveaux hiérarchiques impliqués dans la cascade de la formation d'amyloïde.

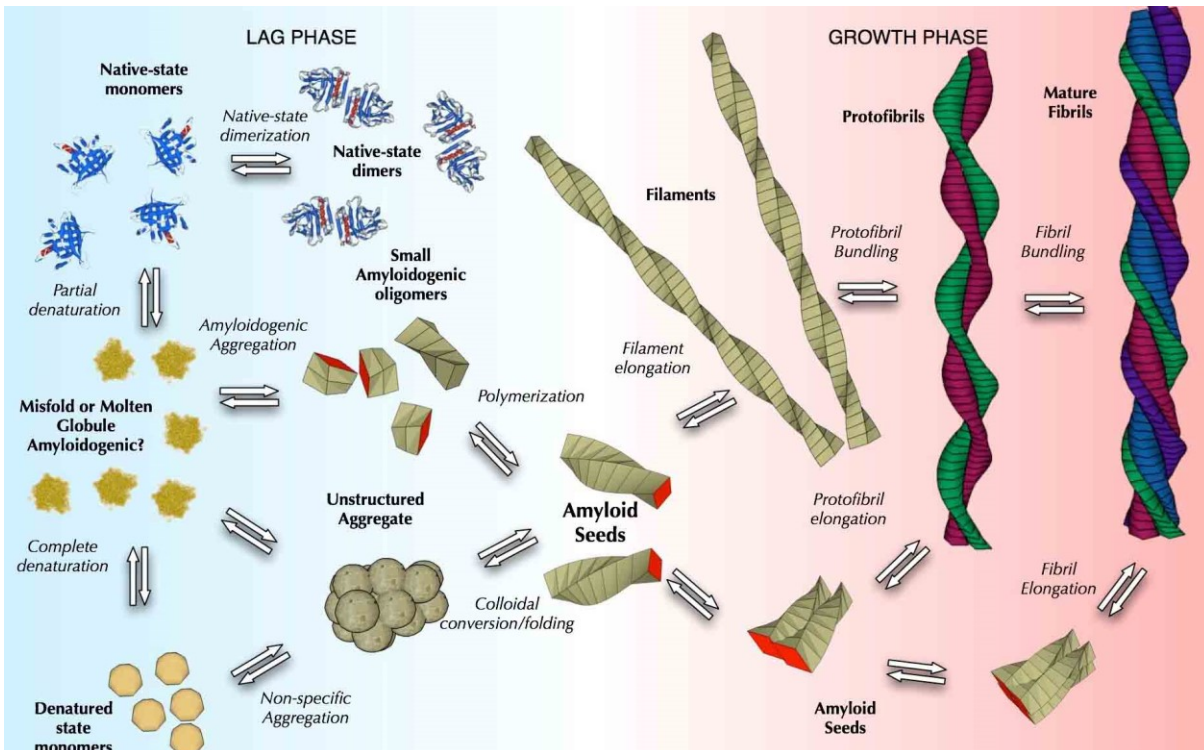


Figure 4 : Cascade de la formation d'amyloïde illustrant les différentes structures intermédiaires et leurs niveaux hiérarchiques.

Tirée de Giurleo et al., 2008.

1.1.4 La formation de l'amyloïde

La formation de fibrilles implique l'agrégation d'une protéine, la présence de noyaux/formes intermédiaires et l'élongation en une fibrille (Knowles et al., 2009). La formation d'un noyau peut varier en taille, du monomère au large oligomère. Le terme oligomère se réfère à un assemblage formé par deux ou plusieurs monomères et n'implique pas tous les éléments structuraux ou morphologiques associés à l'assemblage (Ferrone, 1999; Kodali et Wetzel, 2007; Morris et al., 2009). La nucléation est une étape essentielle afin d'initier le processus d'agrégation et résulte en un groupe hétérogène d'oligomères. À cette étape, le taux d'association excède le taux de dissociation. Le produit final de la réaction fibrillaire est un assemblage défini, soit une fibrille d'amyloïde. La **Figure 5** montre la cinétique de l'agrégation fibrillaire.

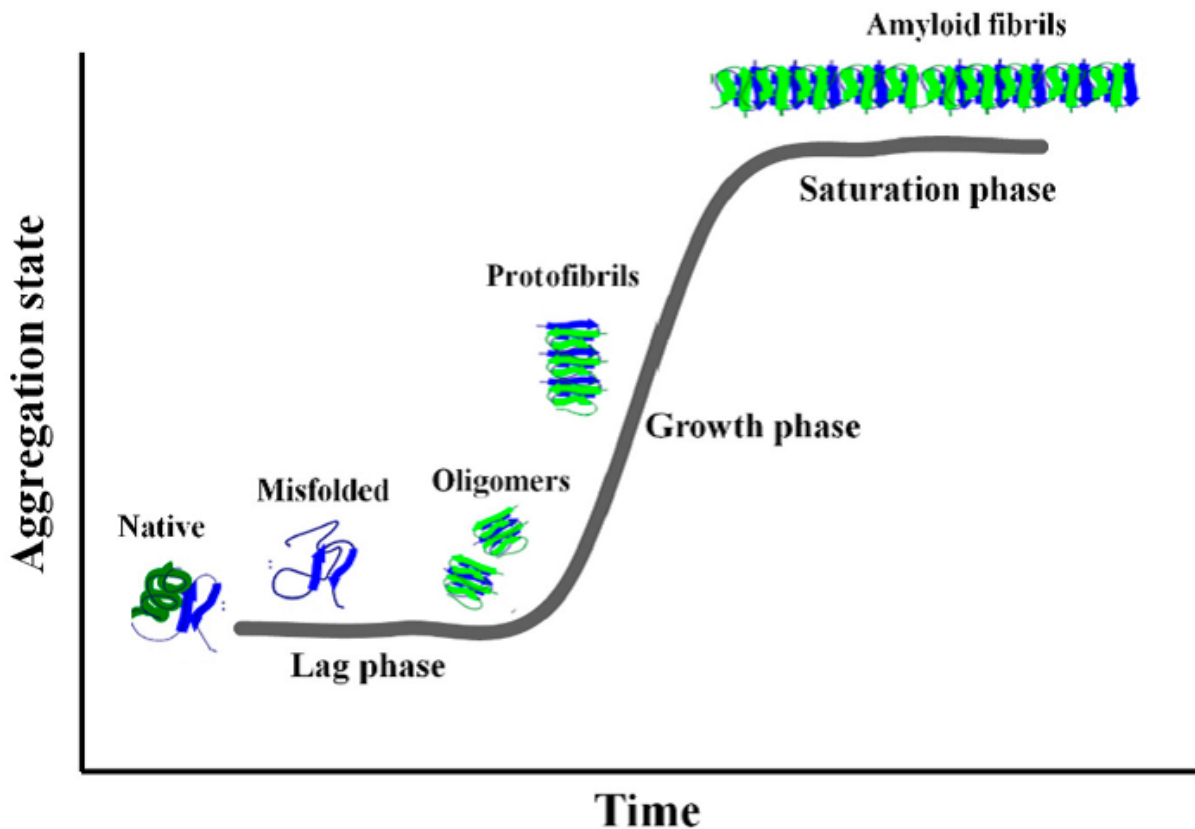


Figure 5 : Formation des fibrilles d'amyloïde dépendante de la nucléation.

La séquence des événements menant à la formation de fibrilles inclut une phase de latence ("*lag-phase*"), d'élongation ("*growth phase*") et de plateau ("*saturation phase*"). Tirée de Iannuzzi et al., 2015.

Une des avancées majeures dans la compréhension de la nature des fibrilles d'amyloïde provient des études expérimentales de la cinétique de formation, avec l'application des méthodes mathématiques, qui permettent d'évaluer les fluctuations dynamiques de différents processus sous-jacents à la réaction globale de l'agrégation. Ces méthodes ont révélé que la courbe sigmoïdale décrivant la conversion d'une protéine soluble en une protéine insoluble ne dépend pas simplement d'une étape de nucléation primaire, de la croissance et de l'élongation, mais implique aussi un processus secondaire qui dépend du degré d'agrégation survenant à toutes les étapes de la réaction (Knowles et al., 2009). La fragmentation est un exemple de processus secondaire qui, lorsqu'elle se manifeste, mène à doubler le nombre de fibrilles en croissance et résulte en une prolifération rapide des espèces fibrillaires (Collins et al., 2004).

L'étude des changements énergétiques (paysage énergétique) pendant le processus de la formation de l'amyloïde permet de souligner des concepts importants. Le changement de conformation d'une protéine, ou repliement, est sous un contrôle thermodynamique, tandis que l'agrégation de la protéine est sous un contrôle entropique (Jahn et Radford, 2005; Jahn et Radford, 2008; Eichner et Radford, 2011). Le repliement est dominé par les interactions intramoléculaires alors que l'agrégation est dominée par les interactions intermoléculaires. Le noyau composant la structure de l'amyloïde est la seule entité pouvant s'auto-assembler à un taux qui est plus élevé que le taux de dissociation de l'assemblage (Jahn et Radford, 2005; Jahn et Radford, 2008; Eichner et Radford, 2011). La formation des noyaux est un processus thermodynamiquement défavorisé, mais l'énergie élevée de ces structures est contrebalancée par leur conversion en agrégat d'amyloïde, qui représente le minimum absolu du paysage énergétique, soit la conformation la plus stable (Jahn et Radford, 2005; Jahn et Radford, 2008; Eichner et Radford, 2011). Les paysages énergétiques permettent d'évaluer l'énergie cinétique ainsi que d'autres paramètres pour tous les états conformationnels moléculaires. Ces derniers peuvent être formés par une protéine donnée, permettant ainsi la visualisation directe des multiples sentiers et états polymorphiques. Il existe différentes approches graphiques afin de décrire la séquence des événements survenant pendant l'auto-assemblage des protéines. Ces approches apportent différentes façons de représenter les mécanismes d'agrégation et offrent ainsi des informations complémentaires (Jahn et Radford, 2005; Jahn et Radford, 2008;

Eichner et Radford, 2011). La **Figure 6** illustre un exemple d'une approche graphique du paysage énergétique pendant l'agrégation fibrillaire.

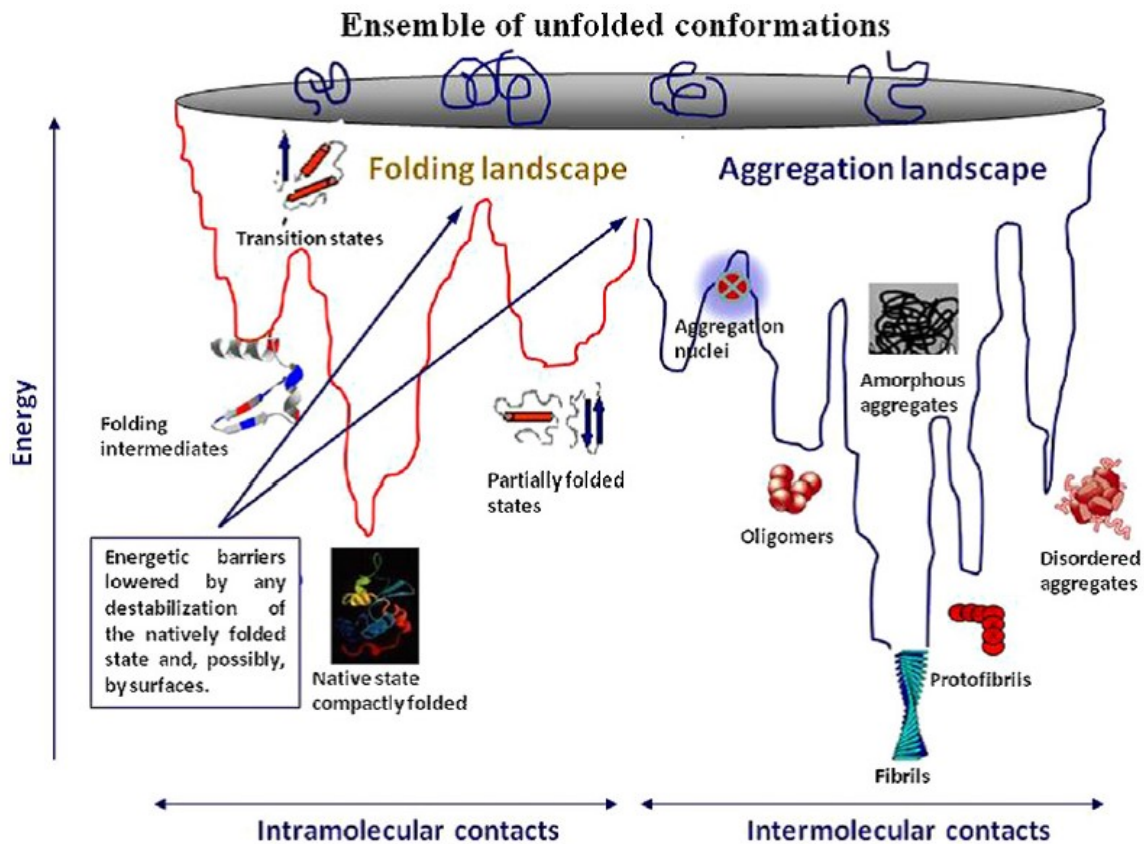


Figure 6 : Exemple d'un paysage énergétique illustrant les niveaux d'énergie en fonction des différentes conformations impliquées dans le repliement et l'agrégation fibrillaire d'une protéine.

Le repliement et l'agrégation sont en constante compétition puisque ces processus se déroulent sous l'influence de paramètres physicochimiques similaires. Tirée de Stefani, 2012.

Une des difficultés qui limite l'habilité à détailler les mécanismes de l'agrégation fibrillaire est liée au nombre élevé de conformations qui peuplent de façon transitoire et/ou concomitante la cascade de la formation de l'amyloïde. De plus, certaines protéines peuvent s'agréger selon des mécanismes moléculaires différents. Compte tenu de ce scénario complexe, les chercheurs de multiples secteurs scientifiques poursuivent leurs travaux afin de décrire les espèces qui peuplent le sentier de la formation de l'amyloïde.

1.1.5 Les effets toxiques

La corrélation entre la pathogénécité et l'accumulation de dépôts d'amyloïde a été démontrée depuis plusieurs années (Eanes et Glenner, 1968; Glenner et al., 1969). Toutefois, les mécanismes spécifiques impliqués dans l'initiation et la formation d'agrégats fibrillaires sont à préciser (Caughey et Lansbury, 2003; Chiti et Dobson, 2006; Haass et Selkoe, 2007). Pour l'amyloïdose systémique, une énorme quantité, voire même de l'ordre du kilogramme, de dépôts fibrillaires s'accumulent dans les organes vitaux (foie, rate), engendrant ainsi les dommages et la perte de fonction (Chiti et Dobson, 2006). En ce qui concerne les maladies neurodégénératives, les dépôts d'amyloïde se retrouvent en plus faible quantité dans les tissus. Dans ce cas, il y a une faible corrélation entre la quantité de dépôts et la sévérité des symptômes (Lue et al., 1999; Luheshi et al., 2008).

Plusieurs travaux de recherche sur les maladies neurodégénératives ont mis en évidence le fait qu'une petite quantité d'espèces pré-fibrillaires (au lieu d'une fibrille mature) induit une toxicité cellulaire (Walsh et al., 2002; Caughey et Lansbury, 2003; Haass et Selkoe, 2007). Les espèces oligomériques, soit les espèces intermédiaires durant l'interconversion d'une protéine native en une forme fibrillaire, entraînent des dommages cellulaires. Cette toxicité cellulaire a été observée chez les espèces oligomériques provenant de diverses protéines (Bucciantini et al., 2002). La toxicité induite par ces oligomères s'explique par le fait qu'ils sont capables d'interagir de façon inappropriée avec plusieurs constituants cellulaires. Le rapport surface:volume est élevé chez ces espèces relativement aux agrégats qui sont plus larges (Cheon et al., 2007).

Néanmoins, des évidences récentes suggèrent que l'hétérogénéité des oligomères (en tailles) entraîne un degré variable de toxicité (Stefani et Dobson, 2003; Campioni et al., 2010; Cremades et al., 2012). Les oligomères formés initialement pendant le processus d'agrégation sont des espèces relativement désordonnées et leur formation est initiée par la nécessité de séquestrer des régions hydrophobiques ainsi que d'autres régions. Cette séquestration induit l'agrégation des peptides sous une forme native (non repliée) ou repliée (Serio et al., 2000; Cheon et al., 2007; Cremades et al., 2012). De cette façon, ces régions hydrophobiques se retrouvent loin des molécules hydrosolubles. Dans certain cas, il y a un changement de

conformation associé avec la formation de précurseurs qui possèdent une structure amyloïde croisée β . Ces précurseurs bénéficient d'une stabilité plus grande mais, en contrepartie, ils sont pourvus d'une surface hydrophobique qui augmente potentiellement les interactions aberrantes avec d'autres composants cellulaires dont, entre autres, les membranes plasmiques. Au fur et à mesure que ces espèces oligomériques se multiplient en nombre, elles s'assemblent en fibrilles matures et constituent les plaques ou dépôts d'amyloïde. Lors de la formation de fibrilles, le rapport surface:volume augmente et les régions hydrophobiques peuvent se dissimuler dans ce grand assemblage. Cette hypothèse explique, en partie, la réduction de leur potentiel à générer des effets délétères.

Les oligomères peuvent pénétrer dans les cellules, en passant directement la bicouche lipidique de la membrane plasmique, ou par endocytose. Il y a aussi des interactions non négligeables avec les membranes plasmiques qui peuvent modifier la fonction des canaux calciques voltage-dépendants et des protéines membranaires (Hsieh et al., 2006; De Felice et al., 2007; Hou et al., 2007; Pellistri et al., 2008). Les oligomères peuvent aussi prendre la forme d'un beignet et peuvent causer de la toxicité via la formation de pores (Kourie et Shorthouse, 2000; Caughey et Lansbury, 2003; Jing et al., 2011). Par la formation de pores et/ou des interactions avec les membranes plasmiques, il y a une perte de l'intégrité de la bicouche lipidique et les ions calcium peuvent entrer dans la cellule (Kawahara, 2004). Il y a alors activation des pompes ATPases du réticulum endoplasmique et une augmentation du métabolisme cellulaire. Des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont alors produites et il y a libération du cytochrome c, qui provoque l'activation de la caspase 12, responsable de l'apoptose intrinsèque (Squier, 2001). Les fibrilles matures peuvent interagir avec les membranes plasmiques en induisant des radeaux lipidiques ("*raft*") et l'apoptose extrinsèque (Mattson et al., 1999; Capetillo-Zarate et al., 2006; De Felice et al., 2007; Pellistri et al., 2008). Les fibrilles peuvent aussi se décomposer en protofibrilles et oligomères. Ces derniers peuvent entrer dans la cellule et subir une élongation en fibrille mature intracellulaire. Les agrégats fibrillaires qui se déposent à l'intérieur de la cellule induisent l'autophagie.

La formation et l'accumulation des protéines ayant le potentiel de s'agrèger est un danger intrinsèque en tout temps pendant la durée de vie d'une protéine. Il n'est pas étonnant de constater que ces espèces oligomériques sont une des cibles des chaperonnes moléculaires.

Ces dernières ciblent les régions hydrophobiques à la surface des espèces oligomériques, soit pour introduire une correction dans la structure/conformation, pour séquestrer les formes repliées des protéines ou pour les dégrader (Morimoto et al., 2008; Hartl et al., 2011; Narayan et al., 2011). Lorsque la quantité des protéines partiellement dénaturées et prônes à l'agrégation atteint un certain niveau dépassant les capacités défensives des systèmes qui maintiennent l'homéostasie, il en résulte un mauvais fonctionnement et la mort cellulaire. Certes, ce scénario mène à la perte de la régulation de plusieurs processus cellulaires et de la protéostasie (Balch et al., 2008; Morimoto, 2008). L'agrégation initiale d'une protéine peut ainsi engendrer une variété de cascades moléculaires contribuant à l'apparition de l'amyloïdose. Les protéines sont très près de leur limite de solubilité et, par conséquent, une perturbation minime, notamment par l'introduction d'une mutation, d'une modification post-traduction, d'un changement de concentration ou d'une réduction de l'efficacité de la machinerie protectrice avec le vieillissement, peut être suffisante pour initier l'auto-association et mener à la prolifération des agrégats à un niveau pathogénique (Tartaglia et al., 2007). Les chaperonnes peuvent être très efficaces pour neutraliser les espèces formées par la nucléation primaire, particulièrement avant la conversion en fibrille. Par contre, une fois cette étape franchie, les processus secondaires, incluant la fragmentation et la catalyse, couplés à la croissance des fibrilles peuvent augmenter rapidement la quantité d'agrégats et la génération continue d'oligomères potentiellement toxiques (Cohen et al., 2010).

1.1.6 L'amyloïde fonctionnelle

La substance amyloïde est souvent considérée comme étant une entité délétère, voire même toxique, associée avec un nombre de maladies humaines grandissant. La formation de dépôts d'amyloïde est le résultat d'un changement de conformation d'une protéine ou l'effet d'une défektivité ou du dysfonctionnement de l'homéostasie générale des protéines cellulaires (protéostasie) (Dobson, 2003; Bucciantini et al., 2004; Uversky et Fink, 2004; Frokjaer et al., 2005; Chiti et Dobson, 2006). Les maladies associées à la formation de l'amyloïde sont caractérisées par la formation d'intermédiaires préfibrillaires toxiques et des fibrilles matures (Bucciantini et al., 2002; Goldsbury et al., 2005; Pedersen et Otzen, 2008). Ce type d'agrégat ne possède pas de fonction biologique, mais illustre plutôt un dysfonctionnement de l'homéostasie protéique (protéostasie). Certains auteurs stipulent que

ces agrégats n'ont pas été soumis à la pression de l'évolution puisqu'ils surviennent à un état tardif dans l'âge d'un individu et ils présentent donc un manque d'optimisation biologique (Otzen et Nielsen, 2008).

Récemment, la substance amyloïde a été rapportée comme étant une partie intégrale de la physiologie cellulaire. La nature a généré et exploité la structure de l'amyloïde pour des raisons bénéfiques (Fowler et al., 2007; Hammer et al., 2008; Otzen et Nielsen, 2008; Otzen, 2010). L'amyloïde dite fonctionnelle présente alors un contraste avec les maladies reliées aux agrégats fibrillaires. L'amyloïde est souvent le produit de changement de conformation d'un type de protéine hautement régulé, impliquant de multiples protéines de transport, les chaperonnes (Epstein et Chapman, 2008; Otzen, 2010). Ceci signifie également que l'amyloïde fonctionnelle peut être exprimée au bon moment et prendre place sans les effets délétères des intermédiaires cytotoxiques. Les études effectuées sur l'amyloïde fonctionnelle peuvent conséquemment offrir de nouvelles stratégies de prévention et de traitement pour les maladies associées à l'agrégation fibrillaire.

L'amyloïde fonctionnelle ("*new functional bacterial amyloids*" ou FuBA) est un terme général qui regroupe les différents types d'amyloïde retrouvés chez les invertébrés ou les bactéries (Sipe et al., 2014). Les études effectuées sur les biofilms bactériens provenant de divers habitats ont démontré que 5 à 40 % de toutes les bactéries co-localisent avec du matériel ayant des épitopes de la substance amyloïde (Larsen et al., 2007, 2008). La présence de structures s'apparentant à l'amyloïde a été observée dans le phylum des protéobactéries (Proteobacteria), des Bacteriodes, des Chloroflexis et des actinomycètes (Actinobacteria) (Larsen et al., 2007, 2008). L'abondance de matériel s'apparentant à l'amyloïde dans les biofilms et l'existence d'un large éventail de bactéries capables d'exprimer ces structures suggèrent que l'amyloïde joue un rôle important dans la vie de plusieurs espèces bactériennes (Gophna et al., 2001; Chapman et al., 2002; Claessen et al., 2003; Bieler et al., 2005; Barnhart et Chapman, 2006; Kwan et al., 2006; Oh et al., 2007; Jordal et al., 2009; Shewmaker et al., 2009; Dueholm et al., 2010; Sawyer et al., 2011). Le domaine bactérien représente alors une source majeure d'amyloïde fonctionnelle. Les bactéries sont utilisées afin de connaître les mécanismes de contrôle et de formation de l'amyloïde, en plus de décrire les applications de l'architecture fibrillaire. Les différents travaux de recherche effectués ont permis d'identifier

et de décrire quelques propriétés de l'amyloïde fonctionnelle bactérienne (FuBA). L'assemblage régulé de ces structures, clairement distinctes de l'agrégation non contrôlée des protéines, procure des exemples instructifs sur les mécanismes de contrôle des agrégats protéiniques potentiellement toxiques.

L'amyloïde fonctionnelle a différentes fonctions dans la cellule, notamment l'agglomération cellulaire, l'attachement cellulaire et l'enrobage (enveloppement) des spores. On retrouve la structure classique croisée β qui peut être facilement identifiable grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique (O'Nuallain et Wetzel, 2002). Le système curli, retrouvé dans la bactérie *Escherichia Coli*, implique la participation d'au moins 6 différentes protéines dans la formation de FuBA au niveau membranaire (Taylor et al., 2011). La protéine CsgA (curline) forme l'amyloïde au contact avec la protéine CsgB ("*curlin nucleator protein*"), qui joue le rôle d'un noyau essentiel pour la formation d'une fibrille (Taylor et al., 2011) (**Figure 7**). La protéine CsgC est une oxydoréductase qui augmente la perméabilité de la membrane cellulaire externe, via le pore membranaire CsgG (Taylor et al., 2011). Les deux autres protéines, CsgE et CsgF, interagissent avec la membrane externe (Taylor et al., 2011). La sous-unité CsgA contient cinq régions répétitives dans la séquence et forme un motif structural en hélice α . Chaque répétition forme le motif suivant : brin-boucle-brin (Barnhart et Chapman, 2006; Shewmaker et al., 2009). Des systèmes analogues ont été rapportés chez d'autres espèces bactériennes, dont le genre *Pseudomonas* (Dueholm et al., 2010). Chaque espèce bactérienne possède une caractéristique unique. La formation d'amyloïde fonctionnelle (FuBA) est liée à la présence de quelques répétitions imparfaites dans la séquence de la protéine impliquée. Curieusement, ces répétitions permettraient possiblement d'éviter l'accumulation d'oligomères potentiellement cytotoxiques (Wang et al., 2010). Les interactions entre les chaînes peptidiques latérales impliquent des acides aminés très polaires favorisant ainsi la formation d'une architecture très ordonnée (Wang et al., 2010).

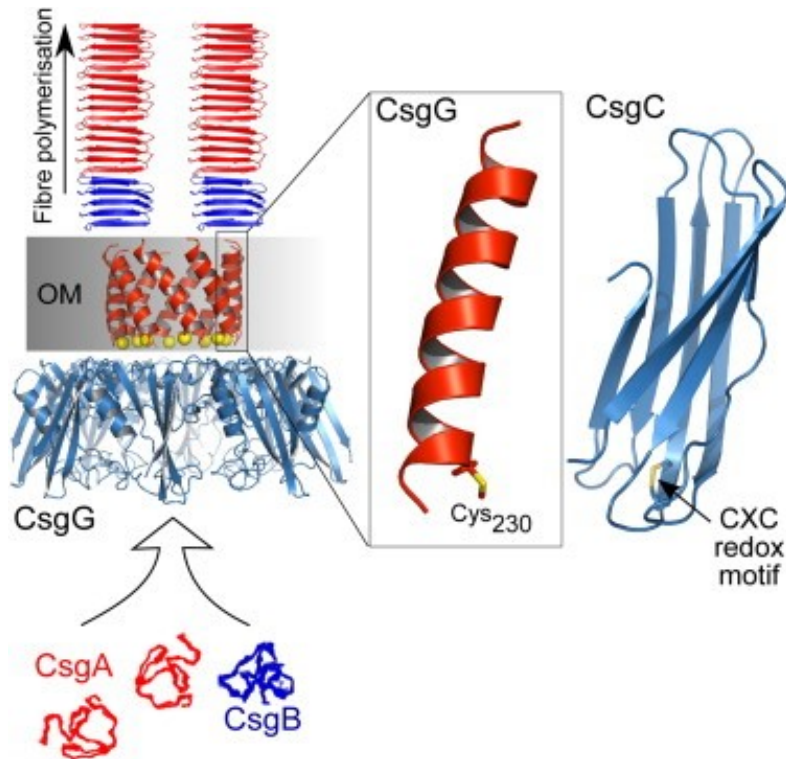


Figure 7 : Système curli retrouvé dans la bactérie *Escherichia Coli*.

La nucléation de la protéine CsgB provoque l'assemblage fibrillaire de la protéine CsgA. La protéine CsgC augmente la perméabilité de la membrane cellulaire externe, via le pore membranaire CsgG. Le domaine transmembranaire CsgG est important pour la formation de pore et l'assemblage du système curli. Tirée de Taylor et al., 2011.

À l'origine, la substance amyloïde était considérée comme pathogénique et liée aux maladies depuis qu'elle a été retrouvée chez les patients atteints de désordres dégénératifs et/ou neurologiques. Plus récemment, les études suggèrent que l'amyloïde fonctionnelle (FuBA) a été optimisée pendant l'évolution afin d'effectuer un nombre de fonctions, incluant la détoxification, l'échafaudage, le mouvement, l'attachement à un substrat, la reconnaissance et l'entreposage hormonale (Gophna et al., 2001; Chapman et al., 2002; Claessen et al., 2003; Bieler et al., 2005; Barnhart et Chapman, 2006; Kwan et al., 2006; Oh et al., 2007; Jordal et al., 2009; Shewmaker et al., 2009; Dueholm et al., 2010; Sawyer et al., 2011). Même si toutes les fonctions n'ont pas été assignées à tous les types d'amyloïde observés chez les bactéries, elles le seront probablement dans un futur très proche, suite à des investigations plus poussées.

1.2 Le diabète de type 2 et l'amyloïdose pancréatique

Mondialement, l'estimation du nombre de patients atteint du diabète est évaluée à 439 million d'adultes en 2030, et plus de 90% d'entre eux souffriront d'un diabète de type 2 (Shaw et al., 2010). Le diagnostic du diabète de type 2 est souvent tardif et les complications sont alors déjà présentes. Le diabète de type 2 implique une augmentation de la résistance des cellules périphériques à l'activité de l'insuline. Cette pathologie endocrinienne entraîne une augmentation de la néoglucogénèse hépatique. Avant même l'apparition du diabète, il y a une diminution de l'utilisation du glucose en périphérie provoquée par la résistance à l'insuline. La présence d'une hyperglycémie postprandiale cause une augmentation de la sécrétion de l'insuline par le pancréas afin de diminuer la glycémie sanguine (Lee et Pervaiz, 2007; Alldredge et al., 2012). En réponse à l'insulinorésistance, il y a présence d'une hyperinsulinémie sans hyperglycémie. Le diabète étant une maladie évolutive, la production hépatique de glucose augmente et la capacité du pancréas à produire de l'insuline diminue progressivement (Lee et Pervaiz, 2007; Alldredge et al., 2012). Ce désordre métabolique mène progressivement à la perte des cellules β des îlots de Langerhans et à l'apparition d'hyperglycémie. L'insulinorésistance est associée à l'obésité viscérale, à la dyslipidémie et à une dysfonction de la fibrinolyse. La présence d'une hyperinsulinémie contribue à l'athérosclérose qui peut mener à de l'hypertension (Lee et Pervaiz, 2007; Alldredge et al., 2012). Le diabète engendre de nombreuses complications médicales telles que les maladies cardiovasculaires, l'insuffisance rénale, la cécité, ou l'amputation d'un membre. Les patients atteints ont une diminution de la qualité et de l'espérance de vie (Lee et Pervaiz, 2007; Alldredge et al., 2012).

La prévention et l'implantation d'un régime thérapeutique demeurent les meilleures stratégies afin d'éviter les complications qu'impliquent le diabète de type 2 (Tuomilehto et al., 2001; Knowler et al., 2002). Dans cette optique, plusieurs laboratoires de recherche et compagnies pharmaceutiques s'intéressent à développer de nouveaux outils d'intervention et/ou de traitement afin de prévenir et retarder l'apparition du diabète de type 2. Le diabète est une maladie qui progresse avec le temps et, conséquemment, les traitements hypoglycémifiants oraux finissent par devenir inefficaces. Les efforts déployés en recherche visent également à améliorer le régime thérapeutique disponible sur le marché afin d'offrir des traitements qui

évitent l'apparition de l'hypoglycémie et d'effets indésirables néfastes tout en optimisant le contrôle des glycémies et en permettant d'atteindre la valeur cible de l'hémoglobine glyquée (A1C) de 7 % (Inzucchi et al., 2013). Ainsi, le traitement du diabète vise le contrôle de la glycémie par l'utilisation d'agents qui agissent sur les différents désordres métaboliques : l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline et la néoglucogénèse.

1.2.1 Le polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques (IAPP)

La première description des dépôts d'amyloïde dans les îlots pancréatiques chez les patients diabétiques remonte au début du siècle dernier (Opie, 1901). Ces dépôts amorphes sont très caractéristiques dans la physiopathologie du diabète de type 2, soit non-insulinodépendant. Les fibrilles retrouvées dans les îlots pancréatiques proviennent du polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques (IAPP) ou amyline, une protéine composée de 37 acides aminés qui est co-sécrétée avec l'insuline par les cellules β des îlots pancréatiques (Clark et al., 1987; Westermark et al., 1987). La séquence peptidique de l'IAPP est semblable à celles des peptides reliés au gène de la calcitonine ("*calcitonin gene related peptide*", CGRP), soit le PRGC-I et le PRGC-II, avec respectivement 43 et 46 % d'homologie (Höppener et al., 2002). Les trois peptides possèdent 37 acides aminés, un pont disulfure à la position 2 et 7 et une amine à l'extrémité C-terminale.

La fonction principale de l'IAPP n'a pas été clairement établie. L'expression de l'IAPP dans les cellules β et la sécrétion avec l'insuline supportent un rôle dans le maintien de l'homéostasie du glucose. Toutefois, les études réalisées dans les modèles animaux transgéniques ont rapporté une fonction antagoniste à l'insuline, puisque l'IAPP diminuait la sécrétion de l'insuline et la tolérance au glucose (Ahrén et al., 1998; Gebre-Medhin et al., 1998). D'autres fonctions de l'IAPP ont été proposées et elles consistent principalement à supprimer la libération du glucagon et à contrôler la satiété (Westermark et al., 2011; Lutz, 2012; Montane et al., 2012). L'IAPP se lie au récepteur de la calcitonine (CT) avec une faible affinité, mais cette affinité augmente lorsque le récepteur CT forme un complexe avec les RAMP ("*receptor activity-modifying protein*") (McLatchie et al., 1998). Les récepteurs de l'IAPP sont constitués de la co-expression entre le récepteur CT avec un des trois RAMP (McLatchie et al., 1998). Les interactions entre le récepteur CT et les RAMP modifient la

spécificité du récepteur CT envers l'IAPP (Christopoulos et al., 1999; Muff et al., 1999). Le récepteur CT possède deux variants d'épissage et ceci implique qu'il pourrait y avoir six différents sous-types de récepteurs de l'IAPP (Christopoulos et al., 1999; Muff et al., 1999). L'expression des récepteurs CT et RAMP a été identifiée dans le cerveau chez le rat et la souris (Ueda et al., 2001). L'IAPP présent dans la circulation sanguine peut atteindre ces récepteurs (Barth et al., 2004). Les récepteurs RAMP participent au transport du récepteur CT vers la surface membranaire et module la spécificité de ce dernier envers l'IAPP (McLatchie et al., 1998). Malgré l'importance physiologique de l'IAPP et de son implication dans la physiopathologie du diabète de type 2, le rôle de ces récepteurs (CT et RAMP) en relation avec l'IAPP dans les tissus périphériques et le système nerveux central sont inconnus à ce jour (Bailey et al., 2012). Actuellement, sur le marché mondial des produits pharmaceutiques, aucune molécule liant spécifiquement le récepteur de l'IAPP n'a été approuvée. Des travaux de recherches supplémentaires sont requis afin de comprendre l'implication physiologique de ces récepteurs.

L'IAPP est exprimé dans les îlots de Langerhans de tous les mammifères, mais le potentiel à former de l'amyloïde est relié aux variations interspèces retrouvées dans leur séquence peptidique. L'amyloïdose pancréatique a été rapportée chez les primates et les félins, mais cette condition pathologique ne se manifeste pas chez le rat et la souris. La comparaison des séquences en acides aminés de l'IAPP entre les différentes espèces animales et les études *in vitro* effectuées avec différents fragments synthétiques de l'IAPP ont permis d'identifier des régions essentielles pour la formation de l'amyloïde. Jusqu'à récemment, trois régions amyloïdogéniques ont été identifiées dans la séquence de l'IAPP : les segments 20-29, 30-37 et 8-20 (O'Brien et al., 1993; Westermark et al., 2011). Ces régions sont capables de former une conformation en feuillet β plissé. Les segments 8-20 et 30-37 sont hautement conservés entre les espèces. La région 30-37 est homologue entre le rat et l'humain et forme des fibrilles. Les IAPP provenant du rat et de la souris sont identiques et les régions 20-29 sont riches en prolines (Pro25, Pro28, Pro29), prévenant ainsi la formation de fibrilles (Höppener et al., 2002). La substitution d'acides aminés par des prolines est un facteur majeur pouvant prévenir le mauvais repliement et l'assemblage en fibrilles (Höppener et al., 2002).

Tableau 3 : Séquence primaire de l'IAPP provenant de différentes espèces animales.

Les acides aminés qui diffèrent de l'hIAPP sont identifiés en rouge. L'amyloïdose pancréatique a été rapportée chez les primates et les félins, mais pas chez les rongeurs, l'espèce canine et l'espèce bovine. L'IAPP provenant du furet et du porc sont amyloïdogéniques. Seules les séquences partielles ont été publiées pour les léporidés et les poissons osseux (téléostéens). Adapté de Nishi et al., 1989a; Westermark et al., 2011; Cao et al., 2013.

Espèces	Acides aminés
Humain (<i>Homo sapiens</i>)	K C N T A T C A T Q R L A N F L V H S S N N F G A I L S S T N V G S N T Y
Macaque (<i>Macaca</i>)	K C N T A T C A T Q R L A N F L V H R S N N F G T I L S S T N V G S D T Y
Babouin (<i>Papio</i>)	I C N T A T C A T Q R L A N F L V H R S N N F G A T L S S T N V G S N T Y
Porc (<i>Sus scrofa</i>)	K C N M A T C A T Q H L A N F L D R S R N N L G T I F S P T K V G S N T Y
Vache (<i>Bos taurus</i>)	G T A T C E T Q C L A N F L A P S S N K L G A I F S P T K M G S
Chat (<i>Felis catus</i>)	K C N T A T C A T Q R L A N F L I R S S N N L G A I L S P T N V G S N T Y
Chien (<i>Canis lupus familiaris</i>)	K C N T A T C A T Q R L A N F L V R T S N N L G A I L S P T N V G S N T Y
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	K C N T A T C A T Q R L A N F L V R S S N N L G P V L P P T N V G S N T Y
Hamster (<i>Cricetus cricetus</i>)	K C N T A T C A T Q R L A N F L V H S N N N L G P V L S P T N V G S N T Y
Cochon d'Inde (<i>Cavia porcellus</i>)	K C N T A T C A T Q R L T N F L V R S S H N L G A A L L P T D V G S N T Y
Furet (<i>Mustela putorius furo</i>)	K C N T A T C V T Q R L A N F L V R S S N N L G A I L L P T D V G S N T Y
Raton laveur (<i>Procyon lotor</i>)	K C N T A T C V T Q R L A N F L L R S S N N L G A I L S P T N V G S N T Y
Lapin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	T Q R L A N F L I H S S N N F G A I F S P P S
Lièvre (<i>Lepus</i>)	T Q R L A N F L I H S S N N F G A I F S P P N
Poulet (<i>Gallus gallus</i>)	K C N T A T C V T Q R L A D F L V R S S N I G A I Y S P T N V G S N T Y
Saumon de l'Atlantique (<i>Salmo salar</i>)	T Q R L A D F L T R S S N T I G T V Y A P T N V G S
Chaboisseau (<i>Myoxocephalus scorpius</i>)	S N S T I G T V N A P T N V G S
Poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>)	T R S S S P I G T V N A P T N V G S

Les fibrilles d'amyloïde sont formées du mauvais repliement de l'IAPP, et les agrégats fibrillaires insolubles se déposent dans les îlots de Langerhans (**Figure 8**). L'atteinte tissulaire est très variable entre les patients diabétiques de type 2, allant de 1 à 80 % des îlots pancréatiques (Westermark et al., 1973; Schneider et al., 1980; Clark et al., 1988; Röcken et al., 1992). À l'examen post-mortem, la prévalence de l'amyloïdose pancréatique chez les patients non diabétiques est faible, soit moins de 15 % chez les personnes âgées, contre plus de 90 % chez les patients diabétiques de type 2 (Clark et al., 1987; Röcken et al., 1992; Westermark et al., 1994). L'agrégation de l'IAPP en amyloïde est fortement associée à la dégénérescence des cellules pancréatiques et à la pathogénèse du diabète de type 2.

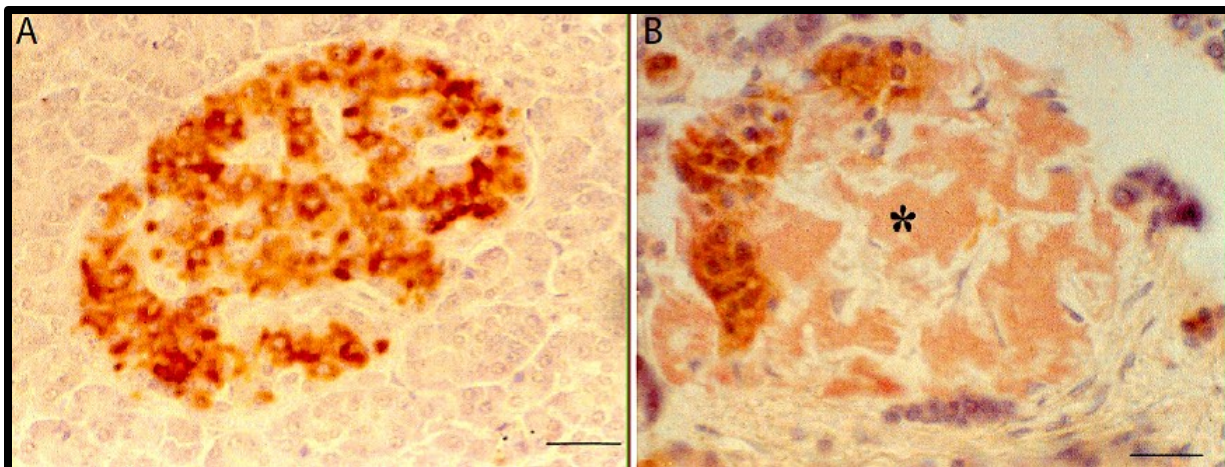


Figure 8 : Coloration au rouge Congo d'une coupe histologique présentant un îlot pancréatique chez un sujet en santé (A) et un patient diabétique de type 2 (B).

Les deux coupes histologiques montrent la localisation de l'insuline (en brun) via une immunohistochimie. A) Dans les conditions physiologiques normales, les cellules β qui contiennent l'insuline occupent 80 % de l'îlot pancréatique. B) La coloration au Rouge congo révèle une substance amorphe (*) pour le tissu pancréatique provenant du patient diabétique. Les dépôts d'amyloïde envahissent plus de 50 % de l'îlot pancréatique. Échelle = 20 μ m. Adaptée de Jaikaran et Clark, 2001.

1.2.2 Synthèse et modification post-traductionnelle de l'IAPP

L'IAPP est encodé par une seule copie d'un gène localisé dans le bras court du chromosome 12 (Buckle et al., 1989). Les gènes de l'IAPP chez le rat et l'espèce humaine sont très similaires et comprennent 3 exons et 2 introns (Nishi et al., 1989b; van Mansfeld et al., 1990). L'exon 1 du gène de l'IAPP humain (hIAPP) est constitué de 104 paires de bases codant une grande majorité de la région 5' non traduite (5'-UTR) (Nishi et al., 1989b; van Mansfeld et al., 1990). L'exon 2, composé de 96 paires de bases, code 15 nucléotides de la région 5' non traduite (5'-UTR), le peptide signal et cinq acides aminés de la portion N-terminale du propeptide (Nishi et al., 1989b; van Mansfeld et al., 1990). L'exon 3 est le plus grand des trois exons avec 1 246 paires de bases et code pour le reste de la portion N-terminale du propeptide, l'hIAPP, la portion C-terminale du propeptide et la région 3' non traduite (3'-UTR) de l'ARNm (Nishi et al., 1989b; van Mansfeld et al., 1990). Le peptide synthétisé contient un peptide signal à l'extrémité N-terminale d'une longueur de 22 acides aminés, permettant ainsi le transport vers le réticulum endoplasmique (Sanke et al., 1988).

Les éléments qui contrôlent le gène de l'IAPP ont été identifiés en amont de la région 5' non traduite (5'-UTR) à environ 1, 500 paires de bases de l'exon 1 (Van et al., 1990). Les études structurales effectuées en amont de la région 5' non traduite (5'-UTR) de la séquence IAPP chez l'humain (hIAPP) et le rat (rIAPP) révèlent des similarités et des différences dans les éléments régulateurs. La séquence en amont du gène de l'hIAPP contient une boîte TATA et une séquence similaire à celle de la région promotrice de l'insuline retrouvée chez le rat (Van et al., 1990). Le facteur de transcription PDX1 régule les effets du glucose sur les gènes de l'hIAPP et l'insuline (German et al., 1995; Watada et al. 1996). La région en amont chez le gène de l'rIAPP contient une boîte TATA, une séquence CCAAT, et un élément GT (Van et al., 1990). Ces différences suggèrent que le gène de l'IAPP peut être régulé différemment selon les espèces animales. Une étude a démontré qu'une délétion de la région entre 189 et 800 paires de bases en amont de l'exon 1 du gène de l'IAPP augmente l'expression du gène, ce qui suggère que cette région a un effet suppresseur de gène (Mosselman et al., 1990). Des études supplémentaires concernant l'expression du gène de l'IAPP *in vivo* et les aspects comparatifs de la structure des éléments régulateurs du gène de l'IAPP chez les différentes espèces animales pourront permettre d'élucider le rôle de la régulation de l'expression du gène de l'IAPP dans la pathogénèse de l'amyloïdose pancréatique et le diabète non-insulinodépendant.

La séquence primaire de l'hIAPP, soit le PreProIAPP, est constituée de 89 acides aminés (Sanke et al., 1988) (**Figure 9**). Le segment peptide signal constitué de 22 acides aminés est enlevé par la suite pour générer le ProIAPP d'une longueur de 67 acides aminés. Ce dernier est modifié dans le Golgi et les granules sécrétoires de l'insuline (Marzban et al., 2005). Le segment C-terminal et N-terminal du peptide flanquant le proIAPP sont lysés par la convertase PC2 et PC1/3, respectivement (Sanke et al., 1988). La carboxypeptidase E (CPE) se charge de retirer les acides aminés Gly, Lys et Arg en position C-terminale. La glycine sert de donneur d'électron pour l'amination de l'extrémité C-terminale effectuée par l'enzyme "*peptidylglycine α -amidating mono-oxygenase*" (PAM). La formation du pont disulfure entre les cystéines 2 et 7 mène à la formation du peptide hIAPP mature. Une mauvaise régulation de la synthèse et/ou la modification post-translationnelle de la proIAPP peuvent possiblement avoir un impact dans la formation de l'amyloïde *in vivo*.

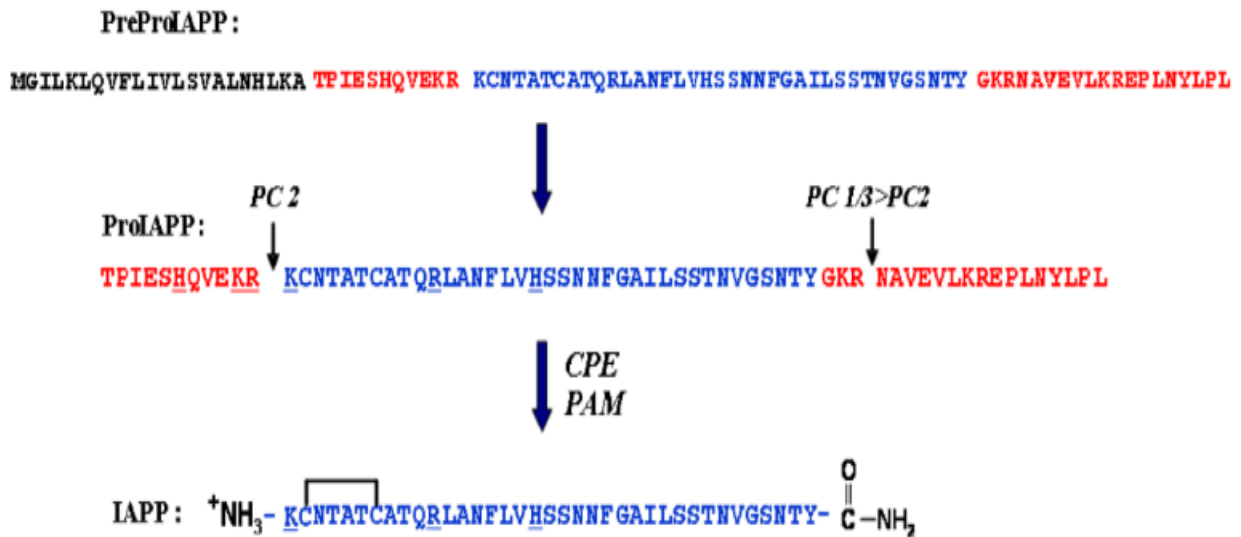


Figure 9 : Modifications post-translationnelles menant à la forme mature de l'hIAPP.

La séquence primaire, soit la PreProIAPP, est constituée de 89 acides aminés. Les acides aminés du peptide signal, des peptides flanquants et de la séquence mature sont indiqués en noir, rouge et bleu, respectivement. Les deux flèches noires montrent les sites de clivage par les proprotéines convertases (PC2 et PC1/3). Les enzymes carboxypeptidase E (CPE) et "peptidylglycine α -amidating mono-oxygenase" (PAM) confèrent un groupement amine à la portion C-terminale de l'hIAPP. Au final, la séquence mature de l'hIAPP possède 37 acides aminés, une extrémité C-terminale aminée et un pont disulfure entre les cystéines en position 2 et 7. Adaptée de Cao et al. 2013.

L'IAPP est emmagasiné dans les granules sécrétoires de l'insuline, dans le halo clair, tandis que l'insuline se retrouve dans la partie dense des granules (en microscopie électronique). Le ratio estimé de la concentration de l'IAPP sur celle de l'insuline dans les granules sécrétoires est moindre que 1/50 (Jaikaran et Clark, 2001; Hull et al., 2004). Plusieurs facteurs sont impliqués afin d'inhiber l'agrégation irréversible de l'hIAPP dans les granules sécrétoires. Le taux d'agrégation est plus lent à l'intérieur des granules sécrétoires (Hutton, 1982; Charge et al., 1995; Abedini et Raleigh, 2005). L'acidité du milieu environnant les granules sécrétoires contribue à l'inhibition de l'agrégation fibrillaire puisque le taux de formation de l'amyloïde est pH-dépendant (Hutton, 1982; Charge et al., 1995; Abedini et Raleigh, 2005). L'insuline est également un inhibiteur de l'agrégation fibrillaire de l'hIAPP via la formation d'hétérodimères entre l'insuline et l'hIAPP; cette hétérodimérisation joue un rôle important dans le contrôle de l'agrégation à l'intérieur des granules (Westermarck et al.,

1996a; Janciauskiene et al., 1997; Jaikaran et al., 2004; Larson et Miranker, 2004; Gilead et al., 2006).

1.2.3 L'IAPP et son rôle dans la pathogénèse du diabète de type 2

Malgré la progression importante dans le domaine de l'amyloïdose, le site d'initiation du processus de l'agrégation fibrillaire demeure inconnu. Les dépôts d'amyloïde dans les îlots de Langerhans sont rapportés presque exclusivement dans les compartiments extracellulaires chez les humains, les primates non humains et les félins. Ces dépôts sont facilement visibles à la bordure des îlots pancréatiques en microscopie optique et ils sont adjacent aux capillaires de ces îlots en microscopie électronique, particulièrement dans le stade précoce de la maladie (Westermarck et Grimelius, 1973; O'Brien et al., 1986; Clark et al., 1988; de Koning et al., 1993a; Kahn et al., 1999; Höppener et al., 2000). Ils ont été rapportés chez les singes non diabétiques ce qui supportent l'existence d'un état sub-pathologique. La progression des dépôts autour des capillaires a pour conséquence de diminuer l'apport des nutriments, l'élimination des déchets et la sécrétion hormonale. L'expansion des dépôts d'amyloïde vers les îlots est associée avec la mort des cellules β chez l'humain et les modèles animaux (de Koning et al., 1993b; Couce et al., 1996; Soeller et al., 1998).

La formation de dépôts d'amyloïde dans le pancréas est fortement associée avec l'augmentation de la production d'IAPP chez les modèles animaux et les lignées cellulaires pancréatiques (Couce et al., 1996; Janson et al., 1998; Höppener et al., 1999; MacArthur et al., 1999). L'accumulation des dépôts d'amyloïde au niveau extracellulaire et le patron de diffusion entre les cellules et les capillaires suggèrent qu'une augmentation de la production de l'IAPP ou une diminution de l'élimination des déchets est un facteur engendrant l'agrégation fibrillaire. Le glucose, un sécrétagogue de l'insuline, augmente la formation de fibrilles extracellulaires dans un modèle transgénique murin exprimant l'IAPP (de Koning et al., 1994; MacArthur et al., 1999). Les capillaires n'étaient plus fonctionnels au départ dans ce modèle. Les fibrilles s'accumulaient entre les cellules β de façon proportionnelle à la sécrétion de l'insuline et d'IAPP. Ces résultats supportent le fait qu'une augmentation de la sécrétion et une diminution de l'élimination des hormones, des métabolites et/ou des déchets au niveau des îlots de Langerhans sont d'importants facteurs contribuant à l'agrégation fibrillaire. La

présence de fibrilles au niveau intracellulaire était minime dans ce modèle murin transgénique (de Koning et al., 1994; MacArthur et al., 1999). Une étude effectuée dans un modèle félin a démontré que les dépôts d'amyloïde observés dans le pancréas sont plus extensifs dans le groupe traité avec les sulfonyles versus le groupe traité avec l'insuline (Hoenig et al., 2000). De ce point de vue, une stimulation prolongée des cellules β par les sulfonyles ou une concentration élevée et soutenue de glucose peut engendrer des dépôts d'amyloïde pancréatique plus extensifs et la perte de fonction des îlots pancréatiques.

La diminution de la sécrétion d'insuline chez les diabétiques de type 2 est très peu comprise malgré les divers travaux de recherche sur la toxicité du glucose, la lipotoxicité et les modifications génétiques potentielles (Porte et Kahn, 1989; Halban et Kahn, 1997). Certaines perturbations biochimiques ont été identifiées et soulignent un dysfonctionnement des cellules β , dont l'augmentation de la sécrétion de l'insuline, de la pro-insuline et des intermédiaires de la protéolyse de la proinsuline. La proinsuline et la proIAPP subissent des changements post-translacionnels par les mêmes enzymes, plus précisément les prohormones convertases (PC1 et PC2) et la carboxypeptidase E lors de leur passage dans le Golgi. Ces deux prohormones sont entreposées dans les granules sécrétoires matures (Hutton et al., 1994; Badman et al., 1996; Higham et al., 2000a). Les changements post-translacionnels de la proIAPP peuvent être affectés en concomitance avec ceux touchant la protéolyse de la proinsuline. Lorsque le mauvais déroulement de la protéolyse de ces prohormones survient, la production des précurseurs de l'insuline et de l'IAPP augmente significativement. En effet, une étude effectuée avec des modèles murins transgéniques exempts du gène codant pour la convertase PC2 a démontré une augmentation des intermédiaires N-terminaux ProIAPP (Wang et al., 2001). En plus de la ProIAPP, des fragments intermédiaires intacts sont possiblement présents au stade de l'hyperinsulinémie chez les patients diabétiques de type 2. Cette hypothèse est supportée par une étude qui a démontré la présence d'une immunoréactivité pour l'extrémité N-terminale de la ProIAPP dans les dépôts d'amyloïde (Westermarck et al., 1989; Clark et al., 1993).

Outre les dépôts d'amyloïde extracellulaires, un matériel d'aspect fibrillaire a été décrit à l'intérieur des cellules β dans un modèle murin transgénique surexprimant l'hIAPP et chez les patients diabétiques de type 2, suggérant la formation intracellulaire des fibrilles (de

Koning et al., 1994; O'Brien et al., 1994; Paulsson et al., 2006). Les intermédiaires de la protéolyse de la proIAPP constituent fort probablement une partie de ces dépôts intracellulaires (de Koning et al., 1994; O'Brien et al., 1994; Paulsson et al., 2006). L'hormone proIAPP possède des caractéristiques amyloïdogéniques *in vitro* (Krampert et al., 2000). Le potentiel d'amyloïdogénicité est toutefois moindre pour la proIAPP versus l'hIAPP (Krampert et al., 2000). Par contre, les extractions effectuées sur des tissus pancréatiques provenant de patients diabétiques et souffrant d'insulinome ont démontré l'absence de la proIAPP dans les dépôts d'amyloïde (Clark et al., 1987; Westermark et al., 1987). L'hormone proIAPP n'est pas une composante intrinsèque de l'amyloïdose pancréatique. Toutefois, il est possible que l'hormone proIAPP incomplètement clivée ait un rôle de niche ou d'ensemencement pour la formation de fibrilles (Paulsson et al., 2006).

Des études ont démontré que le site de liaison pour l'héparane sulphate recouvre le site de clivage au niveau de l'extrémité N-terminale de la proIAPP (Park et Verchere, 2001). Lorsque la portion N-terminale est intacte, la proIAPP peut être excrétée sous cette forme hors de la cellule. Dans l'espace extracellulaire des cellules β , cette forme intermédiaire peut alors se lier aux protéoglycanes à l'héparane sulfate (HSPG) sur la membrane extracellulaire. Le HSPG avec les protéoglycanes contribuent à la formation de l'amyloïde (Snow et al., 1987; Kisilevsky et Fraser, 1996; Castillo et al., 1998). Dans ce contexte, ces observations suggèrent que l'augmentation de l'excrétion de la proIAPP et la formation d'intermédiaires suite aux changements post-translationnels entraînent la formation des dépôts d'amyloïde près des capillaires par un effet d'ensemencement. C'est d'ailleurs à cet endroit que peut se retrouver une petite quantité de dépôts sub-pathologiques.

Plus récemment, une étude a démontré la présence d'une infiltration non négligeable de macrophages dans les îlots de Langerhans qui possèdent des dépôts d'amyloïde chez les patients souffrant du diabète de type 2 (Kamata et al., 2014). La population de macrophages retrouvée dans les îlots était proportionnelle à la densité des dépôts d'amyloïde (Kamata et al., 2014). À la lumière de ce qui précède, l'amyloïde induit fort probablement un état pro-inflammatoire au sein du tissu pancréatique. L'hIAPP provoque la mort des cellules β , qui libèrent les cytokines IL-1 β et IL-6 (Ehnes et al., 2009; Westwell-Roper et al., 2011). L'activation des macrophages par les cytokines engendre aussi la libération de IL-1 β ,

provoquant ainsi des dommages cellulaires et tissulaires importants (Masters et al., 2010). D'autres mécanismes pathogéniques sont aussi impliqués, comme l'inhibition de l'autophagie, qui a pour résultante d'augmenter les dommages cellulaires (Rivera et al., 2011).

Parmi les différentes espèces animales, l'amyloïdose pancréatique survient chez un nombre limité d'espèces (l'humain, le macaque et le chat) en concomitance avec le diabète mellitus. La comparaison entre les séquences peptidiques de l'IAPP chez les différents mammifères a permis l'identification de deux régions conservées, soit les acides aminés en position 1-19 à l'extrémité N-terminale et en position 30-37 à l'extrémité C-terminale. Le segment 20-29 présente plusieurs variations. Le segment constitué des acides aminés GAILS dans cette région indique une forte propension à former une conformation en feuillet β (Betsholtz et al., 1989). Le chien possède une séquence amyloïdogénique puisque le segment AILS est conservé. Toutefois, le chien ne développe pas d'amyloïdose pancréatique dans le contexte du diabète de type 2 (Jordan et al., 1990). À l'exception de ce qui précède, les dépôts d'amyloïde ont été observés chez les chiens atteints d'insulinome (O'Brien et al., 1990). Le fait d'avoir une séquence peptidique amyloïdogénique n'est donc pas un facteur suffisant pour développer des dépôts dans les îlots de Langerhans. En revanche, les changements physiopathologiques environnant le tissu pancréatique et la production de l'IAPP seraient possiblement les principaux responsables de l'agrégation fibrillaire.

La conversion de l'hIAPP en amyloïde est accélérée par la présence de fibrilles pré-formées et/ou de noyaux (Kayed et al., 1999; Rhoades et al., 2000). L'agrégation fibrillaire de l'hIAPP peut être initiée par la présence de fibrilles générées par d'autres protéines *in vitro* et *in vivo* (Westermarck et al., 1996b; Oskarsson et al., 2015). La présence d'un noyau au niveau des îlots de Langerhans entraîne la conversion plus rapide de l'hIAPP natif en substance amyloïde. Les noyaux sont des agrégats insolubles pouvant être composés des intermédiaires proIAPP ou des fragments d'hIAPP. Les expériences *in vivo* ont démontré que les fibrilles sont cytotoxiques (Lorenzo et al., 1994; Schubert et al., 1995; Janciauskiene et Ahren, 1998). L'amyloïdose pancréatique sévère corrèle avec la perte des cellules β des îlots pancréatique et le besoin d'une insulinothérapie (Schneider et al., 1980; Röcken et al., 1992; Westermarck et al., 1994). Les interactions entre des fibrilles ou protofibrilles et les membranes cellulaires provoquent l'apoptose cellulaire via l'activation (phosphorylation) des protéines kinases par

les mitogènes (MAPK), soit la protéine c-jun, la kinase de la partie N-terminale de la protéine c-jun (JNK), la protéine p38, et le clivage de la caspase 3 (Rumora et al., 2002; Zhang et al., 2003).

Tel que mentionné à la section 1.1.5, plusieurs travaux de recherche rapportent la présence d'oligomères dans la cascade de la formation de l'amyloïde. Les oligomères sont supposément les espèces les plus toxiques pour les cellules. Toutefois, les expériences d'ultracentrifugation analytique et la spectroscopie RMN au ^{19}F ont échoué à démontrer la présence d'oligomères formés par l'hIAPP (Vaiana et al. 2008; Suzuki et al., 2012). Par contre, les expériences de liaison croisée photo-induite de l'hIAPP permettent la visualisation des multimères (dimères, trimères, tétramères, etc.). De plus, la spectrométrie de masse a validé la présence de l'hIAPP sous forme dimérique (Dupuis et al., 2009; Dupuis et al., 2011). Des travaux de recherche supplémentaires seront requis afin de préciser l'implication des oligomères dans la formation de l'amyloïdose pancréatique.

1.2.4 Les modèles moléculaires de la formation des fibrilles

Les mécanismes moléculaires qui expliquent la conversion de l'hIAPP de la forme d'un monomère soluble en une fibrille insoluble ne sont pas complètement élucidés. Conformément à ce qui a été mentionné à la section 1.2.1, il y existe 3 domaines moléculaires dans la séquence peptidique de l'hIAPP qui peuvent avoir une implication majeure dans l'assemblage en fibrille (segments 8-20, 20-29, 30-37). En principe, lorsqu'il y a plus d'un segment pouvant former un brin β (" β -strand"), les interactions inter/intramoléculaires risquent de survenir pendant la formation des feuillets plissés β . Le processus du repliement implique des intermédiaires de formes indéterminées qui sont beaucoup plus complexes que l'association moléculaire avec un seul segment. Il est important de souligner que l'hIAPP sous une forme monomérique ou native ne présente pas une structure globulaire ni un état conformationnel en structures aléatoires ("*random coil*") (Williamson et Miranker, 2007).

Lors de l'élongation des fibrilles, les interactions intermoléculaires surviennent au fur et à mesure que les monomères, les protofibrilles et les petits oligomères s'ajoutent. Les monomères peuvent adopter une orientation parallèle ou antiparallèle. La conformation parallèle des monomères de l'hIAPP permet les interactions intermoléculaires antiparallèles

entre les brins β , et vice versa. Les différentes formes intermédiaires de l'hIAPP rencontrées pendant la cascade de la formation de l'amyloïde peuvent être modélisées par plusieurs conformations dépendamment du nombre de segments en feuillet β présents dans le monomère natif ou les formes intermédiaires. Un des modèles proposés est formé par les segments 32-37 et 24-29. Ces derniers constituent deux brins β antiparallèles qui seraient adjacents grâce à un tournant- β (" β -turn") à la position 31 (Asp31) (Higham et al., 2000b). Le segment 8-20 forme le troisième brin β avec un tournant- β à la position 20 (Ser20) (Higham et al., 2000b). La modélisation *in silico* a prédit deux angulations qui permettent la formation d'un feuillet β intramoléculaire. Une de ces angulations est constituée d'une boucle aux positions 17 et 19. Les acides aminés en position 22 (Asp22), 24 (Gly24), 26 (Ile26), 27 (Leu27) et 28 (Ser28) se retrouvent du côté externe du feuillet β plissé et peuvent participer aux interactions avec des molécules ou les protofilaments nécessaires pour l'assemblage des protofilaments en fibrilles. Une étude de mutagenèse a démontré l'abolition du feuillet plissé β par la substitution d'acides aminés dans la région 24-27 par une proline (Westermarck et al., 1990b; Moriarty et Raleigh, 1999). Il est à noter que la séquence observée chez le rat présente 3 prolines dans cette région. Ces substitutions empêchent la formation de ponts hydrogène inter/intramoléculaires. L'acide aminé 28 est situé dans la seconde angulation et la substitution par une proline affecte aussi la structure et abroge la conversion en fibrilles (Westermarck et al., 1990b; Moriarty et Raleigh, 1999).

Le pont disulfure formé par les acides aminés en position 2 et 7 ne permettrait pas à l'extrémité N-terminale de l'hIAPP de former une conformation en feuillet plissé β . Selon les prédictions d'un modèle informatique, l'extrémité N-terminale qui porte le pont disulfure ne participerait pas aux interactions impliquées dans une structure en feuillet plissé β (Sunde et al., 1997). Toutefois, le pont disulfure serait nécessaire à l'activité biologique de l'hIAPP (Roberts et al., 1989). Cette structure est conservée chez les différentes espèces animales. Par contre, il reste à déterminer si le pont disulfure demeure intact dans les différentes formes intermédiaires de l'hIAPP et les dépôts d'amyloïde. Entre autres, l'hIAPP synthétique, en absence de pont disulfure, est capable de former des fibrilles *in vitro*.

La structure secondaire de l'IAPP à l'état monomérique en milieu aqueux n'est pas compacte mais se retrouve sous une conformation en pelote statistique ou aléatoire. Les

protéines qui forment de l'amyloïde peuvent être sous deux classes structurelles différentes. Celles qui se replient en une structure globulaire compacte sans avoir subi une agrégation. Les protéines β 2-microglobuline et la transthyréine (TTR) sont des exemples de structure globulaire à l'état monomérique (Cao et al., 2013). La seconde classe est constituée de protéines qui se retrouvent dans un état natif et qui ne sont pas repliées. Les protéines A β et AIAPP sont des protéines qui se retrouvent non repliées dans un état natif (Cao et al., 2013). L'IAPP ne subit pas d'agrégation et n'adopte pas une structure globulaire. La structure de l'IAPP à l'état monomérique n'est pas complètement sous la forme de classique en conformation en pelote statistique ou aléatoire. Des expériences réalisées avec la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) en milieu aqueux ont démontré que la région englobant les résidues en position 5 à 20 dans la séquence de l'IAPP chez l'humain et le rat (rIAPP) est sous forme d'hélice avec un angle ϕ et Ψ . Le niveau de structure hélice dans un état persistant est faible (Williamson et al., 2007; Williamson et al., 2009).

Plusieurs autres modèles ont été proposés au cours de la dernière décennie. À partir des travaux effectués avec la résonance magnétique nucléaire (RMN) solide, une équipe de recherche a proposé une structure dimérique antiparallèle. Les segments impliqués dans la formation des brins sont à l'extrémité N-terminale (segment 8-17) et C-terminale (segment 28-37). Les acides aminés du segment 8-17 sont à l'extérieur du protofilament (Luca et al., 2007) (**Figure 10 A-B**). Un modèle du type " *β -serpentin*" avait été proposé précédemment à partir de travaux réalisés avec la résonance paramagnétique électronique (EPR) (Jayasinghe et al., 2004; Kajava et al., 2005). Ce modèle est constitué de 3 brins β formés à partir des segments 12-17, 22-27 et 31-37. Les études spectroscopiques se compliquent par l'usage de solutions. En effet, l'hIAPP étant très amyloïdogénique, il est presque impossible d'étudier la structure de la forme monomérique dans des conditions physiologiques. Un groupe de recherche a effectué des études avec la RMN en diminuant la température, le pH et la concentration d'IAPP en solution tamponnée (acétate de sodium). Cette étude a été effectuée pour suivre les changements de conformations en temps réel (Mishra et al., 2009). L'extrémité N-terminale de l'hIAPP (segment 1-17) est impliquée dans l'auto-association initiale (Mishra et al., 2009).

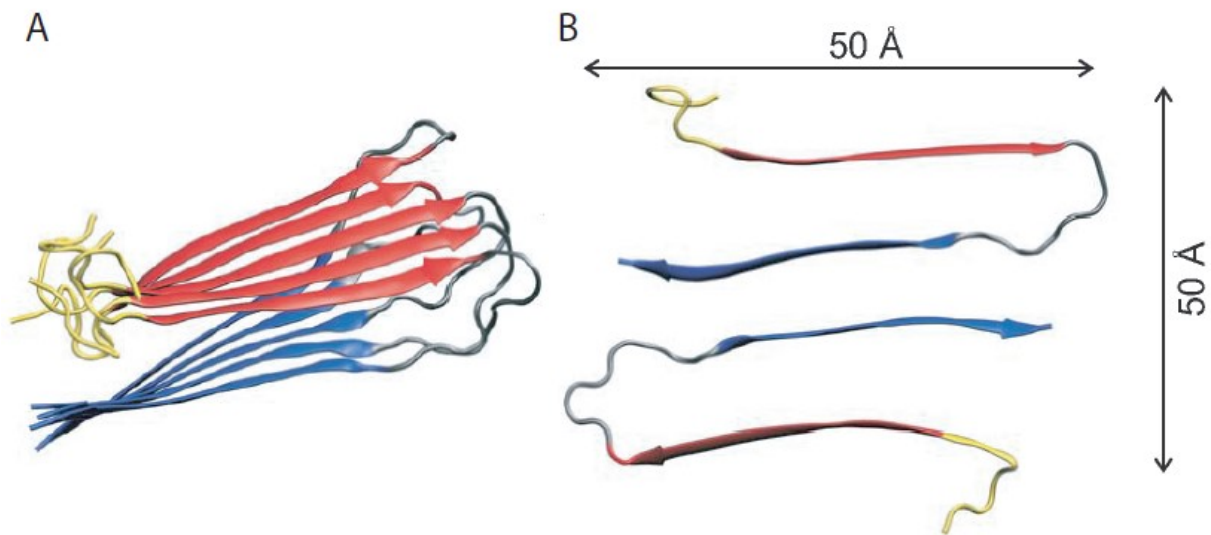


Figure 10 : Quelques modèles structuraux proposés dans la formation des fibrilles de l'hIAPP. A) Représentation d'une couche moléculaire d'un feuillet β croisée. Le segment N-terminal et C-terminal sont respectivement colorés en rouge et bleu. B) Vue en coupe transversale de 2 molécules d'hIAPP dans un protofilament. Adaptée de Luca et al., 2008.

Une autre étude effectuée avec la modélisation et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a permis d'identifier 3 différents conformères de l'hIAPP (Reddy et al., 2010). La première conformation est une hélice α , impliquant le segment 9-17, et les segments 24-28 et 31-35, repliés en feuillet plissé β antiparallèle. La deuxième conformation implique un " β -hairpin" antiparallèle avec un coude présent entre les acides aminés 20 et 23 (Reddy et al., 2010). La dernière est composée de structures aléatoires ("*random coil*") (Reddy et al., 2010) (**Figure 11 A-C**). Selon les calculs de simulations thermodynamiques effectués afin de prédire la stabilité de ces 3 conformations, la conformation la plus stable est le " β -hairpin" (Reddy et al., 2010). La conformation en pelote statistique ou aléatoire est la moins stable (Reddy et al., 2010). Il est possible qu'une conformation " β -hairpin" soit impliquée dans l'initiation de l'agrégation fibrillaire, suivie de la formation d'une hélice α , conformation proposée, entre autres, par l'équipe de Mishra et ses collaborateurs. Toutefois, des études supplémentaires seront importantes afin de déterminer les différents conformères et leur dynamique dans la formation de l'amyloïdose pancréatique.

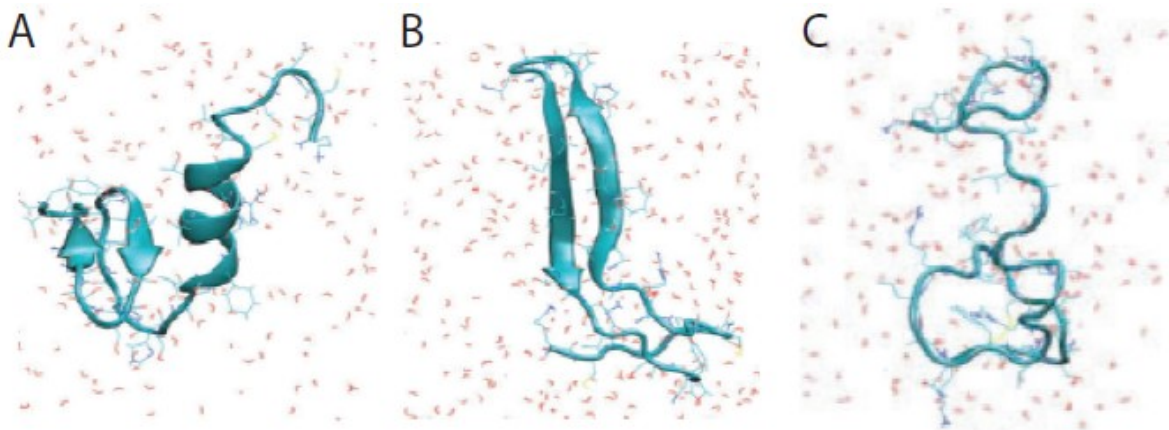


Figure 11 : Les modèles structuraux des différents conformères de l'hIAPP. A) Conformation en hélice α . B) Conformation " β -hairpin" antiparallèle. C) Conformation en pelote statistique ou aléatoire. Adaptée de Reddy et al., 2010.

L'IAPP forme une structure en hélice dans un milieu membranaire. Dans ce modèle membranaire chargé négativement, l'IAPP adopte structure en hélice de façon persistante (Knight et al., 2006; Nanga et al., 2008, 2009). Les études effectuées avec la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont permis de caractériser la conformation de l'IAPP et du peptide fragmenté en milieu membranaire (Nanga et al., 2009, 2008). L'hIAPP possède une structure avec un motif d'hélices cassées ("helix-kink-helix") dans les modèles membranaires et les hélices se retrouvent entre les acides aminés en position 5-17 et 20-27. Les études effectuées avec des fragments du peptide hIAPP et rIAPP ont soulevées des différences structurelles importantes. En présence de micelles, les fragments 1-19 de l'hIAPP et rIAPP ont une conformation similaire, soit en hélice α , mais ils se lient aux membranes micellaires avec une orientation différente (Nanga et al., 2008). Les deux fragments ont un seul acide aminé différent en position 18, soit une arginine (rhIAPP) et une histidine (hIAPP). Le fragment 1-19 de l'hIAPP s'insère profondément dans la couche hydrophobe de la membrane micellaire, tandis que celui de l'rIAPP se lie près de la surface. Une hypothèse pouvant expliquer cette orientation différente est la charge sur l'acide aminé en position 18. L'hIAPP₁₋₁₉ se lie près de la surface lorsque le pH du milieu est acide et que l'histidine se retrouve sous forme protonée (Brender et al., 2008; Nanga et al., 2008).

Les études effectuées avec la séquence en acide aminé complète de l'hIAPP et l'rIAPP ont démontré des similarités dans la portion N-terminale, mais des différences significatives

dans la portion C-terminale du peptide. La conformation en hélice α se retrouve dans la portion N-terminal pour les deux peptides (Nanga et al., 2008, 2009, 2011). La portion C-terminale de l'rIAPP est complètement sous une forme désordonnée, celle de l'hIAPP se retrouve partiellement sous une forme hélicale (Nanga et al., 2009, 2011). La différence est possiblement reliée aux trois prolines retrouvées dans la séquence peptidique du rat. Les interactions entre l'IAPP et les membranes ont un rôle important dans la formation de l'amyloïde et la toxicité cellulaire. Les vésicules anioniques, ainsi que d'autres modèles en milieu membranaire, favorisent la formation d'amyloïde hIAPP *in vitro* (Hebda et Miranker, 2009). Le mécanisme sous-jacent à l'agrégation de l'IAPP n'est pas complètement élucidé, mais les structures intermédiaires sous forme hélicale sont fort probablement impliquées (Hebda et Miranker, 2009; Knight et al., 2006).

1.2.5 Les modèles animaux transgéniques de l'amyloïdose pancréatique

Les modèles animaux de l'amyloïdose procurent une interface entre les scientifiques en recherche fondamentale, qui travaillent avec des modèles *in vitro*, et les cliniciens, qui traitent les patients. Les modèles *in vitro* permettent de valider des hypothèses et de générer de nouvelles conditions de laboratoire impliquant des systèmes aussi complexes que ceux constituant un organisme vivant. Les modèles animaux offrent aussi la possibilité d'investiguer les hypothèses générées systématiquement des observations sur les sujets provenant de la médecine humaine ou vétérinaire. Chaque investigation devra requérir de manière stratégique différents aspects ou caractéristiques d'un modèle animal en accord avec les intérêts particuliers du projet de recherche. Les modèles *in vivo* qui sont similaires biologiquement à l'humain sont dispendieux et apportent des réponses de façon plus lente (Harris, 2012). En contrepartie, les modèles dans les systèmes invertébrés sont utiles puisqu'ils sont moins dispendieux et offrent la possibilité de générer des résultats rapidement, nécessitant une analyse à débit élevée (Harris, 2012). Toutefois, ces modèles sont biologiquement moins proches des humains.

Dans la littérature scientifique, on note un intérêt particulier partagé par plusieurs investigateurs dans le domaine de l'amyloïde pour l'agrégation des protéines particulièrement impliquée dans les maladies dégénératives (Chiti et Dobson, 2006; Pepys, 2006). Il est

important de souligner que le vieillissement a une importance fondamentale dans la compréhension de ces désordres. Dans presque tous les cas, les traits caractéristiques cliniques des dépôts d'amyloïde apparaissent seulement ou deviennent augmentés sévèrement lorsque le patient vieillit (Dillin et Cohen, 2011; Partridge et Bates, 2011). Par conséquent, l'étude en laboratoire du vieillissement est essentielle afin d'avoir une compréhension complète de l'amyloïdose. Les expériences qui sont conduites en utilisant un organisme vivant sont beaucoup plus convaincantes que celles ayant recours à la culture cellulaire avec des lignées cellulaires qui possèdent un phénotype de vieillissement. Avantageusement, plusieurs mécanismes de base déterminant le vieillissement sont hautement conservés parmi les insectes, les rongeurs et les humains (Dillin et Cohen, 2011; Partridge et Bates, 2011).

La relation entre le diabète de type 2 et l'amyloïdose pancréatique est difficile à établir en médecine humaine puisque les biopsies pancréatiques ne sont pas éthiquement acceptables. Les modèles animaux qui développent spontanément l'amyloïdose pancréatique associée au diabète sont limités aux félins âgés et aux singes gardés en captivité (O'Brien et al., 1986; de Koning et al., 1993b). Ces modèles ont un syndrome diabétique qui est similaire au diabète de type 2 chez l'humain. La physiopathologie inclut l'impact du vieillissement, de l'obésité, de la tolérance au glucose, qui est compromise, et de la dépendance à l'insuline. Afin de régler ce problème, plusieurs colonies de souris transgéniques exprimant le gène pour l'hIAPP ont été conçues (Fox et al., 1993; Höppener et al., 1993; D'Alessio et al., 1994; Couce et al., 1996). Toutefois, ces souris transgéniques ne développent pas le diabète spontanément et les dépôts d'amyloïde se manifestent rarement (Höppener et al., 1993; Verchere et al., 1997). Les dépôts d'amyloïde et le diabète sont induits en créant un *background* d'obésité et une augmentation de la résistance à l'insuline par plusieurs stratégies, incluant une diète riche en gras, un traitement avec des stéroïdes ou hormones, ou la co-expression avec un gène d'obésité (Couce et al., 1996; Verchere et al., 1996; Soeller et al., 1998; Höppener et al., 1999). L'obésité est un facteur de risque pour le diabète de type 2 en médecine humaine, par contre, les souris transgéniques ne sont pas des modèles complets du diabète du type 2 et la progression du syndrome n'est pas identique.

Le développement de l'amyloïde chez les animaux transgéniques se base sur l'augmentation de la production de l'hIAPP, mais cette surexpression protéinique ne peut pas

être le seul facteur puisque l'amyloïdose pancréatique n'a pas été observée chez tous les premiers modèles murins transgéniques. De nombreuses études réalisées sur les animaux non transgéniques et l'humain ont démontré que la production de l'IAPP et de l'insuline changent en parallèle avec la réponse aux différents agents stimulant les cellules β et à différents stades du syndrome diabétique (Ludvik et al., 1991; Enoki et al., 1992; Kahn et al., 1998; MacNamara et al., 2000). La sécrétion des deux peptides est élevée en présence d'une augmentation de la résistance à l'insuline et une défaillance des cellules β des îlots pancréatiques. Dans ces modèles, l'expression de l'hIAPP est sous le contrôle du promoteur de l'insuline; il est donc régulé en parallèle avec l'insuline par l'hyperglycémie et les facteurs de transcription. Il est important de souligner que la région promotrice du gène de l'hIAPP est similaire à celle du gène de l'insuline sans toutefois être identique (German et al., 1992). Les gènes de l'hIAPP et de l'insuline ne sont pas toujours régulés de façon coordonnée en réponse au glucose (Novials et al., 1993; Gasa et al., 1997). Ceci suggère qu'il existe différents systèmes afin de réguler et de contrôler l'expression du gène de l'hIAPP et de l'insuline.

L'étude de l'influence de la surexpression de l'hIAPP peut s'effectuer avec les souris transgéniques (Höppener et al., 1993). L'expression de l'hIAPP est ciblée dans les cellules β des îlots pancréatiques. Malgré le fait que le gène de l'insuline est exprimé à un niveau beaucoup plus important que le gène de l'hIAPP, les tissus pancréatiques des souris transgéniques étaient complètement exempts de dépôts d'amyloïde. Un croisement homozygote, avec une souris agouti ou ob/ob ("obese mouse") a permis d'obtenir un niveau d'expression beaucoup plus élevé et d'observer les dépôts d'amyloïde (Janson et al., 1996; Höppener et al., 1999; Soeller et al., 1998). Les deux derniers modèles transgéniques possèdent une prédisposition génétique à développer une résistance à l'insuline et au diabète, due à une mutation dans le gène *Agrp* ("*Agouti-related peptide*") ou leptine. L'amyloïdose pancréatique est associée avec une perte allant jusqu'à la moitié de la masse des cellules β des îlots de Langerhans chez les souris hIAPP ob/ob, les félins, les singes et les humains diabétiques (Höppener et al., 2002). Les principaux modèles transgéniques sont présentés et résumés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Les principaux modèles transgéniques applicables à l'étude de l'amyloïdose pancréatique.

Espèce	Transgène/ <i>Background</i>	Phénotype métabolique	Pathologie des îlots
Souris	hIAPP (hémizygote)/FVB/N	Développe le diabète seulement lorsque traitée avec une hormone de croissance ou la dexaméthasone	1- Dépôts d'amyloïde intra et extracellulaire discrets 2- Évidence d'une dégénérescence des cellules β
	hIAPP (homozygote)/FVB/N	Développe une hyperglycémie et le diabète à l'âge de 10-14 semaines	1- Dépôts d'amyloïde discrets 2- Évidence d'une réduction de la masse des cellules β
	h-IAPP (hémizygote)/A ^{vy} /A	Développe progressivement le diabète à l'âge de 15 semaines pour les sujets obèses	1- Dépôts d'amyloïde extracellulaires très abondants 2- Réduction de la masse des cellules β (~80 %) 3- Augmentation de l'apoptose des cellules β (~ 10 X)
	hIAPP (hémizygote)/C57BL/6J	Ne développe pas spontanément le diabète mais la sécrétion d'insuline est détériorée	1- Aucun dépôt d'amyloïde extracellulaire 2- Présences de fibrilles à l'intérieur des granules (MET) 3- Aucun changement dans la masse des cellules β
	hIAPP (hémizygote)/C57BL/6J X DBA	Ne développe pas spontanément le diabète mais démontre une détérioration de la tolérance au glucose due à une réduction de la sécrétion de l'insuline	1- Dépôts d'amyloïde extracellulaires 2- Réduction de la masse des cellules β (~15 %)
	hIAPP (hémizygote)/ob/+	Développe spontanément le diabète et demeure dans un état hyperglycémique toute leur vie vs le modèle nontransgénique ob/ob	1- Présence de dépôts d'amyloïdes extracellulaires extensifs 2- Diminution de la masse des cellules β substantielles
	Rat	hIAPP (homozygote)/CD	Apparition soudaine du diabète vers 2 mois d'âge
hIAPP (hémizygote)/CD		Apparition graduelle du diabète vers 5 à 10 mois d'âges	1- Présence de dépôts d'amyloïdes extracellulaires extensifs 2- Réduction de la masse des cellules β (~50–80 %) 3- Augmentation de l'apoptose des cellules β (~ 10 X)
Mouche (<i>Drosophila melanogaster</i>)		hIAPP ou hproIAPP GA4 driver <i>elav</i> ^{C155} ,Gal4	Augmentation de l'expression de hIAPP et hproIAPP dans le système nerveux centrale à 5 jours d'âges 1- Formation d'agrégats fibrillaires congophiles dans le système nerveux 2- Présence de batonnets pentagonaux de 15,8 nm dans les tissus gras

Adapté de Matveyenko et Butler, 2006; Westermark et al., 2011.

Les modèles animaux transgéniques sont essentiels pour la progression des connaissances dans le domaine de l'amyloïdose puisque toutes les réponses ne peuvent pas toujours être obtenues facilement du matériel clinique ou seulement des expériences *in vitro*. L'investigation systématique de certains concepts (mort cellulaire, propagation, greffe tissulaire) nécessite l'utilisation d'un éventail de modèles animaux. Le choix judicieux d'un modèle animal pour une expérience particulière dépend de l'équilibre entre le pouvoir expérimental (favorisé par l'utilisation des invertébrés) versus les particularités anatomiques, physiologiques, orthologiques et génétiques (favorisé par l'utilisation de vertébrés). Souvent, la combinaison de plusieurs modèles permet de répondre à une panoplie de questions biologiques. Notamment, les modèles animaux transgéniques sont utiles pour évaluer l'efficacité des agents inhibiteurs de la formation d'amyloïde.

1.3 Les principaux agents inhibiteurs de l'amyloïdose

Les principes et les objectifs de traitement de l'amyloïdose consistent à abroger la production de l'amyloïde et de préserver la fonction des organes endommagés. Également, la thérapie vise à traiter la condition sous-jacente, comme les anomalies de la moelle osseuse et les processus inflammatoires, notamment l'arthrite rhumatoïde (Sipe et al., 2014). Même si plusieurs composés anti-amyloïdogéniques spécifiques sont en développement, une seule molécule a été introduite sur le marché pour usage clinique et sera abordée dans la section "un inhibiteur non phénolique commercialisé". Toutefois, les traitements disponibles pour les conditions variables qui accompagnent l'amyloïdose peuvent stabiliser ou améliorer la fonction d'un organe. Les dépôts d'amyloïde peuvent diminuer graduellement chez les patients qui répondent aux traitements de la condition sous-jacente ou de support. Ces traitements varient dépendamment du type d'amyloïde. Les patients atteints d'amyloïdose AL nécessitent la chimiothérapie (ex : melphalan), la corticothérapie (ex : prednisone) et l'autogreffe de moelle osseuse (Palladini et Merlini, 2009). Pour l'amyloïdose AA, les traitements consistent en l'éradication du foyer infectieux ou inflammatoire (Gorevic, 2013; Livneh et al., 1993). L'administration d'anti-inflammatoires ou de colchicine est indiquée dans les cas où la cause sous-jacente ne peut être éliminée (Livneh et al., 1993). Chez les patients souffrant d'ATTR, la stratégie utilisée afin d'enrayer la production de TTR chez les patients

portant des mutations responsables des changements de conformation structurelle est la transplantation d'un foie qui ne produira pas de TTR mutée (Herlenius et al., 2004). Pour les autres types d'amyloïde, incluant l'amyloïdose pancréatique, le développement de traitements anti-amyloïdogéniques reste à venir. La communauté scientifique déploie de grands efforts afin développer des nouveaux traitements qui seront disponibles en médecine humaine et vétérinaire.

Plusieurs approches sont utilisées afin d'abroger la formation d'amyloïde. Parmi celles-ci, quelques-unes sont en cours de développement et d'autres ont franchi l'étape des études cliniques (**Figure 12**). Une des stratégies consiste à réduire la quantité de la protéine native en diminuant son niveau d'expression. D'autres laboratoires de recherche visent à perturber les interactions que possèdent les protéines amyloïdogéniques avec leur environnement : les lipides, la matrice extracellulaire (peptidoglycanes) et les protéines chaperonnes. Ces cibles thérapeutiques potentielles sont en investigation. Les méthodes d'inhibition de la formation des dépôts fibrillaires les plus explorées par la communauté scientifique sont l'inhibition de l'assemblage des protéines en oligomères et en fibrilles, la stabilisation de la protéine native en une structure non-amyloïdogénique et, finalement, l'élimination des dépôts d'amyloïde au sein de l'organe atteint. Plusieurs inhibiteurs émergent de ces stratégies et se divisent ainsi en quatre catégories: les petites molécules inhibitrices, les peptides, les nanoparticules et l'immunothérapie.

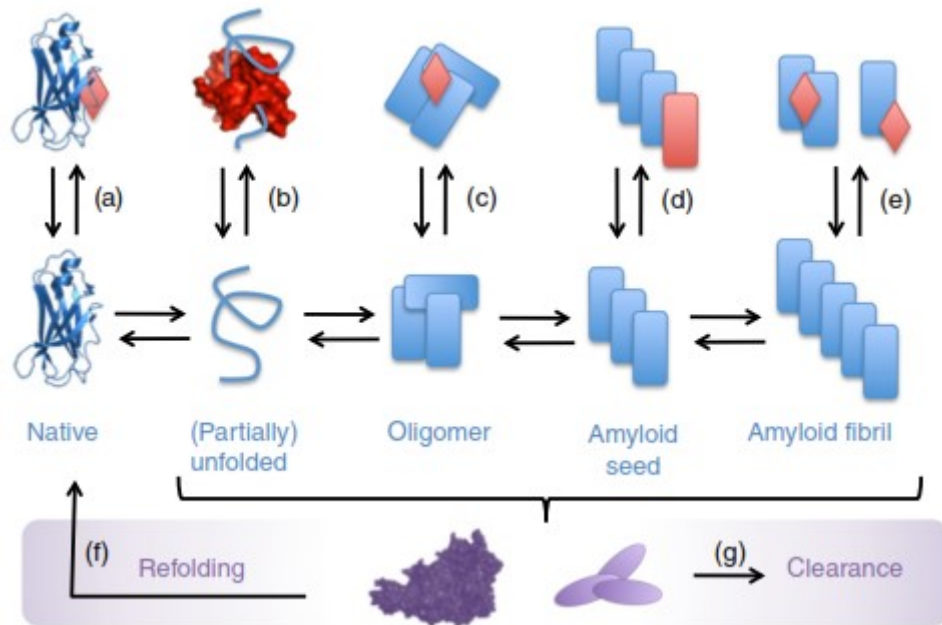


Figure 12 : Différentes stratégies afin de rompre le cycle de la formation d'une fibrille.

a) Stabiliser la forme native. b) Séquestrer le monomère. c) Stabiliser ou promouvoir les oligomères inoffensifs. d) Briser les feuillets β , empêchant ainsi l'élongation. e) Désassembler. f) Réassembler. g) Éliminer les conformations toxiques via chaperonne ou un anticorps. Tirée de Hard et Lendel, 2012.

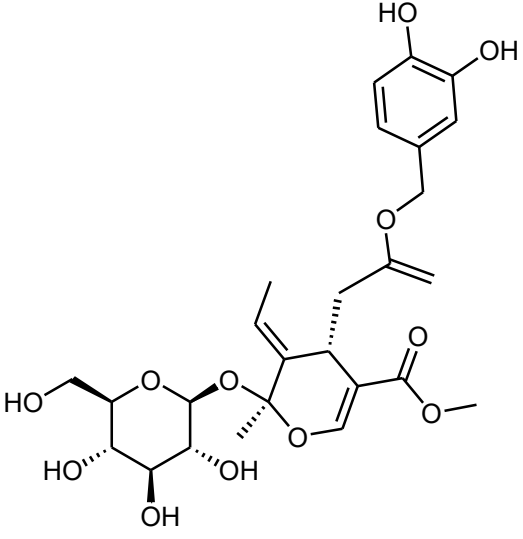
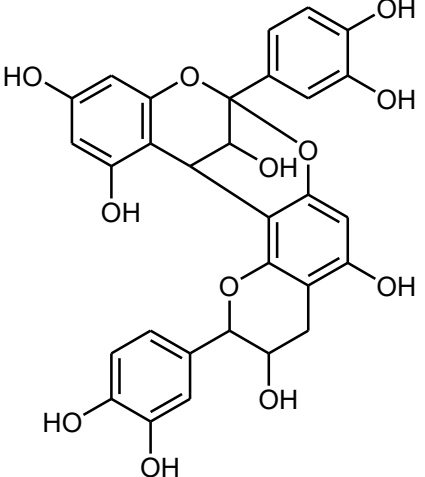
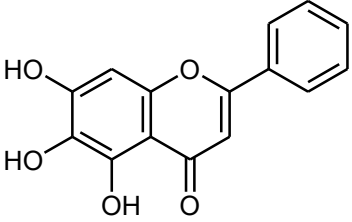
1.3.1 Les petites molécules inhibitrices de l'agrégation fibrillaire

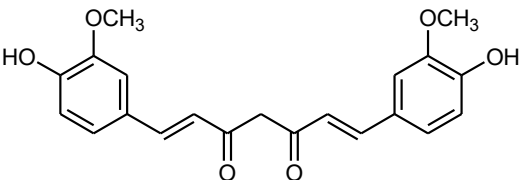
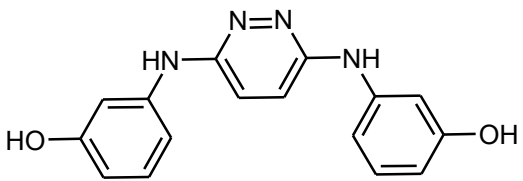
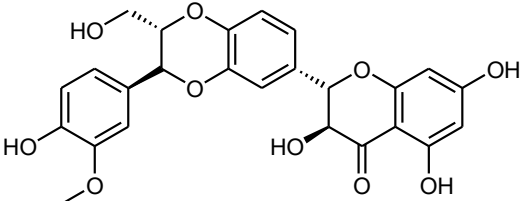
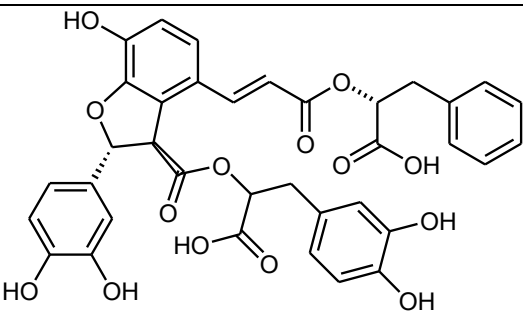
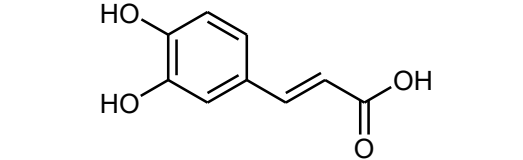
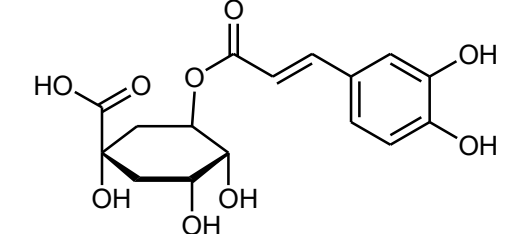
Les stratégies menant à la découverte et le développement de petites molécules qui possèdent la capacité de contrer l'assemblage des protéines en fibrilles se distinguent du développement d'un agent pharmacologique classique. Un inhibiteur classique est spécifique à une cible thérapeutique, telle qu'une enzyme (Porat et al., 2006; Buxbaum et al., 2012; Hard et Lendel, 2012; Cheng et al., 2013a). Le niveau de difficulté réside à mettre au point une molécule spécifique pour un type d'amyloïdose. Pourtant, de nombreuses molécules inhibitrices de l'agrégation des protéines émergent des études, mais les mécanismes d'action de ces dernières ne sont pas totalement élucidés. Le résultat engendré est donc la non-spécificité à un type d'amyloïde et cette propriété n'est pas désirée pour le développement et la mise en marché d'un médicament. À l'opposé, certains auteurs spécifient qu'un outil thérapeutique tout aussi valable peut résulter du développement d'agents anti-amyloïdogéniques à large spectre (Porat et al., 2006; Buxbaum et al., 2012; Hard et Lendel,

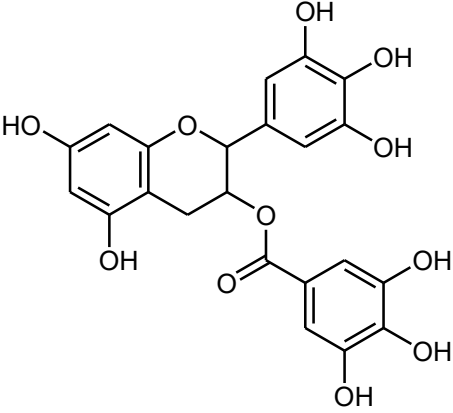
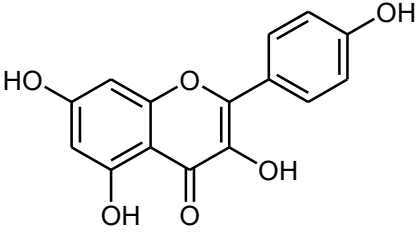
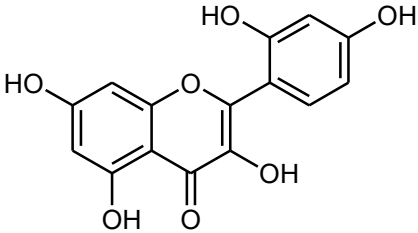
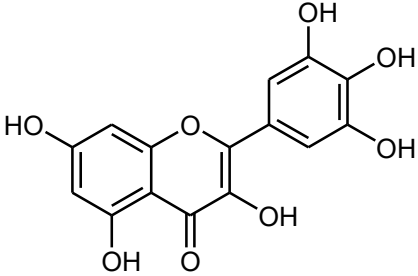
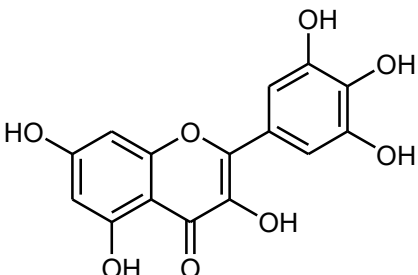
2012; Cheng et al., 2013a). Par contre, il faudra démontrer que ces agents ne causent pas de problèmes délétères en s'attaquant à certains types d'amyloïde fonctionnelle que l'on pourrait découvrir et rencontrer chez l'humain par le biais de futurs travaux de recherches. Le stockage de certaines protéines est un exemple d'une fonction utile que procure la formation d'amyloïde chez les bactéries (Porat et al., 2006; Buxbaum et al., 2012; Hard et Lendel, 2012; Cheng et al., 2013a).

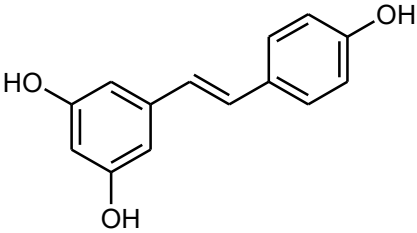
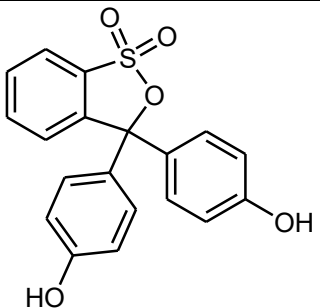
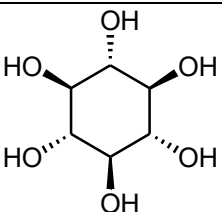
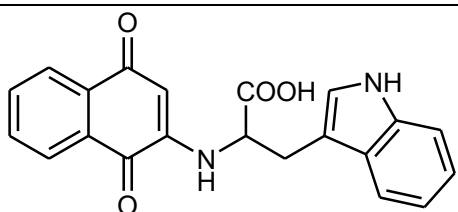
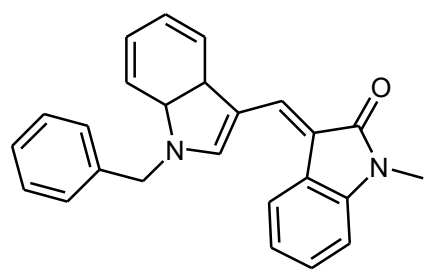
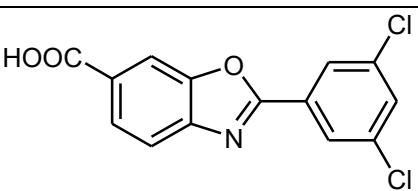
Le rouge Congo et la thioflavine T sont de petites molécules aromatiques inhibant la formation de l'amyloïde. Des expériences d'inhibition compétitive ont démontré que ces deux colorants interagissent avec l'amyloïde sur des sites différents afin d'inhiber la formation des agrégats fibrillaires (Porat et al., 2006; Buxbaum et al., 2012; Hard et Lendel, 2012; Cheng et al., 2013a). Plusieurs composés aromatiques ont donc été étudiés. Un inhibiteur d'un type précis d'amyloïde peut conserver son activité inhibitrice sur les autres types d'amyloïde alors que, dans certains cas, cette hypothèse n'est pas applicable. En fait, la complexité des processus de la formation de l'amyloïde a engendré une variété d'approches afin de cribler des molécules inhibitrices potentielles. La fluorométrie à la thioflavine T n'est pas suffisante afin d'effectuer un criblage, car il y a plusieurs faux positifs. Le dichroïsme circulaire et des essais sur la formation des oligomères, en plus de la microscopie électronique, sont nécessaires afin de constater une réduction de l'état fibrillaire ou l'inhibition des processus impliqués dans la formation des fibrilles (Porat et al., 2006; Buxbaum et al., 2012; Hard et Lendel, 2012; Cheng et al., 2013a). La bioinformatique, des essais mutationnels et la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont des outils essentiels afin de comprendre les relations structure-activité. À ce jour, les mécanismes qui expliquent la spécificité d'une molécule à l'amyloïde doivent être étudiés de façon plus approfondie. Quelques molécules qui sont devenues des prototypes pour l'inhibition de l'amyloïde ont émergé soit d'une découverte fortuite, d'un criblage de molécules ou des études de relation structure-activité (SAR). Le **Tableau 5** résume les principaux composés phénoliques et non phénoliques qui ont démontré une activité anti-amyloïdogénique (Porat et al., 2006; Buxbaum et al., 2012; Hard et Lendel, 2012; Cheng et al., 2013a).

Tableau 5 : Les principales molécules ayant démontrées un potentiel à inhiber l'agrégation fibrillaire d'une ou de plusieurs protéines.

Nom du composé	Structure moléculaire	Activité anti-amyloïdogénique	Référence
Oleuropéine		A β ₁₋₄₂ , IAPP	Kayed et al., 2007; Rigacci et al., 2010; Rigacci et al., 2011
Procyanide		IAPP	Jiao et al., 2013
Baicaléine		A β ₁₋₄₂ , α -syn	Gauci et al., 2011; Lu et al., 2011; Yin et al., 2011a; Zhu et al., 2004

Curcumine		$A\beta$, α -syn, IAPP, lysozyme, TTR	Daval et al., 2010; Feirreira et al., 2012ab; Ono et al., 2004; Pandey et al., 2008; Wang et al., 2009
RS-0406		$A\beta$	Nakagami et al., 2002; O'Hare et al., 2010; Walsh et al., 2005
Silibinine		$A\beta_{1-42}$, IAPP	Cheng et al. 2013a; Yin et al., 2011b
Acide salvianolique B		$A\beta_{1-42}$, IAPP	Cheng et al., 2013b; Tang et al., 2001
Acide caféique (CA)		IAPP	Cheng et al., 2011
Acide chlorogéni- que (CGA)		IAPP	Cheng et al., 2011

Épigallocatechine gallate (EGCG)		A β , α -syn, IAPP, insuline, prion	Bieschke et al., 2010; Ferreira et al., 2012ab; Meng et al., 2010; Porat et al., 2006; Sinha et al., 2012a
Kaempférol		A β ₁₋₄₀ , A β ₁₋₄₂	Ono et al., 2003
Morine		A β ₁₋₄₀ , A β ₁₋₄₂	Noor et al., 2012; Ono et al., 2003
Myrcétine		A β ₁₋₄₀ , A β ₁₋₄₂	Hamaguchi et al., 2009; Ono et al., 2003
Quercétine		A β ₁₋₄₀ , A β ₁₋₄₂	Ono et al., 2003

Resvératrol		$A\beta_{1-42}$, IAPP	Feng et al., 2009; Jiang et al., 2011, Ladiwala et al., 2010
Phénsulfone-phtaléine		IAPP, insuline	Levy-Sakin et al., 2009; Porat et al., 2004; Wu et al., 2006
Scyllo-inositol		$A\beta_{1-42}$	Hawkes et al., 2010; McLaurin et al., 2000; Sebastiani et al., 2006
NQTrp		$A\beta$, α -syn, IAPP, insuline, lysozyme	Scherzer-Attali et al., 2012ab
D737		$A\beta_{1-42}$	McKoy et al., 2012
Tafamidis (Vyndaquel®)		TTR	Bulawa et al., 2012; Lartigue et al., 2012; Said et al., 2012

1.3.1.1 Les agents de la classe polyphénolique

Les polyphénols possèdent des groupements hydroxyles retrouvés sur des noyaux aromatiques. Ces molécules ont été isolées des aliments, des épices, des herbes médicinales, du thé, du vin et du café. Les effets apportés par les polyphénols sont multiples, incluant des propriétés anti-oxydantes et des activités thérapeutiques générales : anticancéreuses, antibiotiques, antidiabétiques ou antivirales. Selon la théorie des interactions π - π intermoléculaires, les groupements polyphénols peuvent entrer en compétition avec les groupements phénoliques de l'amyloïde en s'intercalant entre les groupements aromatiques de la protéine amyloïdogénique pour abroger l'assemblage (Tjernberg et al., 1996; Gazit, 2002a, 2002b). Ces interactions sont d'ordre électrostatique (Porat et al., 2006; Hard et Lendel, 2012; Cheng et al., 2013a). Les phénols se lient aussi aux régions hydrophobiques de la protéine sans avoir recours aux ponts hydrogènes, qui sont plutôt des interactions hydrophiles (Hilbich et al., 1992; Sindelar et al., 1998; Sinha et al., 2012b).

Les polyphénols retrouvés dans certains fruits

L'oleuropéine se retrouve dans l'huile d'olive et diminue la toxicité des agrégats $A\beta_{1-42}$. De plus, cette molécule empêche le changement de la structure secondaire de la protéine native en feuillet β et diminue également l'oligomérisation (Kayed et al., 2007; Rigacci et al., 2011). L'exposition des régions hydrophobiques de la protéine $A\beta_{1-42}$ se retrouve réduite suite à un traitement avec l'oleuropéine (Kayed et al., 2007; Rigacci et al., 2011). Ce dernier retarde aussi la formation d'amyloïde IAPP et diminue sa cytotoxicité (Rigacci et al., 2010).

La procyanidine est un tanin présent dans certains fruits (pommes, raisins, baies, grenades) et le vin rouge. Ce composé inhibe la formation d'oligomères et affecte la structure secondaire de l'IAPP (Jiao et al., 2013). Les travaux réalisés sur des cultures cellulaires ont démontré la diminution de la cytotoxicité et des dommages membranaires causés par les agrégats d'amyloïde IAPP suite à un traitement avec la procyanidine (Jiao et al., 2013).

Les polyphénols provenant des plantes

La baicaléine est un flavonoïde retrouvé dans une herbe chinoise (*Scutellaria baicalensis*) qui a été aussi étudié pour inhiber la formation des fibrilles *in vitro*. Elle empêche la formation d'amyloïde à partir de la protéine α -syn en inhibant l'élongation et entraînant la

désagrégation des fibrilles matures (Zhu et al., 2004). L'oxydation de la baicaléine en quinine augmente son activité inhibitrice. De plus, ce composé prévient la perméabilisation des vésicules de lipide par les oligomères A β ₁₋₄₂ dans un système liposomique (Gauci et al., 2011). Également, la baicaléine empêche la toxicité de ces deux protéines fibrillaires sur des cultures cellulaires (Lu et al., 2011; Yin et al., 2011a).

La curcumine est isolée d'une plante herbacée rhizomateuse vivace, le curcuma. Cette molécule inhibe l'agrégation fibrillaire de plusieurs protéines : A β , α -syn, IAPP, lysozyme, et TTR (Ono et al., 2004; Pandey et al., 2008; Wang et al., 2009; Daval et al., 2010; Feirreira et al., 2012a, 2012b). La curcumine a été utilisée comme prototype pour des études SAR car sa structure chimique ressemble au rouge Congo. La présence d'un groupement aromatique terminal est essentielle afin d'inhiber l'agrégation de A β . De plus, différents groupements fonctionnels peuvent être joints sur le deuxième groupement aromatique et peuvent être importants pour obtenir une activité anti-amyloïdogénique. La longueur et la flexibilité stérique de la portion liante influencent les capacités inhibitrices des molécules. Cette portion doit contenir un groupement enone et un groupement insaturé qui sont situés avant chaque groupement aromatique. Des études de spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont décrit les interactions entre les groupements de type hydroxyle ou méthoxy de la curcumine et les acides aminés en positions 17-21 de la protéine A β (Masuda et al., 2011). Le RS-0406 est un composé apparenté à la curcumine qui a été trouvé à partir d'un criblage de plus de 110 000 composés. Cet agent, qui a démontré une forte inhibition de la fibrillation de la protéine A β , empêche la toxicité cellulaire *in vitro* puisqu'il en réduit l'oligomérisation (Nakagami et al., 2002). De plus, le RS-0406 ralentit les détériorations comportementales chez un modèle de rats (Sprague-Dawley) (Walsh et al., 2005; O'Hare et al., 2010).

La silibinine est un composé extrait du chardon-Marie (*Silybum marianum*). Ce composé inhibe la formation d'agrégats des protéines A β ₁₋₄₂ et de l'IAPP *in vitro* (Yin et al., 2011b; Cheng et al. 2013a). L'acide salvianolique B provenant des herbes chinoises de Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) a aussi démontré une activité inhibitrice pour les mêmes protéines (Tang et al., 2001; Cheng et al., 2013b).

Les polyphénols isolés du thé et du café

Les polyphénols qui proviennent du café, soit l'acide caféique (CA) et l'acide chlorogénique (CGA), sont des inhibiteurs de la formation de l'amyloïde IAPP. Ils sont très efficaces pour retarder les conformations transitoires, comme les oligomères, qui mènent à la formation des fibrilles (Cheng et al., 2011). Ils affectent la structure secondaire de l'IAPP et préviennent la toxicité cellulaire *in vitro* (Cheng et al., 2011). Toutefois, ces composés ont un effet opposé sur un autre type d'amyloïde associé aux lysozymes puisqu'ils accélèrent la formation des fibrilles au niveau des lysozymes (Porat et al., 2006; Hard et Lendel, 2012; Cheng et al., 2013a).

L'épigallocatechine gallate (EGCG) provient des extraits du thé. Des études *in vitro* ont démontré une activité anti-amyloïdogéniques pour les protéines A β , α -syn, prion, insuline et IAPP (Porat et al., 2006; Bieschke et al., 2010; Meng et al., 2010; Ferreira et al., 2012a, 2012b; Sinha et al., 2012a). Ce composé a aussi été étudié afin d'élucider les groupements importants pour son activité anti-amyloïdogénique. L'isomère de l'EGCG, soit le GCG, conserve les propriétés inhibitrices de la formation d'amyloïde. Lorsque le groupement ester de gallate (EGC) et un hydroxyle du noyau aromatique sont retirés de l'EGCG (structure moléculaire de l'EGCG présentée dans le **Tableau 5**), il n'y a pas d'inhibition de la formation de l'amyloïde selon les tests *in vitro* (fluorométrie, microscopie électronique). L'absence de l'un de ces deux groupements provoque une perte d'activité partielle sur l'inhibition de l'agrégation des fibrilles. Les groupements phénoliques de l'EGCG interagissent avec les chaînes hydrophobiques de la protéine A β (Phe, Met, Ile) (Liu et al., 2011). L'EGCG se lie à la protéine native et provoque la formation d'oligomères non toxiques pour les protéines A β et α -syn. Dans quelques études *in vivo*, l'EGCG a diminué les pertes cognitives dues aux plaques d'amyloïde. L'EGCG traverse la barrière hémato-encéphalique puisque la molécule radiomarquée a été détectée dans le cerveau après l'administration *per os* à des souris (Nakagawa et al., 1997; Adachi et al., 2006).

Les polyphénols extraits du vin

Les composés qui ont été isolés du vin, soit le kaempférol, la morine, la myricétine et la quercétine possèdent une activité anti-amyloïdogénique pour la protéine A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ *in*

vitro (Ono et al., 2003). Parmi ces molécules, seulement la morine empêche la formation des fibrilles pour la protéine IAPP (Noor et al., 2012). La catéchine et l'épicatéchine proviennent aussi du vin, mais leur potentiel anti-amyloïdogénique envers la protéine A β est plus faible comparativement aux autres composés. La myricétine est le composé le plus efficace d'entre eux au niveau des expériences *in vitro* (Hamaguchi et al., 2009; Ono et al., 2012). Il inhibe aussi l'assemblage de la protéine tau en fibrilles et diminue les oligomères de l'A β dans le cerveau d'un modèle de souris souffrant d'Alzheimer (Tg2576) (Hamaguchi et al., 2009). Une autre molécule dérivée du vin est le resvératrol. Ce dernier inhibe la formation de fibrilles de la protéine A β_{1-42} sans affecter l'oligomérisation (Feng et al., 2009). Le resvératrol abroge aussi la formation des fibrilles de la protéine IAPP ainsi que les intermédiaires fibrillaires et les oligomères solubles (Ladiwala et al., 2010; Jiang et al., 2011).

Un polyphénol indicateur de pH

Le phénolsulfonephtaléine (rouge de phénol) est un colorant utilisé pour indiquer le pH dans les milieux de culture cellulaire. Ce dernier empêche la formation des fibrilles pour la protéine IAPP et diminue la cytotoxicité *in vitro* sur des cellules β des îlots pancréatiques provenant du rat (Porat et al., 2004). Le rouge de phénol interagit avec les oligomères de l'hexapeptide NFGAIL de l'IAPP par des contacts hydrophobiques avec les acides aminés Phe, Leu et Ile (Wu et al., 2006). Aussi, ce dernier entrave la transformation de l'insuline en amyloïde en diminuant l'assemblage fibrillaire (Levy-Sakin et al., 2009).

1.3.1.2 Les agents de la classe non phénolique

Plusieurs des composés non phénoliques se retrouvent dans la famille des alcaloïdes, flavonoïdes, glycosides et phénazines. La majorité d'entre eux possèdent des groupements aromatiques qui peuvent contribuer à l'activité inhibitrice de l'agrégation fibrillaire grâce aux interactions π - π intermoléculaires.

Les dérivés inositols

Une étude SAR a été réalisée avec les composés de type inositols (structure moléculaire du scyllo-inositol présentée dans le **Tableau 5**). L'influence de la position des groupements hydroxyles sur le potentiel d'inhibition de l'agrégation de l'A β_{1-42} a été analysée

par l'utilisation de quelques stéréoisomères. L'analyse a démontré qu'il est essentiel que la molécule porte des groupements hydroxyles de même orientation spatiale sur le cycle inositol aux positions 1, 3, 5 ou 2, 4 et 6 (ex : scyllo-inositol) (McLaurin et al., 2000; Hawkes et al., 2010). La présence de groupements hydroxyles ou un groupement donneur d'électron est probablement un facteur important à l'activité inhibitrice (McLaurin et al., 2000; Hawkes et al., 2010). L'ajout de deux groupements méthoxy à la molécule scyllo-inositol permet une augmentation de l'hydrophobicité tout en conservant l'activité inhibitrice (McLaurin et al., 2000; Hawkes et al., 2010). Dans un modèle de souris TgCRND8 qui possède des plaques d'amyloïde, le scyllo-inositol a permis de diminuer les plaques et d'atténuer les pertes de la mémoire spatiale (Sebastiani et al., 2006). Tous ces composés stéréoisomères traversent la barrière hémato-encéphalique (Spector, 1988).

Les dérivés du tryptophane et de la naphtoquinone

Le NQTrp et le Cl-NQTrp sont deux molécules qui contiennent un groupement tryptophane et naphtoquinone. Ces composés inhibent la formation d'amyloïde *in vitro* des protéines suivantes : l'A β , l' α -syn, l'IAPP, le lysozyme et l'insuline (Scherzer-Attali et al., 2012a). Dans un modèle transgénique de la drosophile qui surexprime la protéine A β , les deux composés ont amélioré l'activité locomotrice ainsi que la survie. Ce résultat peut être expliqué par la diminution de la formation des plaques d'amyloïdes dans le cerveau de la drosophile (Scherzer-Attali et al., 2012b).

Le D737 est un composé qui résulte d'un criblage moléculaire de plus de 60 000 molécules (structure moléculaire présentée dans le **Tableau 5**) (McKoy et al., 2012). Ce composé a aussi démontré des résultats prometteurs dans le modèle de la drosophile (McKoy et al., 2012). Le D737 possède la plus grande efficacité inhibitrice pour l'agrégation de l'A β ₁₋₄₂ et permet une réduction de la cytotoxicité des fibrilles (McKoy et al., 2012). Les études ont confirmé une réduction des oligomères toxiques (McKoy et al., 2012).

Un inhibiteur non phénolique commercialisé

Le tafamidis (Vyndaquel®) est la première molécule commercialisée par la compagnie Pfizer avec l'indication de traiter la polyneuropathie amyloïde à transthyréine (TTR-FAP) (structure moléculaire présentée dans le **Tableau 5**) (Bulawa et al., 2012; Lartigue et al., 2012;

Said et al., 2012). Elle est disponible en Europe et son usage permet de stabiliser la forme native de la TTR, entravant ainsi la formation fibrillaire (Bulawa et al., 2012; Lartigue et al., 2012; Said et al., 2012).

1.3.2 Les inhibiteurs peptidiques

Le développement d'inhibiteurs anti-amyloïdogéniques de type peptidique a suscité un vif intérêt par différents laboratoires de recherche. De ces efforts de synthèse et de criblage sur les différentes protéines amyloïdogéniques se distinguent trois types d'inhibiteur peptidique. Il y a donc les peptides qui reconnaissent un fragment identique, des peptides *N*-méthylés, et les autres, qui sont conceptualisés à partir d'un modèle *in silico*.

Certains groupes de recherche se basent sur l'utilisation de fragments identiques à celui de la protéine amyloïdogénique, permettant ainsi la reconnaissance de cette région et la liaison avec un feuillet β , ce qui désorganise la structure fibrillaire. Le peptide brise les feuillets β et, par conséquent, inhibe la formation de l'amyloïde. La séquence qui est importante pour la formation de l'amyloïde est celle qui est utilisée afin de développer le peptide. Pour l'A β et l'IAPP, les régions 25-35 et 20-29 sont impliquées, respectivement (Pike et al., 1995; Zhang et al., 2011). Un exemple de cette application est le développement des petits peptides hydrophobiques qui contiennent le motif LVFFA à caractère hydrophobe de la région centrale de la protéine A β (Wood et al., 1995). Certains de ces peptides contiennent des prolines puisque ces dernières empêchent l'agrégation (Wood et al., 1995). Le peptide iA β 1 (RDLPPFPVPID) inhibe la formation de l'amyloïde et provoque la désagrégation des fibrilles A β ₄₀ et A β ₄₂ *in vitro*. Un autre peptide, soit le iA β 5 qui possède une séquence LPFFD, empêche l'action toxique des fibrilles sur une culture cellulaire nerveuse (Soto et al., 1998). Ce dernier réduit la formation de plaques d'amyloïde au niveau des cerveaux de souris. De plus, cette même stratégie utilisée afin de bloquer l'agrégation fibrillaire par des peptides partiellement complémentaires s'applique aussi pour la protéine du prion (PrP), l' α -syn et l'IAPP (Chabry et al., 1998; El-Agnaf et al., 2004; Porat et al., 2004; Gibson et al., 2006). Pour l'IAPP, les fragments SNNFGA et GAILSST sont des inhibiteurs de l'agrégation fibrillaire (Tatarek-Nossol et al., 2005).

D'autres stratégies ont été développées parce que certains inhibiteurs qui contiennent un fragment à potentiel amyloïdogénique peuvent eux-mêmes former des fibrilles dans certains cas. Une autre méthode d'inhibition des structures fibrillaires consiste à empêcher l'extension des fibrilles en entravant les liaisons hydrogène intermoléculaires qui contribuent à solidifier la charpente des fibrilles. L'ajout d'acides aminés contenant un groupement *N*-méthyle provoque des contraintes stériques pour la formation de l'amyloïde (Kapurniotu et al., 2002). Il y a alors formation d'un "capuchon" sur le feuillet β de l'amyloïde avec une surface méthylée qui empêche l'élongation. La méthylation de ces peptides entraîne une amélioration de leur solubilité en milieu aqueux (Sciaretta et al., 2006). L'ajout de ce groupement apporte un potentiel à pénétrer et diffuser à travers les membranes cellulaires (Gordon et al., 2002). Le peptide KLVFF, mentionné précédemment, est un exemple d'un peptide qui, lorsque *N*-méthylé (séquence : D-[(chGly)-(Tyr)-(chGly)-(chGly)-(mLeu)]-NH₂), abroge la formation de l'amyloïde A β et réduit aussi la cytotoxicité des fibrilles (Kokkoni et al., 2006). Le peptide IAPP-GI possède la même séquence que l'IAPP, mais avec une méthylation au niveau de la glycine (G24) et de l'isoleucine (I26) (Yan et al., 2006). Ce peptide se lie à l'IAPP, diminue la cytotoxicité et provoque la désagrégation des fibrilles. Des inhibiteurs de type peptidique ont aussi été développés de cette façon pour la protéine native α -syn (Bodles et al., 2004; Madine et al., 2008).

Une meilleure connaissance de la structure fibrillaire de chaque type d'amyloïdose apporte un raffinement sur la mise au point d'inhibiteurs à base de petits peptides. En effet, la charpente de la structure fibrillaire se forme comme une fermeture éclair. Cette dernière est constituée d'une interdigitation très serrée des chaînes et des faces que constituent les feuillets β . Des peptides compatibles avec un côté et incompatible avec l'autre côté du feuillet β viennent donc entraver la propagation d'une structure fibrillaire. Ces peptides forment aussi un "capuchon" qui empêche la fermeture éclair de se refermer (Sievers et al., 2011). En d'autres termes, ces peptides inhibent l'élongation des fibrilles. En utilisant cette approche, des inhibiteurs ont été développés en ayant recours à la bioinformatique via l'utilisation d'un modèle structural des fibrilles en trois dimensions. Le processus a donc été optimisé par le logiciel "Rosetta" (© RosettaCommons.org 2015) qui permet de prédire la structure de la protéine ainsi que les interactions possibles entre la protéine et l'inhibiteur (Kuhlman et al.,

2003; Leaver-Fay et al., 2011). Un représentant de cette catégorie de peptides a été conçu à partir du fragment VQIVYK qui se retrouve en position 306-311 de la protéine tau. L'hexapeptide TLKIVW, en se liant aux fragments VQIVYK de la protéine tau, engendre un encombrement stérique qui empêche la propagation de la structure fibrillaire (Goldschmidt et al., 2010).

1.3.3 L'immunothérapie

L'usage d'anticorps dirigés contre une protéine fibrillaire est prometteur comme thérapie anti-amyloïde. Quelques immunothérapies ciblant la protéine A β sont présentement en phase clinique après avoir démontré un fort potentiel anti-amyloïdogénique *in vitro* et *in vivo*. Il y a trois mécanismes d'action proposés en ce qui concerne l'activité d'un anticorps contre l'amyloïde A β . Une première hypothèse considère que l'anticorps se lie au monomère présent dans la circulation sanguine ce qui permet de briser l'équilibre et le transport de l'A β vers la barrière hémato-encéphalique. Un second mode d'action suggéré implique la phagocytose des plaques d'amyloïde via le récepteur Fc des cellules microgliales suite à la reconnaissance de l'anticorps à région N-terminale de l'A β (Bard et al., 2000; Bard et al., 2003). Un anticorps développé à partir d'un modèle murin et de l'A β 43 a permis de prévenir l'apparition des plaques d'amyloïde chez les jeunes animaux et permet d'améliorer les changements neuropathologiques chez les plus âgés. Un des points négatifs de ce type d'anticorps est la pauvre sélectivité puisque ce dernier reconnaît un regroupement de charge négative sur la surface de l'amyloïde et, ainsi, un même anticorps peut se lier aux autres types d'amyloïdes (Caruana et al., 2011; Gauci et al., 2011). Il est à noter que des anticorps produits chez l'humain dirigés contre l'amyloïde de façon non spécifique ont été isolés du sérum. Ces anticorps endogènes ciblent entre autres les amyloïdes suivantes : l'A β , la SAA, l'AA, la TTR, et L'IAPP (Geylis et al., 2005; Rosenmann et al., 2006; Papachroni et al., 2007; Neff et al., 2008; O'Nuallain et al., 2008; Lindhagen-Persson et al., 2010; O'Nuallain et al., 2010; Yanamandra et al., 2011).

Le développement d'anticorps plus spécifiques contre des dépôts d'amyloïde implique la reconnaissance de la conformation des épitopes sur les oligomères et les protofibrilles annulaires. Certains anticorps reconnaissent les oligomères de façon spécifique et réduisent

ainsi leur toxicité. C'est le cas de l'anti-A β , qui a été conçue à partir de la protéine A β possédant une mutation (E22G). Cette reconnaissance spécifique peut être possiblement explicable par la théorie de l'avidité (Englund et al., 2007; Sandberg et al., 2010). Des anticorps endogènes qui reconnaissent les formes monomériques et qui sont un peu plus sélectifs comme l'A β , le PrP et l' α -syn, ont aussi été trouvés chez l'espèce humaine (Geylis et al., 2005; Rosenmann et al., 2006; Papachroni et al., 2007; Neff et al., 2008; O'Nuallain et al., 2008; Lindhagen-Persson et al., 2010; O'Nuallain et al., 2010; Yanamandra et al., 2011). L'origine et la fonction de ces derniers ne sont pas comprises à ce jour. De nombreuses études sont en cours en ce qui concerne les immunothérapies qui se dirigent contre d'autres types d'amyloïde. Des anticorps qui reconnaissent la protéine PrP^c et/ou PrP^{sc} ont démontré des résultats positifs sur culture cellulaire et dans un modèle *in vivo* (Heppner et al., 2001; Peretz et al., 2001; White et al., 2003; Feraudet et al., 2005). Des approches similaires sont aussi développées pour la protéine α -syn, huntingtine et tau (Khoshnan et al., 2002; Lecerf et al., 2001; Murphy et al., 2004; Wolfgang et al., 2005; Asuni et al., 2007; Emadi et al., 2007; Lynch et al., 2008; Sigurdsson et al., 2008; Boimel et al., 2010).

En ce qui concerne les principes de l'utilisation de l'immunothérapie dans le contexte de l'amyloïdose, la protéine reconnue par l'anticorps ne doit pas être nécessairement l'agrégat d'amyloïde impliqué. À titre d'exemple, pour l'amyloïde de forme sanguine, l'amyloïde sérique A (SAA), un anticorps a été conçu contre la "serum amyloid protein" (SAP) qui est une protéine qui interagit avec la SAA pour former des dépôts d'amyloïde. Dans un modèle de souris, l'élimination de l'amyloïde a été effectuée par la phagocytose suite à un traitement avec l'anticorps (Bodin et al., 2010; Gillmore et al., 2010; Pepys et al., 2002).

1.3.4 Les nanoparticules

Les nanomatériaux sont utilisés en recherche biomédicale et en médecine dans différentes sphères comme l'imagerie de résonance magnétique, le transport des médicaments, le développement de nouveaux vaccins ou comme traitement antibactérien. Il n'est pas étonnant que les laboratoires de recherche aient effectué des essais d'inhibition de la formation des fibrilles à l'aide des nanoparticules. Généralement, l'exposition d'une protéine à une nanoparticule entraîne l'adsorption de sa structure moléculaire (chimique) à la surface de la

nanoparticule. Une augmentation de la concentration locale de la protéine sur cette nanoparticule ou un changement dans la conformation de la protéine provoqué par l'interaction avec la nanoparticule peut promouvoir l'agrégation fibrillaire (Gazit, 2002a, 2002b; Giacomelli et Norde, 2003; Giacomelli et Norde, 2005; Stefani et al., 2007; Rocha et al., 2008; Mahmoudi et al., 2011; Shemetov et al., 2012). À l'opposé, le fait de capturer à l'aide des nanoparticules les oligomères qui surviennent en amont de la cascade de la formation des fibrilles peut entraver la formation d'agrégats (Gazit, 2002a, 2002b; Giacomelli et Norde, 2003; Giacomelli et Norde, 2005; Rocha et al., 2008; Cabaleiro-Lago et al., 2012). Plusieurs laboratoires de recherche se concentrent à étudier les effets spécifiques des nanoparticules sur la formation de l'amyloïde.

Récemment, des nanoparticules de type *N*-isopropylacrylamide:*N*-*tert*-butylacrylamide (NiPAM:BAM) ont été employées afin d'augmenter le temps requis pour la formation de fibrilles du peptide IAPP₂₀₋₂₉ (Cabaleiro-Lago et al., 2010). Lorsque l'IAPP₂₀₋₂₉ est en solution avec les nanoparticules, il est adsorbé à la surface due aux liens hydrogènes et aux interactions hydrophobiques (Cabaleiro-Lago et al., 2010). De plus, il y a moins d'interactions entre les peptides puisqu'ils se retrouvent en moindre quantité en solution libre et il en résulte d'une plus faible quantité de fibrilles (Cabaleiro-Lago et al., 2010). D'autres nanomatériaux ont aussi fait l'objet d'études sur l'inhibition de la formation de fibrilles. Les nanoparticules de carbone, soit par exemple en graphène, ont démontré la prévention de la formation de feuillet β pour le peptide IAPP₂₂₋₂₈ (Guo et al., 2013). Dans ces deux exemples de nanoparticules, les interactions d'adsorption l'emportent sur celles qui surviennent entre les peptides provoquant ainsi l'inhibition de la formation de l'amyloïde.

Afin de mieux exploiter le potentiel clinique de cette nouvelle technologie, la stabilité chimique des nanoparticules, leur taille, ainsi que les mécanismes de dégradation devront être étudiés en profondeur dans des modèles *in vivo*. Les risques de toxicité au sein de l'organisme vivant dans une perspective de traitement à long terme sont inconnus à ce jour. L'application des nanoparticules au niveau de l'inhibition de l'amyloïdogénicité est grandement prometteuse. Comparativement aux autres approches, les nanoparticules devront faire l'objet d'une évaluation extensive afin de connaître leur pharmacocinétique, pharmacodynamie et innocuité dans ce type d'application. Bien que plusieurs efforts aient été déployés pour le

traitement de différents types d'amyloïdose, de nouvelles entités thérapeutiques (molécules, peptides, anticorps, nanoparticules) sont nécessaires afin d'augmenter l'arsenal thérapeutique dans l'optique d'augmenter l'efficacité et la biodisponibilité.

Chapitre II

2. Hypothèses et objectifs du projet de recherche

2.1 Hypothèses soutenant le projet de recherche

La formation d'amyloïdose pancréatique est un problème associé au diabète de type 2 en médecine humaine et au diabète mellitus en médecine vétérinaire. Au cours de la dernière décennie, des efforts massifs en recherche et développement ont été déployés afin de mieux comprendre la physiopathologie et de trouver des thérapies pharmacologiques applicables à l'amyloïdose pancréatique. Les travaux qui émergent du développement d'agents anti-amyloïdogéniques sont complémentaires aux travaux de recherches qui visent à détailler les mécanismes physiopathologiques. Ils contribuent également à mieux comprendre les mécanismes qui sont impliqués dans le processus de la formation de l'amyloïde. De nouvelles stratégies de traitement ont fait leur apparition afin d'entraver la formation des agrégats fibrillaires. La disponibilité des structures détaillées des différents agrégats offrira l'opportunité future d'adopter une approche beaucoup plus standard qui s'apparente à celle du développement classique d'un inhibiteur. De plus, le mécanisme de la formation fibrillaire étant très complexe, il ne s'agit pas seulement de stabiliser la structure de la protéine d'origine ou les oligomères, mais d'empêcher les interactions avec les peptidoglycanes de la matrice extra-cellulaire, les membranes cellulaires ou les protéines qui se lient à l'amyloïde. De nouvelles technologies biochimiques et physicochimiques permettent l'utilisation de petits peptides et de l'immunothérapie. Ces approches moléculaires bien pensées permettent respectivement de former un "capuchon" sur la fibrille, de modifier la conformation de la protéine ou de piéger le monomère fibrillaire (Porat et al., 2006; Hard et Lendel, 2012; Cheng et al., 2013a). Certains de ces outils pharmacothérapeutiques préliminaires semblent démontrer une efficacité dans les modèles *in vitro* et dans certains cas, *in vivo* (Porat et al., 2006; Hard et Lendel, 2012; Cheng et al., 2013a). Quelques agents sont actuellement en étude clinique afin de démontrer leur efficacité et leur applicabilité dans la médecine thérapeutique (Porat et al., 2006; Hard et Lendel, 2012; Cheng et al., 2013a). Toutefois, l'exploration de

différents outils moléculaires demeure essentielle afin d'augmenter les connaissances physiopathologiques sur l'amyloïdose pancréatique et de déterminer certains éléments des relations structure-activité régissant l'activité anti-amyloïdogénique requise pour abroger les dépôts d'amyloïde pancréatique.

Les hypothèses du projet sont que certaines variations critiques présentes dans les séquences peptidiques de l'IAPP provenant de différentes espèces animales sont impliquées, en partie, dans la formation de fibrilles et que plusieurs composés chimiques aromatiques/phénoliques sont capables d'abroger la formation de dépôts d'amyloïde.

De nos constats, les deux avenues de recherche suivantes émergent :

1) L'étude d'une variété d'isoformes de l'IAPP provenant de différentes espèces animales et leur propension à former des dépôts d'amyloïde;

2) L'étude des relations structure-activité de diverses classes pharmacologiques dans le but d'abroger la formation d'amyloïde pancréatique.

2.2 Objectifs du projet de recherche

L'objectif principal du projet de recherche consiste à apporter de nouveaux outils moléculaires afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la formation de l'amyloïdose pancréatique. Il implique le développement et la validation de nouvelles approches thérapeutiques *in vitro* de l'amyloïdose pancréatique. Les objectifs spécifiques sont présentés en deux sections.

Objectif 1 : Séquencer le gène de l'IAPP chez plusieurs espèces animales, évaluer le potentiel d'amyloïdogénicité des isoformes et identifier les variations en acides aminés critiques pour la formation de l'amyloïde pancréatiques.

La formation de fibrilles dans le pancréas contribue à la pathogénèse du diabète mellitus chez les humains, les félins et les macaques (Westermarck et al., 2011). Le gène de l'IAPP a été isolé et séquencé chez plusieurs espèces animales, notamment le cougar (*Felis concolor*), la vache (*Bos taurus*), le poulet (*Gallus gallus*), le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*), le hamster (*Mesocricetus auratus*), le furet (*Mustela putorius*), la souris (*Mus musculus*), le lapin (*Oryctolagus cuniculus*), le raton laveur (*Procyon lotor*) et le rat (*Rattus norvegicus*)

(Johnson et al., 1991; Fan et al., 1994; Jordan et al., 1994; Yoshikawa et al., 1999; Paulsson et al., 2011; Westermark et al., 2011). Les dépôts d'amyloïde ont été observés dans les îlots de Langerhans chez les humains, les primates non humains, les félins et les grands félins (Johnson et al., 1991; Westermark et al., 2011). Néanmoins, les dépôts d'amyloïde n'ont pas été rapportés chez toutes les espèces animales et l'implication des agrégats fibrillaires dans la pathogénèse du diabète mellitus est variable dans le règne animal. Le dépôt d'amyloïde pancréatique a été rapporté dans quelques cas d'insulinome chez le chien (*Canis lupus familiaris*), mais ces derniers ne sont pas impliqués dans la pathogénie du diabète canin (O'Brien et al., 1987; O'Brien et al., 1990). Les mécanismes qui induisent la conversion de l'IAPP en amyloïde sont certes multifactoriels; en revanche, les détails ne sont pas complètement élucidés.

L'objectif 1 implique le séquençage d'une partie du gène de l'IAPP chez plus d'une trentaine d'espèces animales, l'évaluation des différents homologues peptidiques à former des agrégats fibrillaires et la comparaison des séquences peptidiques afin d'identifier les acides aminés jouant un rôle clé dans cette transformation structurale. Le potentiel d'amyloïdogénicité des différentes séquences d'acide aminé chez chaque espèce animale a été comparée à l'aide d'analyses *in silico*. Afin de poursuivre les essais *in vitro*, des peptides synthétiques s'inspirant des séquences peptidiques obtenues chez les différentes espèces animales ont été commandées afin de procéder à des études *in vitro* sur la formation des agrégats d'amyloïdes. Le potentiel d'agrégation fibrillaire des séquences peptidiques a été déterminé avec la fluorescence à la thioflavine T et l'essai de liaison au rouge Congo. La conversion des structures secondaires en feuillet β a été analysée à l'aide de la spectrométrie de l'UV lointain via le dichroïsme circulaire pour chaque peptide. La microscopie électronique a été employée afin de confirmer l'absence ou la présence de fibrilles. Les essais de cytotoxicité ont été réalisés sur la lignée cellulaire pancréatique de rat INS-1. Le chapitre III se consacre à l'étude des variations en acides aminés requises pour enfreindre la conversion de l'état natif de la protéine IAPP en agrégat fibrillaire. Ce chapitre est en lien avec la première hypothèse énoncée.

Objectif 2 : Abroger la formation de fibrilles d'amyloïde pancréatique humaine (hIAPP) par l'utilisation de composés chimiques contenant des groupements aromatiques et urées.

L'objectif 2 comporte l'évaluation du potentiel inhibiteur de l'agrégation fibrillaire de l'IAPP humaine (hIAPP) de trois différentes classes pharmacologiques, soit les hypoglycémifiants, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), et les aryles éthyles urées (EU). Plusieurs composés chimiques de la famille des polyphénols, comme les flavonoïdes, la curcumine, le resvératrol et la silibinine, ont démontré un potentiel à inhiber la formation d'amyloïde *in vitro* et ont aussi un effet protecteur sur les cultures cellulaires pancréatiques (Daval et al., 2010; Jiang et al., 2011; Cao et Raleigh, 2012; Cheng et al., 2012; Hard et Lendel, 2012). Toutefois, des composés plus puissants, présentant à la fois des propriétés adéquates concernant la biodisponibilité (absorption, premier passage hépatique) et une efficacité *in vivo*, sont à développer (Chow et al., 2005; Yang et al., 2007; Muzzio et al., 2012). Les molécules qui contiennent des groupements chimiques tels que des noyaux aromatiques, des polyphénols et des urées sont potentiellement des agents efficaces afin d'empêcher la formation de dépôts d'amyloïde (Daval et al., 2010; Jiang et al., 2011; Cao et Raleigh, 2012; Cheng et al., 2012; Hard et Lendel, 2012; Seeliger et al., 2013).

Pour l'étude des relations structure-activité de dérivés aryles éthyles urées (EU), la préparation et la synthèse des molécules ont été effectuées dans le cadre de mes travaux de maîtrise sous la supervision du Dr René C.-Gaudreault à l'Université Laval (Fortin et al., 2007, 2008). Les relations structure-activité des trois différentes classes pharmacologiques ont été décrites principalement en fonction de l'influence de chaque représentant des différentes classes pharmacologiques sur la formation des fibrilles par l'essai fluorimétrique à la thioflavine T, le changement de conformation de structure secondaire par la spectrométrie de l'UV lointain via le dichroïsme circulaire, l'oligomérisation de la protéine par l'essai de la liaison croisée photo-induite et la viabilité cellulaire. L'efficacité des différents composés inhibiteurs de l'agrégation fibrillaire de l'IAPP a été testée sur l'hIAPP qui possède un fort potentiel à former des dépôts d'amyloïde.

Les molécules possédant une activité anti-amyloïdogénique ont été testées sur des lignées cellulaires provenant d'insulinome de rat (INS-1) ou de souris (MIN-6) afin d'évaluer

leur potentiel à protéger les cellules contre la cytotoxicité des fibrilles formées par l'hIAPP. L'évaluation de la survie cellulaire a été effectuée par une méthode fluorimétrique, à la résazurine. Les chapitres IV, V et VI se consacrent à l'étude des relations structure-activité requises pour l'inhibition de l'agrégation fibrillaire de l'IAPP. Ces chapitres sont en lien avec la deuxième hypothèse énoncée.

Méthodologie et Résultats

Chapitre III

Article 1- Séquençage du polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques (IAPP) chez différentes espèces animales afin d'identifier les variations critiques pour l'agrégation fibrillaire

Contribution

J'ai participé à l'obtention de tous les résultats et à l'écriture de la première version du manuscrit. Les photos provenant de la microscopie électronique ont été obtenues conjointement avec l'aide du Dr Carl A. Gagnon. La correction des diverses versions de l'article a été effectuée sous la supervision de la Dre Marie-Odile Benoit-Biancamano. Cet article scientifique est publié dans le journal *Amyloid: the Journal of Protein Folding Disorders* (DOI : 10.3109/13506129.2015.1070824).

Résumé

L'amyloïde peut être détectée dans les îlots de Langerhans chez la majorité des patients diabétiques de type 2. Ces dépôts ont été associés avec la mort des cellules bêta, contribuant ainsi à la progression du diabète. L'amyloïdogénicité du polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques (IAPP) est plutôt variable parmi les espèces animales et étudier cette variabilité peut améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués dans le processus de l'agrégation. L'objectif général de cette étude était d'identifier les isoformes de l'IAPP chez différentes espèces animales et de caractériser leur propension à former des agrégats fibrillaires. Le gène de l'IAPP a été isolé et séquencé. Une librairie composée de 23 peptides (fragment 8-32) a été synthétisée afin d'étudier la formation d'amyloïde en utilisant des

analyses *in silico* et des tests *in vitro*. La formation d'amyloïde a été entravée quand le motif NFLVH retrouvé dans le segment 8-20 était remplacé par le motif DFLGR ou KFLIR. Les acides aminés 29P, 14K et 18R étaient souvent présents dans les séquences non-amyloïdogéniques. Les séquences ne formant pas d'amyloïde provenaient des espèces suivantes : le tamarin lion doré (*Leontopithecus rosalia*), le grand dauphin (*Tursiops truncatus*) et l'alpaga (*Vicugna pacos*). Parmi les espèces animales étudiées, 34 d'entre elles pouvaient générer des fibrilles. Pour conclure, ce projet fait progresser nos connaissances sur la pathogénèse comparative de l'amyloïdose pancréatique. Il est concevable que les données générées dans cette étude aideront à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les patients diabétiques.

Wildlife sequences of islet amyloid polypeptide (IAPP) identify critical species variants for fibrillization

Jessica S. Fortin & Marie-Odile Benoit-Biancamano

Keywords: Aggregation, fibrils, IAPP, *in silico*, islet of Langerhans, type 2 diabetes

Abbreviations: CD, circular discroism; CR, Congo red; FBS, fetal bovine serum; HFIP, hexafluoroisopropanol; hIAPP, human islet amyloid polypeptide; INS-1, rat insulinoma cell line; PBS, phosphate buffered saline; T₅₀, time to reach half maximum signal strength; ThT, thioflavin T

Abstract

Amyloid can be detected in the islets of Langerhans in a majority of type 2 diabetic patients. These deposits have been associated with β -cell death, thereby furthering diabetes progression. Islet amyloid polypeptide (IAPP) amyloidogenicity is quite variable among animal species, and studying this variability could further our understanding of the mechanisms involved in the aggregation process. Thus, the general aim of this study was to identify IAPP isoforms in different animal species and characterize their propensity to form fibrillar aggregates. A library of 23 peptides (fragment 8-32) was designed to study the amyloid formation using *in silico* analysis and *in vitro* assays. Amyloid formation was

impeded when the NFLVH motif found in segment 8-20 was substituted by DFLGR or KFLIR segments. A 29P, 14K and 18R substitution were often present in non-amyloidogenic sequences. Non-amyloidogenic sequences were obtained from *Leontopithecus rosalia*, *Tursiops truncatus* and *Vicugna pacos*. Fragment peptides from 34 species were amyloidogenic. To conclude, this project advances our knowledge on the comparative pathogenesis of amyloidosis in type II diabetes. It is conceivable that the additional information gained may help point towards new therapeutic strategies for diabetes patients.

Introduction

Amyloid is characterized by cross beta-pleated sheet fibrils and possesses characteristic properties, such as the green birefringence under polarized light when subjected to Congo red staining [1]. The protein generating these amyloid deposits in the pancreatic tissues was identified as islet amyloid polypeptide (IAPP), also designated as amylin, a 37 amino acid residue polypeptide member of the calcitonin-like family of peptides [2, 3]. In normal physiologic states, IAPP/amylin is synthesized, processed and stored in the beta-cell secretory vesicles with insulin and released with it in response to glucose and other beta-cell secretagogues [1, 4]. However, in pathologic states when IAPP/amylin is converted to amyloid, amyloid aggregates are toxic to cells, thus islet amyloid deposits have been associated with β -cell death [5, 6]. Amyloid fibril formation contributes to the pathogenesis of diabetes mellitus in humans, felines and macaques [4]. However, AIAPP has not been reported in all species and its contribution to diabetes is variable in different animal species. Pancreatic amyloid has been reported in some cases of islet cell tumors in dogs (*Canis lupus familiaris*). Interestingly, pancreatic amyloidosis is not a feature of canine diabetes [7, 8]. The IAPP gene has been isolated and sequenced from the islet beta-cells of various other animal species, such as cougar (*Felis concolor*), cow (*Bos taurus*), chicken (*Gallus gallus*), guinea pig (*Cavia porcellus*), hamster (*Mesocricetus auratus*), ferret (*Mustela putorius furo*), mouse (*Mus musculus*), nonhuman primates, rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), raccoon (*Procyon lotor*) and rat (*Rattus norvegicus*) [4, 9-13]. Among those species, AIAPP was detected in the pancreatic tissue of large *felidae*, nonhuman primates and raccoon. Besides *felidae*, raccoon and non-human primate, diabetes mellitus associated with IAPP amyloid has not been reported in exotic or domestic species.

The 24-28 amino acid residues of IAPP are common among the amyloid-forming species, designated as GAILS, which represent the amino acid residues at positions 24-28 [14]. A specific structural motif in the 20 through 29 region of IAPP is important for the formation of amyloid [1, 15, 16]. In that region, a steric zipper structure occurs and further forms the cross-beta spine of human islet amyloid polypeptide (hIAPP) amyloid [15, 16]. Rat and mouse IAPP do not exhibit the GAILS region and fibrillogenicity *in vitro* and *in vivo* is null, in contrast to human, non-human primate, feline and raccoon IAPP [4]. The primary structure of IAPP in each species likely explains, in part, this difference. There are factors other than species-specific amyloidogenic structural motifs that contribute to its amyloidogenicity, such as the extracellular matrix, the immune system and/or natural stabilizing agents that impede IAPP fibrillization [17-18].

Discovery research efforts revealed that peptides that recognize an identical fragment and interact through a beta-pleated sheet were found to disorganize the fibrillar structure [6, 19, 20]. Those peptides disrupt the beta-sheet structure and, consequently, impede amyloid formation. The IAPP amino acid residues 20-29 were found to be crucial to exhibit its potency to abrogate amyloid formation [6, 19]. Synthesis of novel IAPP peptide derivatives and screening for activity to select non-amyloidogenic mutants could lead to the discovery of other potent peptide inhibitors as well as contribute to the understanding of the molecular pathogenesis of amyloidosis.

In this study, we examined the sequence of 38 different wildlife animals. The IAPP gene was isolated and the 37 amino acids of the IAPP peptide were covered for the sequencing. The amyloidogenic potential of each IAPP homolog was assessed *in vitro* using physicochemical analyses including thioflavin-T assays (ThT), Congo red (CR) binding assays, circular dichroism (CD) spectrometry and cell viability assays. The goal of this research was to identify protein variants that are poorly or highly amyloidogenic. This information could be important for the discovery and development of new peptide inhibitors.

Materials and methods

Chemicals

DMSO, hexafluoroisopropanol (HFIP), resazurin, and thioflavin-T (ThT) were obtained from Alfa Aesar (Ward Hill, MA). Congo red was purchased from Ricca chemical company (Arlington, TX).

Cell lines and culture

INS-1 (rat insulinoma) was purchased from AddexBio (San Diego, CA). INS-1 cells were cultured in RPMI1640 medium supplemented with 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1X sodium pyruvate, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 100 U/mL streptomycin, 100 U/mL of penicillin G and 10 % fetal bovine serum (Wisent Inc., St-Bruno, Qc, Canada). Cells were maintained in a moisture-saturated atmosphere at 37 °C under 5% CO₂.

Animal tissues

Paraffin-embedded tissues were obtained from the archives of cases submitted between 2000 and 2014 to the Faculté de médecine vétérinaire of Université de Montréal. For each tissue, three 20 μ m thick serial sections were used for DNA extraction. Blood samples were provided by the Biodome (Dr. Emiko Wang) and Granby Zoo (Dr. Marie-Josée Limoges). Human and feline IAPP amino-acid sequences were used as the positive controls and rodent IAPP was a representative negative control. Control sequences and 2 other sequences were obtained from Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), with the following accession numbers: *Homo sapiens* ([M26650.1](#)), *Canis lupus familiaris* ([NM001003233](#)), *Felis catus* ([NM001043338.1](#)), *Mustela putorius furo* ([XM004803477](#)) and *Rattus norvegicus* ([NM012586.2](#)). *Procyon lotor* and *Mustela putorius furo* IAPP sequences were published previously [9, 11].

Isolation and sequencing of IAPP DNA

To sequence the IAPP gene, DNA was isolated from paraffin-embedded tissues or blood using a DNeasy tissue kit or blood mini kit (Qiagen, Toronto, Ontario, Canada). Fast-cycling PCR DNA synthesis was performed with a Biometra TProfessional Thermocycler with the following PCR protocol: 5 min at 95 °C; 10 cycles of 5 sec at 96 °C, 5 sec at 50 °C, 1

min at 68 °C; 45 cycles of 5 sec at 96 °C, 5 sec at 55 °C and 5 sec at 68 °C; and a final extension of 1 min at 72 °C. Each PCR reaction consisted of 500 nM of IAPP primers (forward and reverse), 300 ng of DNA and 10 µL of fast cycling taq DNA polymerase master mix (Qiagen). Degenerate IAPP forward and reverse primers shown in Table 3 (appendices, primer set numbers 1-3) were used and covered the first seven and last three amino acids of the IAPP peptide. Sequencing was performed at the McGill gene sequencing platform with the following primers (primer set number 4): M13 forward (5' - GTAAAACGACGGCCAGT - 3') and M13 reverse (5' - GGAAACAGCTATGACCATG - 3').

***In silico* analysis of fibril formation**

Phylogenetic analysis was performed with the PhyML program [21]. The tendency for β -sheet aggregation of each amino acid sequence was calculated based on the Agg parameter, obtained using *in silico* analysis with the AGGRESCAN program [22].

Peptide synthesis and purification

Synthetic hIAPP (1-37) and peptide fragments 8-32 were obtained from Dr. Mostafa Hatam, Peptidogen International Corp (Brossard, Qc, Canada). Peptides were prepared and purified as published previously with a microwave peptide synthesizer, using 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry and Fmoc-protected pseudoproline dipeptide derivatives were incorporated to facilitate the synthesis [5]. The identity of the pure products was confirmed by mass spectrometry using a Bruker MALDI-TOF MS. Analytical HPLC was used to check the purity of the peptides ($\geq 95\%$) before each experiment. The purified peptides were lyophilized.

Sample preparation

hIAPP stock solutions were prepared by dissolving peptide at 1 mM in 100% HFIP and incubating for at least 12 h. For the ThT kinetics, CD spectrometry and CR binding assays, IAPP peptide stock solutions were prepared by dissolving peptides at 1 mM in 100% HFIP. For the cytotoxicity assays, the IAPP peptide stock solutions of 1 mM were divided in aliquots to obtain the desired final concentration and were air dried. Aliquots of the stock solutions were dried to remove organic solvents and suspended in 10 mM PBS buffer (pH 7.4) at the

desired concentration to obtain a final concentration of HFIP at 0.1 % for the ThT assays. All peptides were dissolved in DMSO and PBS.

Thioflavin-T (ThT) fluorescence assays

IAPP peptides from the stock solution of 1mM were added to 10 mM PBS buffer (pH 7.4) and transferred to a black 96-well microplate with transparent bottom. Each well contained a final volume of 150 μ L with a peptide final concentration of 10 μ M. Experiments in the presence of peptides were performed after adding a solution of ThT at a final concentration of 15 μ M. The negative control consisted of HFIP at 0.1 % without peptide. Thioflavin-T-based fluorescence assays were used to detect the formation of amyloid. The fluorescence emission experiments were performed with the excitation and emission wavelengths set at 440 and 485 nm, respectively, with a Synergy HT multi-mode microplate reader (BioTek, Winooski, VT). Measurements were taken at room temperature every 5 minutes over 16 hours with 5 s of shaking prior to each measurement. Samples were measured in three replicates and the experiments were repeated three times using different IAPP stock solutions. Arbitrary units of fluorescence were calculated from the mean values for each time point normalized against the maximum value in each completed assay. Arbitrarily, the maximum value (100 %) for the fluorescence intensity was established for hIAPP (fragment 8-32) peptide. The lag time and the time to reach half maximum signal strength (T_{50}) were calculated as previously described [11, 23, 24].

Congo red binding assay

A CR stock solution (10 mM) was prepared in PBS at pH 7.4 and filtered through a 0.2 μ m syringe filter prior to use. Assays were performed in a 96 wells plate containing 30 μ M and 60 μ M of each peptide in 100 μ L of 10 mM PBS buffer (pH 7.4). Each plate was incubated for 24h at room temperature to allow amyloid formation. The binding assay started 1 hour prior to reading by adding CR solution at a final concentration of 100 μ M in each well. CR binding was ascertained by measurement at 300 – 700 nm using a Synergy HT multi-mode microplate reader (BioTek, Winooski, VT). The absorbance spectrum of negative control (CR without peptide) and peptide in the presence of CR were corrected by subtracting

the baseline spectrum of PBS. The final spectra were compared to the negative control (non-bound CR solution).

Far-UV circular dichroism (CD)

CD spectra of the secondary structure of hIAPP samples were recorded at 25 °C under a constant flow of N₂ using a JASCO-810 spectropolarimeter (Jasco, Easton, MD). Spectra were recorded over a wavelength range of 190–250 nm using a quartz cuvette of 1 mm path length and an instrument scanning speed of 100 nm/min, with a response time of 2 s and a bandwidth of 1 nm. All IAPP samples were dissolved to a final concentration of 60 µM in 10 mM PBS buffer (pH 7.4) containing 1% HFIP. The data were converted to mean residue ellipticity (θ) and analysed using the software CDPro as previously described [25]. All CD spectra were averaged and baseline-corrected for signal contributions due to the buffer.

Transmission electron microscopy (TEM)

Peptides were incubated in 10 mM PBS (pH 7.4, 25 °C) at 60 µM for 48 h. A volume of 200 µL was applied on a 400-mesh Formvar-carbon-coated copper grid (Canemco Marivac, Lakefield, QC, Canada) using an Airfuge tube. They were next centrifuged with an Airfuge Air-Driven Ultracentrifuge (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada) for 20 min. The grids were air-dried and incubated for 1 min in distilled water. Then they were carefully air-dried and incubated for 1 min in a fresh solution of 1% uranyl acetate. Samples were air-dried one last time and observed using a transmission microscope (Hitachi Model HT7700 120 kV Compact-Digital Biological TEM, Toronto, ON, Canada). Pictures were acquired at an accelerating voltage of 80 kV and magnification of 40 k.

Cell viability assays

Cells were maintained in a 37 °C, 5% CO₂ incubator, in exponential growth, for the duration of experimentation. 96-well microtiter plates were seeded at a density of 5×10^3 INS-1 cells per well for 24 h. Peptides were dissolved and incubated in 10 mM PBS (pH 7.4, 25 °C) at 60 µM 48 h before addition to cells. Final peptide concentration was 30 µM. Negative controls consisted of equal volume of PBS used to add peptides and contained less than 0.1 % (v/v) of DMSO. The cell culture medium was removed and replenished with RPMI 2X. Plates were incubated for 48 h in the presence of each peptide at 30 µM. Resazurin-based reduction

assays were performed as previously described [26, 27]. Briefly, resazurin (25 µg/mL) was added to the culture medium of each well for 1.5 h at 37 °C. The results were obtained from at least three separate experiments. All values represent means ± SEM (n = 3) and an analysis of variance with a Dunnett test was performed for comparison with the control condition (medium).

Results

Sequence and phylogenetic analysis

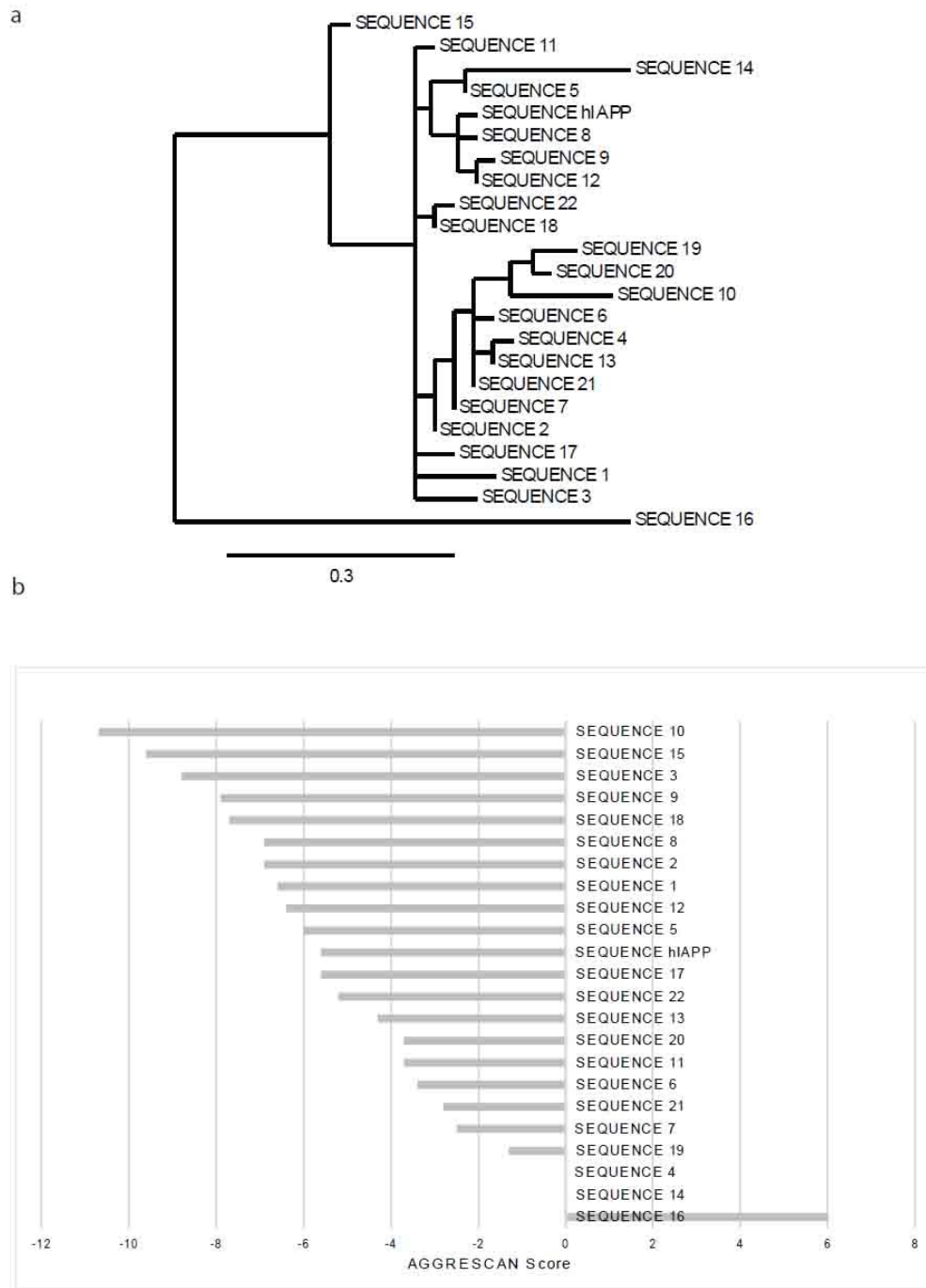
IAPP is expressed in pancreatic islets of most mammalian species. The species-specific differences in the amino acid sequence of the peptide are one factor that contributes to the amyloidogenic potential. Comparison of IAPP sequences obtained in our study is shown in Table 1. A phylogenetic analysis (Figure 1A) was performed to delineate the species-specific variations in the sequence and the *in silico* amyloidogenicity observed (Figure 1B). The amino acid residues 1-7 and 31-37 are highly conserved among animal species.

Table 1. Identification of the 37 amino acids of IAPP using PCR and sequencing. The amino acid sequences of 38 wildlife animals are compared to the amyloidogenic (human, cat) or non-amyloidogenic (rat) sequences. Sequences from species written in italics were obtained from Genbank. The dark amino acids represent amino acid variations as compared to the human sequence.

Peptide library	Species	Peptides	Primer set
hIAPP	<i>Human (Homo sapiens)</i>	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	n.e.
1	<i>Cat (Felis catus) and large felidae*</i>	KCNTATCATQRLANFLIRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	1
	<i>Stoat (Mustela erminea)</i>		
	<i>Suricate (Suricata suricatta)</i>		
	<i>North American river otter (Lontra canadensis)</i>		
	<i>Camel (Camelus dromedarius)</i>		
	<i>Pronghorn (Antilocapra americana)</i>		
2	<i>Harbour porpoise (Phocoena phocoena)</i>	KCNTATCATQRLANFLVRTSNNLGAILSPTNVGSNTY	n.e.
	<i>Dog (Canis lupus familiaris)</i>		1
3	<i>Rat (Rattus norvegicus)/Mouse (Mus musculus)</i>	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY	n.e.
4	<i>Ferret (Mustela putorius furo)</i>	KCNTATCVTQRLANFLVRSSNNLGAILPTDVGSNY	n.e.
5	<i>Groundhog (Marmota monax)</i>	KCNTATCATQRLANFLVRSSHNLGAILSTTNVGSNTY	1
6	<i>Raccoon (Procyon lotor)</i>	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	n.e.
7	<i>Red panda (Ailurus fulgens)</i>	KCNTATCVTQRLANFLVRTSNNLGAILSPTNVGSNTY	1
8	<i>Mantled guereza (Colobus guereza)</i>	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNFGPILSSTNVGSNTY	1
9	<i>Patas monkey (Erythrocebus patas)</i>	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNFGTILSSTDVGSNTY	1
10	<i>Golden lion tamarin (Leontopithecus rosalia)</i>	KCNTATCSMHRLADELGRSSNNFGAILSPTNVGSNTY	1
11	<i>Mandrill (Mandrillus sphinx)</i>	KCNTATCATQRLASFLVRSSNNFGTILSSTNVGSNTY	1
12	<i>Japanese macaque (Macaca fuscata)</i>	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNFGTILSSTNVGSNTY	1
13	<i>African clawless otter (Aonyx capensis)</i>	KCNTATCVTQRLANFLVRSSNNLGAILSPTDVGSNTY	1
	<i>American Marten (Martes americana)</i>		
	<i>Spotted-necked otter (Hydrictis maculicollis)</i>		
14	<i>Sea-lion (Zalophus californianus)</i>	KCNTATCATQRLANFLVRFQLLSGAILSHTNVGSNTY	2
15	<i>Alpaca (Vicugna pacos)</i>	KCNTATCATQRLANFLVHSSDKLDAIFSPTNVGSNTY	1
16	<i>African elephant (Loxodonta africana)</i>	KCNTATCVRQHLANFYIIPATVLPSSLPPTNVGSNTY	1
17	<i>Commun bottlenose dolphin (Tursiops truncatus)</i>	KCNTATCATQRLAKFLIRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	1
18	<i>Grey seal (Halichoerus grypus)</i>	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	2
	<i>Ringed seal (Pusa hispida)</i>		1
	<i>Spectacled bear (Tremarctos ornatus)</i>		
18	<i>Argentine boa (Boa constrictor occidentalis)</i>	RCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	3
	<i>Boa constrictor (Boa constrictor constrictor)</i>		
	<i>Leopard Gecko (Eublepharis macularius)</i>		
19	<i>Green Iguana (Iguana iguana)</i>	RCNTATCVTQRLADELVRSSNFTGAIYSPTNVGSNTY	3
20	<i>Gentoo Penguin (Pygoscelis papua)</i>	KCNTATCVTQRLADELVRSSNNIGAIYSPTNVGSNTY	1
	<i>Swan (Cygnus columbianus)</i>		
21	<i>Kinkajou (Potos flavus)</i>	KCNTATCVTQRLANFLVRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	1
22	<i>Savannah monitor (Varanus exanthematicus)</i>	RCNTATCATQRLANFLVSSNNLGAILSPTNVGSNTY	3

**Acinonyx jubatus, Lynx canadensis, Puma concolor, Panthera leo, Panthera onca, Panthera pardus, Panthera tigris*

Figure 1. *In silico* analysis. Phylogenetic tree of amylin sequences. The branch length legend is indicated (A). Amyloidogenic propensities (Na⁴vSS values) of amylin sequences from the sequencing obtained with AGGRESCAN (B).



Amyloidogenic propensity of the peptide library was analysed using the AGGRESCAN program, which predicts the aggregation-prone regions in input protein sequences (Figure 1B). To compare each sequence, we used the average score of the aggregation-propensity values per amino acid normalized for 100 residues (a^{4v} SS, or AGGRESCAN score). *Rattus norvegicus* (sequence 3) is known to be non-amyloidogenic and the AGGRESCAN score is -8.8. The lowest scores tend to be non-amyloidogenic while a higher score is indicative of a higher probability to form amyloid. *Leontopithecus rosalia* (sequence 10) and *Vicugna pacos* (sequence 15) exhibit a smaller AGGRESCAN score. *Marmota monax* (sequence 5), *Tursiops truncatus* (sequence 17) and *Varanus exanthematicus* (sequence 22) possess an AGGRESCAN score similar to hIAPP. As shown in Figure 1(B), sequences with a score higher or similar to hIAPP are suspected to be prone to form amyloid *in vitro*.

Thioflavin-T (ThT) aggregation kinetics

The kinetic process of amyloid formation of hIAPP and various peptides fragments was assessed with ThT fluorescence assays for 16h at 25 °C. Kinetic parameters and curves are shown in Table 2 and supplementary material section (Supplementary Figure S1), respectively. The ThT binding assay shows that the 8-32 hIAPP fragment gave a strong ThT emission with a lag time of 3.8 ± 0.1 h. Fibrils were formed earlier for peptides 8 and 12, with a lag time of 1.9 h. Peptides 7 and 11 had a lag time of 4.3 ± 0.8 h and 4.7 ± 0.7 h, respectively. Peptides 1, 2, 6, 9, 21 shared a similar lag time of 5.5 h. Peptides 4 and 22 had a lag time around 7.3 h. Other fragments (5, 13, 18, 19, 20) showed a late lag time, between 8 and 13h. The slope was higher for hIAPP, 4, 11, 13, 19 and 22. The amyloidogenicity was calculated with the intensity of the fluorescence emission. Peptides 1, 6, 12, 18, 20 and 22 exhibited an intense ThT fluorescence emission. Peptide 5 had the smallest curve during the assay. Peptide 3 (*Rattus norvegicus*) did not emit fluorescence, as expected. Peptides 10, 14, 15, 16 and 17 were also negative.

Table 2. Fibrillar aggregation properties for each IAPP peptide (fragment 8-32) and summary of the thioflavin-T (ThT) fluorescence assays, congo red (CR) binding assays and Far-UV circular dichroism spectroscopy (CD).

Peptide #	Fibril Formation						
	Lag time (h)	T ₅₀ (h)	Slope	Intensity (%)	ThT	CR	CD
1	5.5 ± 0.7	6.6 ± 0.7	29 ± 2	160.7 ± 0.5	+++++	+	β-sheet
2	5.5 ± 0.4	6.1 ± 0.5	30 ± 4	29.1 ± 3.0	+	-	β-turn
3	n.e.	n.e.	n.e.	1.2 ± 0.3	-	-	Random
4	7.3 ± 1.0	9.7 ± 0.6	58 ± 3	52.8 ± 8.0	++	+	Transition
5	11.8 ± 0.2	13.8 ± 0.1	44 ± 4	3.7 ± 3.1	±	+	Transition
6	5.5 ± 0.8	5.8 ± 0.2	27 ± 10	139.2 ± 3.7	++++	-	β-sheet
7	4.3 ± 0.8	4.5 ± 0.2	24 ± 3	38.5 ± 6.2	+	-	β-turn
8	1.9 ± 0.1	3.1 ± 0.3	33 ± 10	65.9 ± 8.1	++	+	β-sheet
9	5.5 ± 0.5	7.8 ± 0.3	45 ± 15	40.0 ± 7.9	+	+	β-sheet
10	n.e.	n.e.	n.e.	0.8 ± 0.2	-	-	Random
11	4.7 ± 0.7	7.2 ± 1.0	72 ± 15	44.6 ± 1.1	++	+	β-sheet
12	1.9 ± 0.6	3.0 ± 1.0	35 ± 3	101.8 ± 0.5	+++	+	β-sheet
13	8.0 ± 1.1	10.0 ± 0.8	55 ± 5	38.6 ± 0.5	+	-	Random
14	n.e.	n.e.	n.e.	0.9 ± 0.2	-	+	β-turn
15	n.e.	n.e.	n.e.	0.5 ± 0.2	-	-	Random
16	n.e.	n.e.	n.e.	2.1 ± 0.4	-	+	Random
17	n.e.	n.e.	n.e.	3.8 ± 1.0	-	-	Random
18	8.2 ± 1.2	10.4 ± 0.5	48 ± 9	99.2 ± 0.2	+++	-	β-sheet
19	11.1 ± 0.1	13.3 ± 0.7	55 ± 11	16.3 ± 3.4	+	-	β-sheet
20	12.9 ± 0.3	14.1 ± 0.2	38 ± 3	177.3 ± 0.9	+++++	+	β-sheet
21	5.5 ± 0.4	6.1 ± 0.5	27 ± 3	72.4 ± 11.8	++	+	β-sheet
22	7.2 ± 0.2	9.5 ± 0.9	72 ± 17	200.3 ± 1.0	+++++	+	β-sheet
H	3.8 ± 0.1	5.4 ± 0.2	61.4 ± 10.9	97.2 ± 0.2	+++	+	β-sheet

Congo red binding assays

CR dye binds to peptides that form fibrillar beta-aggregates. Visible spectral data (300 – 700 nm) of each IAPP peptide fragment (8-32) and a CR dye solution were acquired. The characteristic shift in absorbance maximum (485 to 501 nm) and the difference spectra (free

CR vs bound CR) are indicative of the amyloid-like beta-pleated sheet structure. As expected, hIAPP (full length, FL, and truncated sequence) and *R. norvegicus* fragment (peptide 3) were positive and negative, respectively (Supplementary Figure S2). At any concentration tested herein, CR dye did not bind to peptides 2, 6, 7, 10, 13, 15, and 17-19 (Table 2).

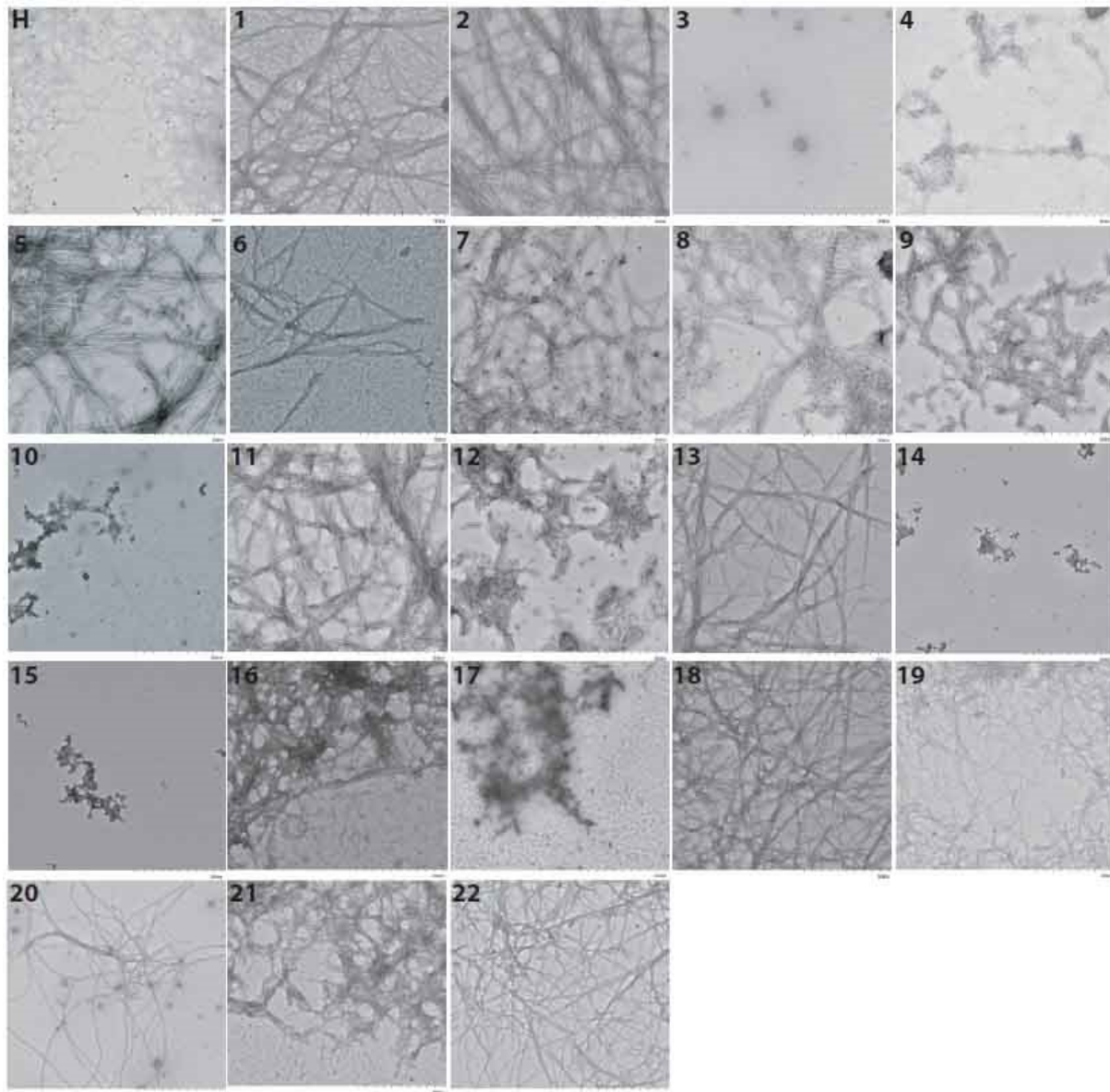
Secondary structure determination by Far-UV CD

Far-UV circular dichroism (CD) spectroscopy was used to monitor the secondary structural transition during the incubation of the peptide library consisting of various animal homologs [23]. The secondary structure (CD spectra) of animal IAPP homologs was first recorded at 60 μ M at predefined time intervals (24 h, 48 h and 72 h). The CD spectrum of hIAPP (FL) was characteristic of a predominant random coil structure at the beginning of the incubation. After 1 h of incubation, the spectrum changed with an increased intensity of the negative band at 220-225 nm, indicative of a β -structure. Peptides 1, 6, 18, 19, 20, 21 and 22 exhibited a strong transition to a β -sheet secondary structure and the transition completed at 72 h for peptide 1, 6, 20, 21 and 22 (Supplementary Figure S3). The transition was apparent earlier for peptide 20. During the incubation time, a transition from a random coil structure to a β -structure was suspected for peptide 4 and 5. For peptide 10, 13, 15, 16 and 17, a random coil structure was still present at 60 μ M (Table 2). As expected, peptide 3 (*R. norvegicus*), exhibited a random coil structure at the highest concentration.

Morphology of IAPP peptides

The morphology of IAPP fragments 8-32 was examined after 48 h of incubation at a final concentration of 60 μ M (Figure 2). Under TEM, peptides 1, 2, 5-7, 11, 13, 16 and 18-22 exhibited extensive long linear amyloid fibrils. Dense mats of fibers were also observed with hIAPP fragment 8-32. Peptides 8, 9 and 12 exhibited short fibrils. Only a few linear fibrils were observed after examination of peptide 4. However, fragments 10, 14, 15, 17 and 3 did not exhibit linear amyloid fibrils and instead exhibited amorphous aggregates.

Figure 2. TEM images of the peptide library. Each peptide was incubated in PBS buffer (pH 7.4) for 48 h at 60 μ M.

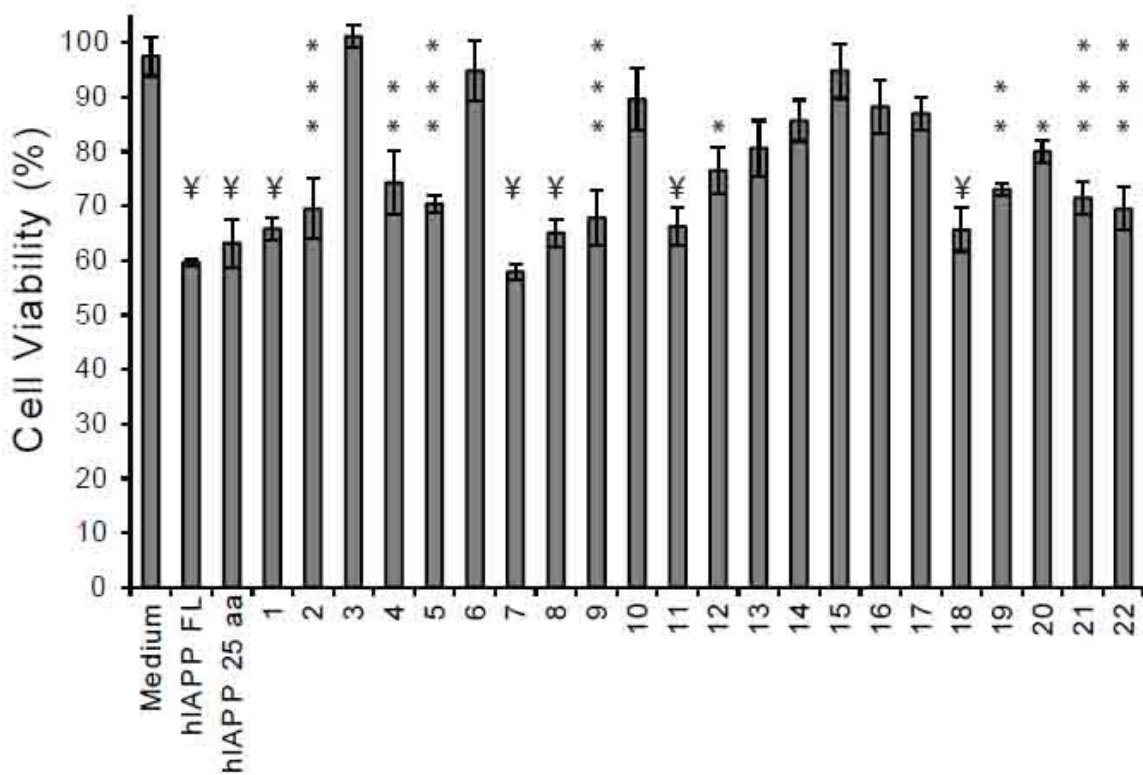


Cytotoxicity of IAPP peptides

Amyloid cytotoxicity has been shown to vary depending on the animal homolog of IAPP. INS-1 (rat) β -cells were incubated with each novel animal IAPP homolog at 30 μ M for 48 h and resazurin assays were performed to assess cell survival; hIAPP FL (full length),

truncated hIAPP (25 aa), *Felis catus* (sequence 1, positive controls) and *R. norvegicus* (sequence 3, negative control) IAPP were used as comparative controls. In our study, full length (FL) (1 μM) and truncated (25 aa) (30 μM) hIAPP exhibited a 60-63% cytotoxic effect (Figure 3). The truncated sequences have been reported to require higher concentration to be cytotoxic in cell cultures [28]. Consistent with previous studies, fragments 1 and 4 were cytotoxic and fragment 3 (negative control) was not deleterious [1, 11]. The presence of peptide 1, 2, 7, 8, 9 and 18 resulted in significant toxicity at the same level as hIAPP. Peptide 8 (*Ailurus fulgens*) exhibited the highest cytotoxicity. Fragments 4, 5, 11, 12, 19-22 form another group of peptides that showed similar cytotoxicity. Peptides 3, 6, 10, 13, 14, 15, 16 and 17 were not cytotoxic or resulted in a non-significant cytotoxic effect in the INS-1 cell line.

Figure 3. Cell viability of INS-1 determined by resazurin-based assays. IAPP fragments were tested at concentrations of 30 μM . Full length hIAPP was used as positive control at 1 μM . ¥, $p < 0.001$; ***, $p < 0.005$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.



Discussion

Several peptides from our study were non-amyloidogenic and could be important for generating peptide inhibitors. Sequences from *L. rosalia* (peptide 10), *T. truncatus* (peptide 17) and *V. pacos* (peptide 15) were non-amyloidogenic and not cytotoxic in the INS-1 cell line. One approach to disrupt amyloid formation would be to synthesize peptides that contain beta-breaker residues such as proline. One other strategy would be to modify the common GAILS motif, which contributes to amyloid formation. A totally different motif is found in the *V. pacos* IAPP sequences (DAIFSP motif). The NFLVH motif is another motif that is known to be involved in amyloid formation. This motif is found in segment 8-20 of the IAPP amino acid sequence. *Leontopithecus rosalia* (peptide 10) and *T. truncatus* (peptide 17) present a completely different motif in that specific segment; a DFLGR and a KFLIR motif, respectively.

Drastic changes in the amino acid sequence are not always necessary to have a major impact in the aggregation propensity. For peptide 17 (*T. truncatus*), a single amino acid substitution occurred in comparison to the *Felis catus* sequence. The *Felis catus* sequence is highly amyloidogenic and the lysine found at position 14 in the *T. truncatus* sequence is apparently very potent in abrogating amyloid fibrillization. Aromatic moieties are important for hydrophobic stacking and structure stabilisation, underlined by the presence of a phenylalanine at position 16. Experiments with mutant sequences demonstrated a significant reduction of hIAPP fibrillization in the absence of phenylalanine at those specific positions [29]. A possible explanation for amyloid inhibition in absence of phenylalanine is the presence of a lysine residue adjacent to F16, which leads to a steric hindrance and/or a modification in the spatial arrangement.

The chemical synthesis of shorter fragments can provide a peptide library quickly at a modest cost. The reliability of peptide fragments 8-32 should ideally be confirmed using the full length counterpart of each peptide. However, results obtained for fragment hIAPP, and peptides 2-4 were consistent with previous studies (*in vitro* or *in vivo*) performed with the full length peptides [1, 11]. Peptide fragments 8-32 consistently formed amyloid fibrils indicating that segments 8-20 and 24-29 are important in forming intramolecular β -sheets and do not

require three β -strands composed of the segments 8-20, 24-29, 32-37 as proposed by previous models [30-32].

Conclusion

Variations around regions 14-18, 18-23 and 24-29 could abrogate the formation of amyloid. 29P, 14K and 18R substitutions were often present in non-amyloidogenic sequences. Our study identifies the possibility for use of non-amyloidogenic sequences from *L. rosalia*, *T. truncatus* and *V. pacos* to generate new peptide inhibitors. It is conceivable that this additional information on the comparative regulation of amyloidogenesis may contribute to identification of novel therapeutic strategies for diabetes patients.

Acknowledgements

We are grateful for the technical advice and support offered by Donald Tremblay, Denis St-Martin and Frédéric Berthiaume. We wish to thank the Biodome (Dr. Emiko Wang) and Granby Zoo (Dr. Marie-Josée Limoges) for sharing blood samples. This study was supported by a startup fund from diabète Québec. The transmission electron microscopy infrastructure was financially supported by Canada Foundation for Innovation (CFI) Leaders Fund (Dr. Carl A. Gagnon).

References

1. O'Brien TD, Butler PC, Westermark P, Johnson KH. Islet amyloid polypeptide: a review of its biology and potential roles in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Vet Pathol* 1993;30:317-32.
2. Westermark P, Wernstedt C, Wilander E, Hayden DW, O'Brien TD, Johnson KH. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3881-5.
3. Martinez-Alvarez RM, Volkoff H, Cueto JA, Delgado MJ. Molecular characterization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) related peptides (CGRP, amylin,

- adrenomedullin and adrenomedullin-2/intermedin) in goldfish (*Carassius auratus*): cloning and distribution. *Peptides* 2008;29:1534-43.
4. Westermark P, Andersson A, Westermark GT. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev* 2011;91:795-826.
 5. Cao P, Abedini A, Wang H, Tu LH, Zhang X, Schmidt AM, et al. Islet amyloid polypeptide toxicity and membrane interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:19279-84.
 6. Cheng B, Gong H, Xiao H, Petersen RB, Zheng L, Huang K. Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: a therapeutic strategy for protein misfolding diseases. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830:4860-71.
 7. O'Brien TD, Westermark P, Johnson KH. Islet amyloid polypeptide and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in amyloid and tumor cells of canine pancreatic endocrine tumors. *Vet Pathol* 1990;27:194-8.
 8. O'Brien TD, Hayden DW, O'Leary TP, Caywood DD, Johnson KH. Canine pancreatic endocrine tumors: immunohistochemical analysis of hormone content and amyloid. *Vet Pathol* 1987;24:308-14.
 9. Jordan KC, O'Brien TD, Johnson KH. Sequence of Raccoon IAPP Supports Importance of a Specific Structural Motif in the Development of Pancreatic-Islet Amyloidosis. *Amyloid* 1994;1:160-164.
 10. Johnson KH, Wernstedt C, O'Brien TD, Westermark P. Amyloid in the pancreatic islets of the cougar (*Felis concolor*) is derived from islet amyloid polypeptide (IAPP). *Comp Biochem Physiol B* 1991;98:115-9.
 11. Paulsson JF, Benoit-Biancamano MO, Schaffer L, Dahl K. Ferret islet amyloid polypeptide (IAPP): characterization of in vitro and in vivo amyloidogenicity. *Amyloid* 2011;18:222-8.
 12. Fan L, Westermark G, Chan SJ, Steiner DF. Altered gene structure and tissue expression of islet amyloid polypeptide in the chicken. *Mol Endocrinol* 1994;8:713-21.

13. Yoshikawa K, Matsuura S, Tsuchiya T, Kadota K. Pancreatic endocrine carcinoma with multiple hormone production in a raccoon (*Procyon lotor*). *J Comp Pathol* 1999;120:301-6.
14. Nishi M, Chan SJ, Nagamatsu S, Bell GI, Steiner DF. Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5738-42.
15. Gilead S, Gazit E. The role of the 14-20 domain of the islet amyloid polypeptide in amyloid formation. *Exp Diabetes Res* 2008:256954.
16. Kapurniotu A, Schmauder A, Tenidis K. Structure-based design and study of non-amyloidogenic, double N-methylated IAPP amyloid core sequences as inhibitors of IAPP amyloid formation and cytotoxicity. *J Mol Biol* 2002;315:339-50.
17. Aston-Mourney K, Zraika S, Udayasankar J, Subramanian SL, Green PS, Kahn SE, et al. Matrix metalloproteinase-9 reduces islet amyloid formation by degrading islet amyloid polypeptide. *J Biol Chem* 2013;288:3553-9.
18. Kamata K, Mizukami H, Inaba W, Tsuboi K, Tateishi Y, Yoshida T, et al. Islet amyloid with macrophage migration correlates with augmented beta-cell deficits in type 2 diabetic patients. *Amyloid* 2014;21:191-201.
19. Hard T, Lendel C. Inhibition of amyloid formation. *J Mol Biol* 2012;421:441-65.
20. Westermark P, Engstrom U, Johnson KH, Westermark GT, Betsholtz C. Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5036-40.
21. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 2008;36:465-9.
22. Conchillo-Sole O, de Groot NS, Aviles FX, Vendrell J, Daura X, Ventura S. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *Bmc Bioinformatics* 2007;8.

23. Cheng B, Gong H, Li X, Sun Y, Zhang X, Chen H, et al. Silibinin inhibits the toxic aggregation of human islet amyloid polypeptide. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;419:495-9.
24. Cheng B, Liu X, Gong H, Huang L, Chen H, Zhang X, et al. Coffee components inhibit amyloid formation of human islet amyloid polypeptide in vitro: possible link between coffee consumption and diabetes mellitus. *J Agric Food Chem* 2011;59:13147-55.
25. Wan ZL, Huang K, Xu B, Hu SQ, Wang S, Chu YC, et al. Diabetes-associated mutations in human insulin: crystal structure and photo-cross-linking studies of a-chain variant insulin Wakayama. *Biochemistry* 2005;44:5000-16.
26. Patenaude A, Fortin JS, Deschenes R, Cote MF, Lacroix J, R CG, et al. Chloroethyl urea derivatives block tumour growth and thioredoxin-1 nuclear translocation. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88:1102-14.
27. Fortin J, Patenaude A, Deschesnes RG, Cote MF, Petitclerc E, C-Gaudreault R. ASK1-P38 Pathway is Important for Anoikis Induced by Microtubule-Targeting Aryl Chloroethylureas. *J Pharm Pharm Sci* 2010;13:175-190.
28. Zhang X, Cheng B, Gong H, Li C, Chen H, Zheng L, et al. Porcine islet amyloid polypeptide fragments are refractory to amyloid formation. *FEBS Lett* 2011;585:71-7.
29. Khemtemourian L, Killian JA, Hoppener JW, Engel MF. Recent insights in islet amyloid polypeptide-induced membrane disruption and its role in beta-cell death in type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res*, 2008:421287.
30. Jaikaran ET, Clark A. Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 2001;1537:179-203.
31. Higham CE, Jaikaran ET, Fraser PE, Gross M, Clark A. Preparation of synthetic human islet amyloid polypeptide (IAPP) in a stable conformation to enable study of conversion to amyloid-like fibrils. *FEBS Lett* 2000;470:55-60.
32. Kajava AV, Aebi U, Steven AC. The parallel superpleated beta-structure as a model for amyloid fibrils of human amylin. *J Mol Biol* 2005;348:247-52.

Supplementary materials

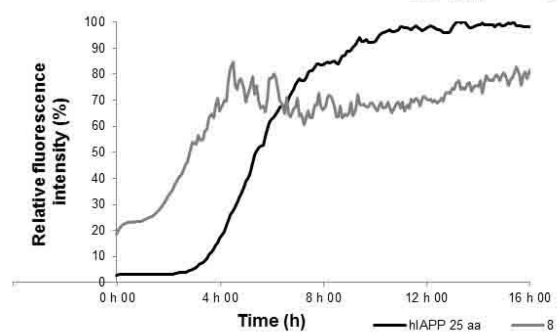
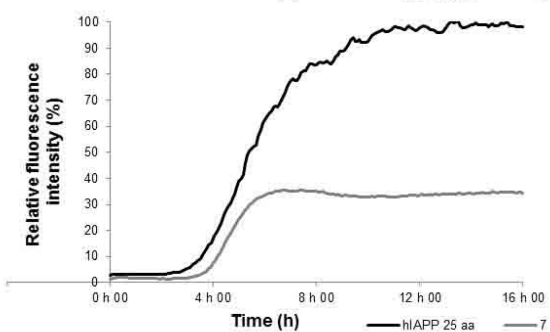
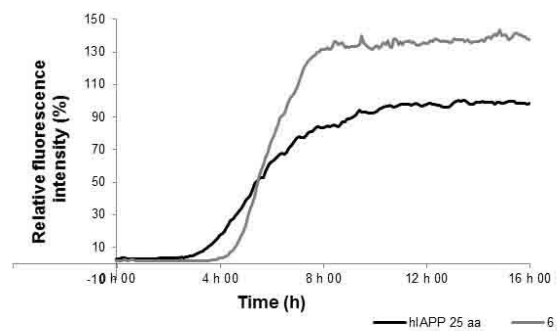
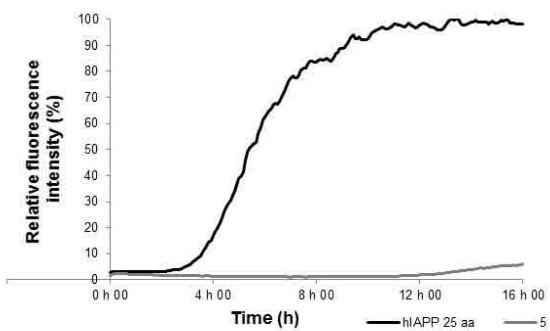
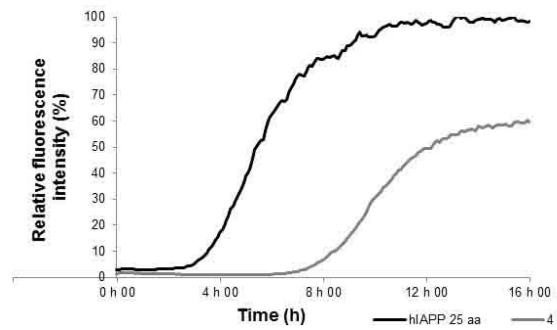
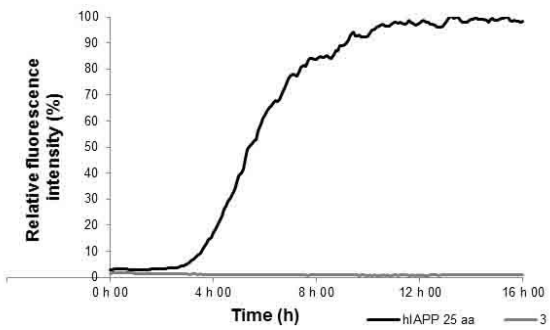
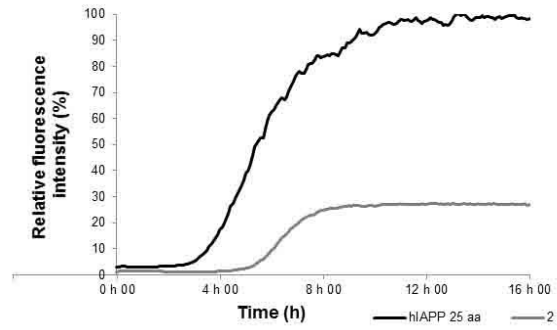
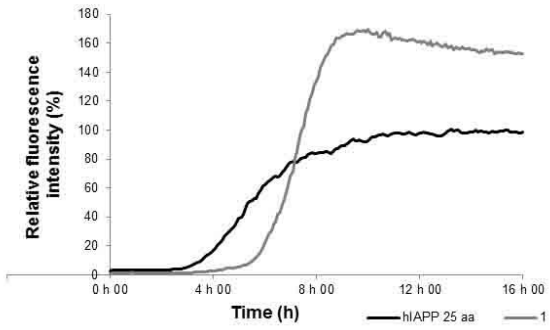
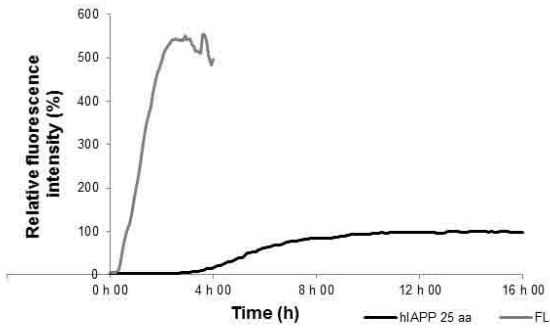
Table S1. Degenerate primers (set 1-3) used to sequence the IAPP gene, region 1-37 of the peptide. Sequencing was performed with primer set number 4.

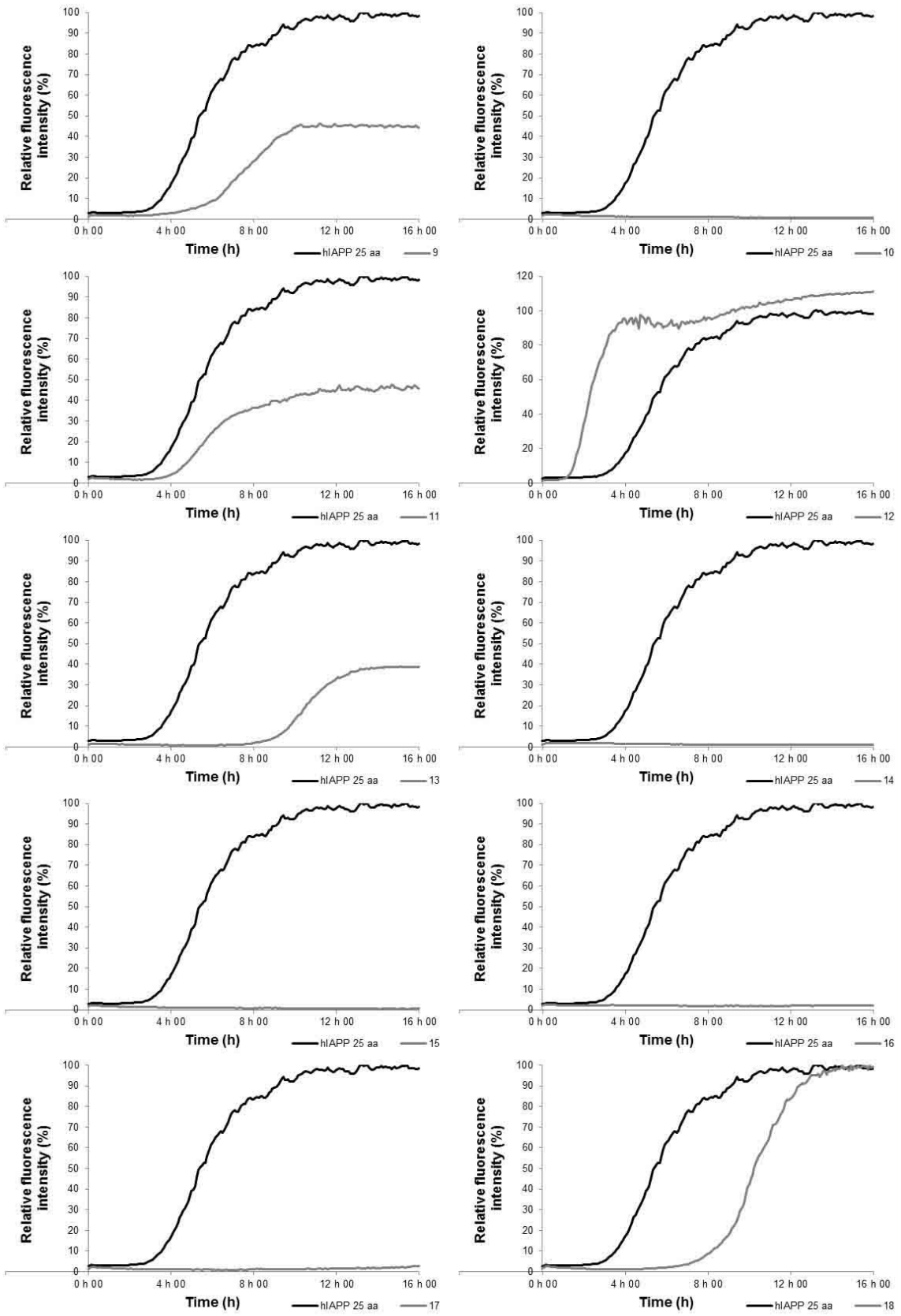
1	F	5' GTAAAACGACGGCCAGTAARTGCAACACTGCCACATG 3'
	R	5' GGAAACAGCTATGACCATGTCCTCTTKCCATATGTATTG 3'
2	F	5' GTAAAACGACGGCCAGTAAATGCAACACTGCCACACG 3'
	R	5' GGAAACAGCTATGACCATGTCCTCTTGCCATATGTATTG 3'
3	F	5' GTAAAACGACGGCCAGTAGGTGTAATACTGCCACATG 3'
	R	5' GGAAACAGCTATGACCATGTCTCTTGCCGTAGGTGTTGGA 3'
4	F	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'
	R	5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'

Table S2. Peptide library of fragments (8-32).

hiAPP	ATQRLANFLVHSSNCFGAILSSTNV
1	ATQRLANFLIRSSNNLGAILSPTNV
2	ATQRLANFLVRTSNNLGAILSPTNV
3	ATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNV
4	VTQRLANFLVRSSNNLGAILLPTDV
5	ATQRLANFLVRSSHNLGAILSTTNV
6	VTQRLANFLLRSSNNLGAILSPTNV
7	VTQRLANFLVRTSNNLGAILSPTNV
8	ATQRLANFLVRSSNCFGPILSSTNV
9	ATQRLANFLVRSSNCFGTILSSTDV
10	SMHRLADFLGRSSNCFGAILSPTNV
11	ATQRLASFLVRSSNCFGTILSSTNV
12	ATQRLANFLVRSSNCFGTILSSTNV
13	VTQRLANFLVRSSNNLGAILSPTDV
14	ATQRLANFLVRFQLLSGAILSHTNV
15	ATQRLANFLVHSSDKLDAIFSPNTV
16	VRQHLANFYIIPATVLNPSSLPTNV
17	ATQRLAKFLIRSSNNLGAILSPTNV
18	ATQRLANFLVRSSNNLGAILSPTNV
19	VTQRLADFLVRSSNTFGAIYSPTNV
20	VTQRLADFLVRSSNNIGAIYSPTNV
21	VTQRLANFLVRSSNNLGAILSPTNV
22	ATQRLANFLVSSNNLGAILSPTNV

Figure S1. Kinetic aggregation (fibrillization) of IAPP fragments monitored using ThT fluorescence. ThT-fluorescence of IAPP fragments was assessed at 25 °C in PBS buffer at a peptide concentration of 10 μ M.





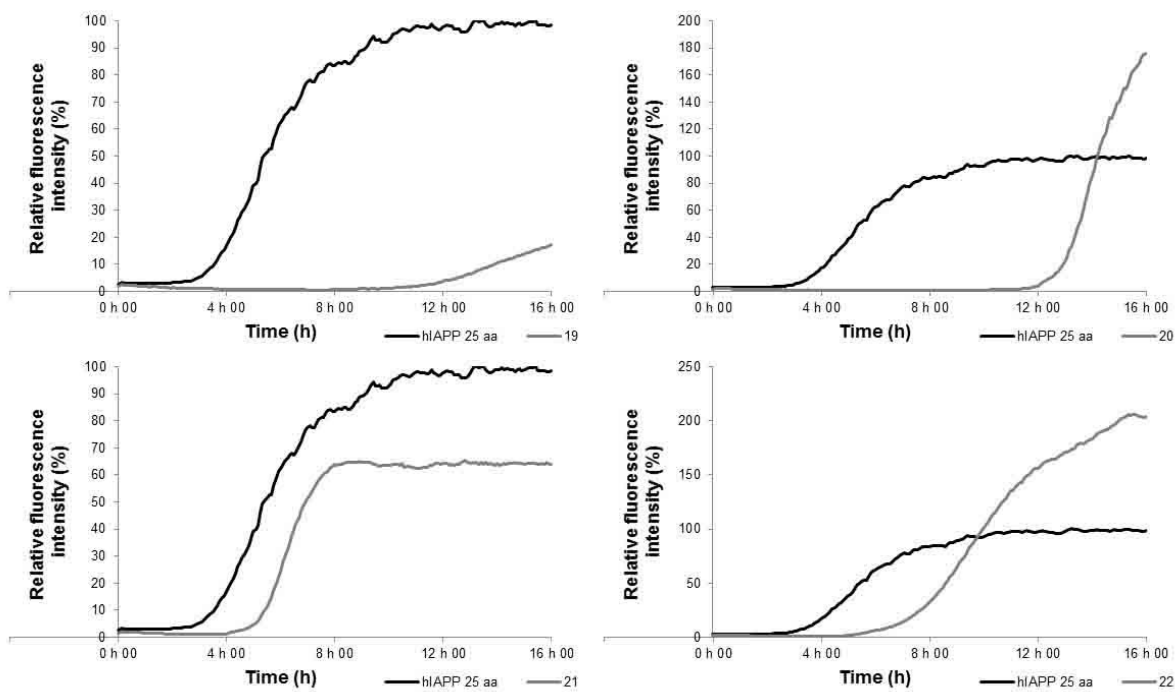


Figure S2. Congo red binding assays of the peptide library. Spectra were recorded at 25 °C in PBS buffer after 24 h of incubation with 60 μ M of each peptide.

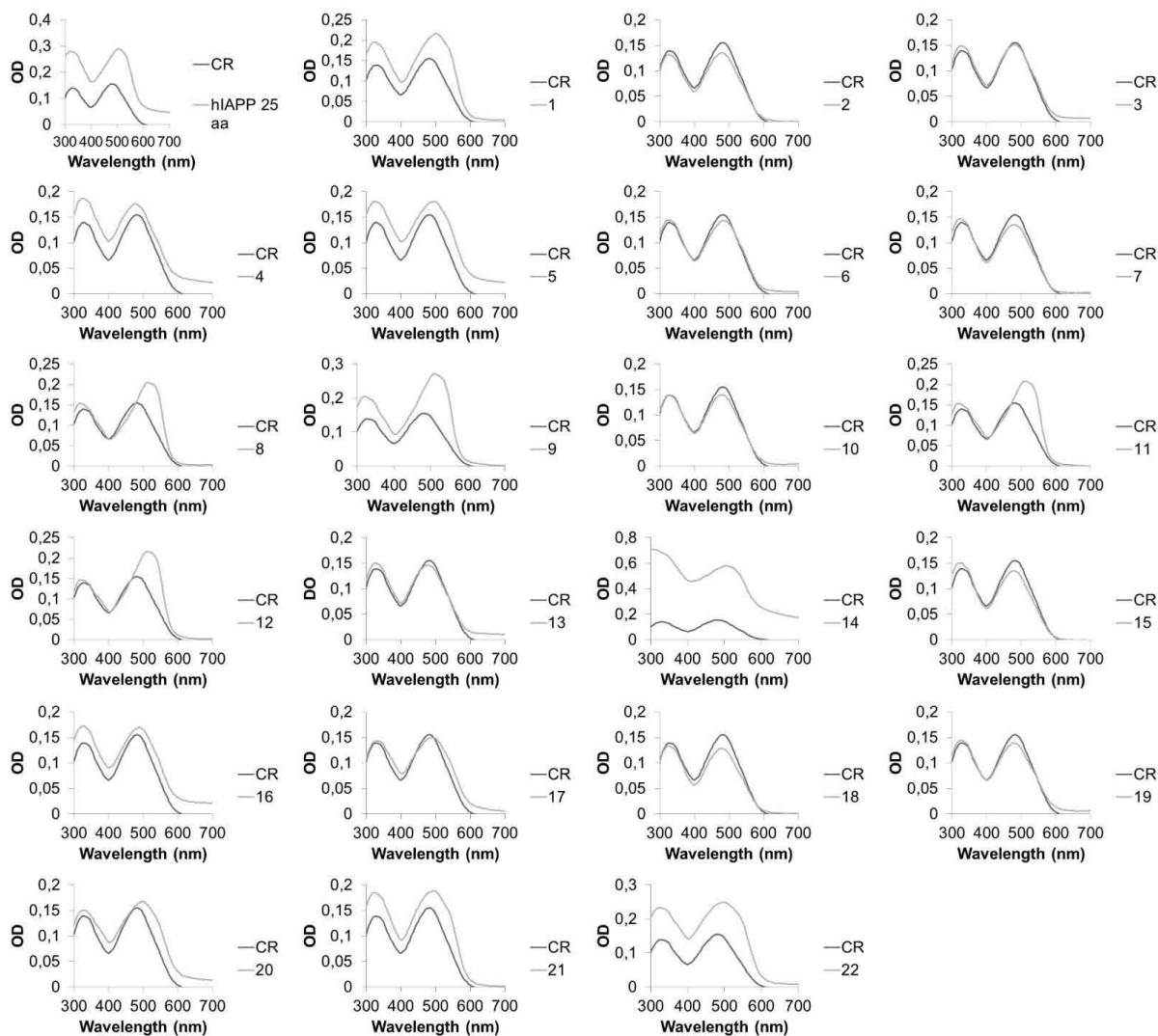
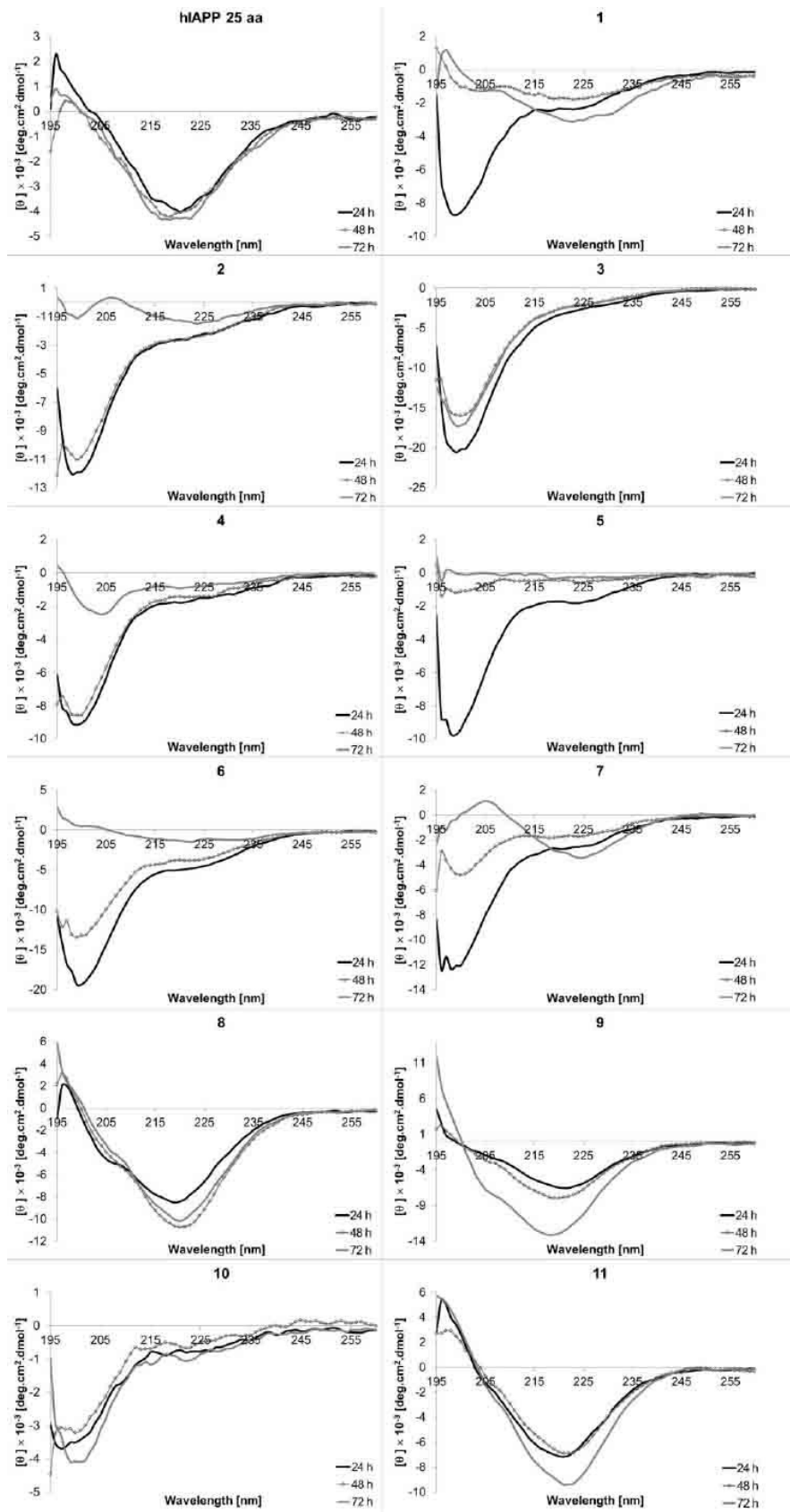
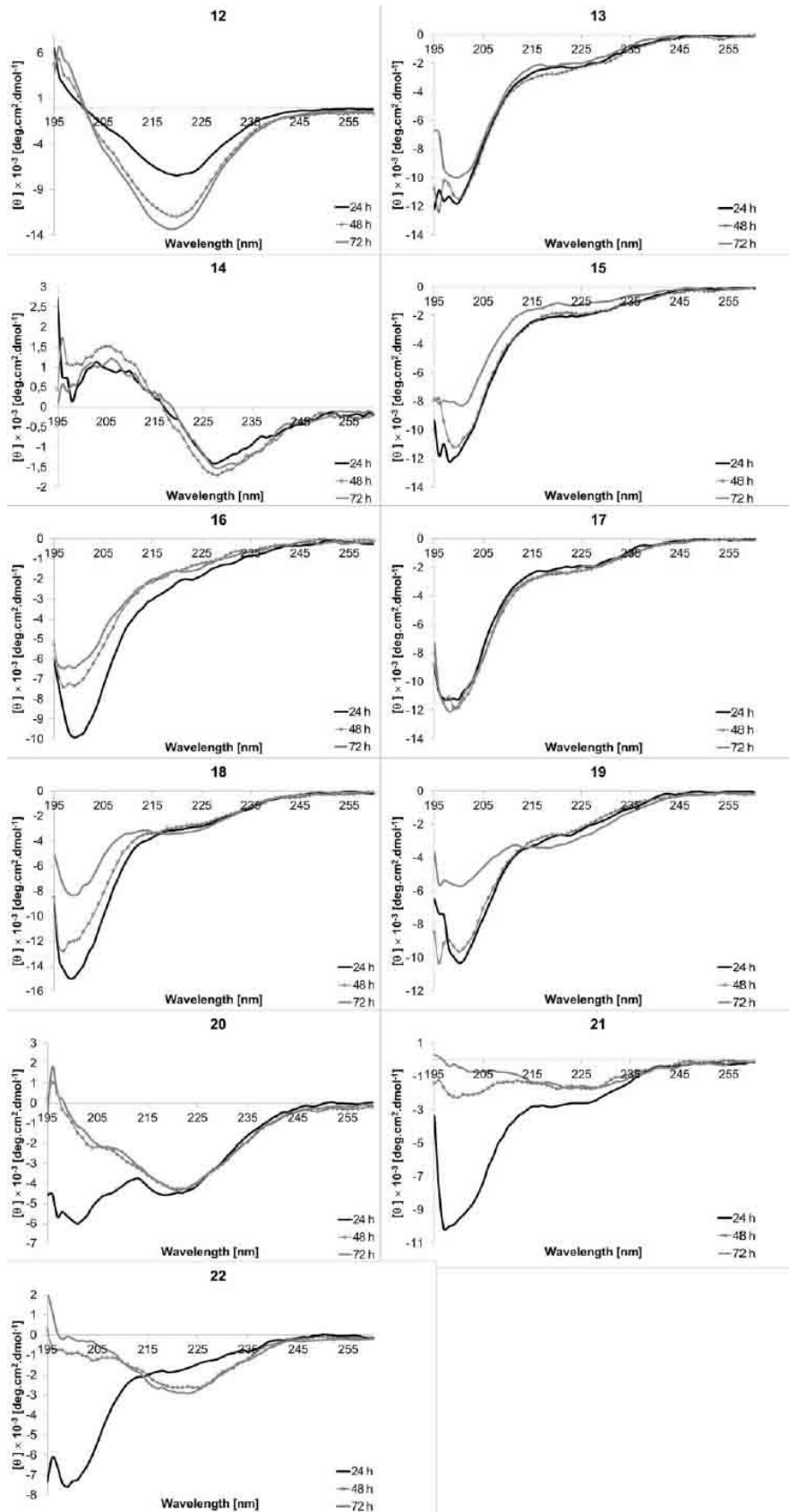


Figure S3. Far-UV circular dichroism spectroscopy of the peptide library. Spectra were recorded at 25 °C in PBS buffer after incubation with each peptide at a final concentration of 60 μ M.





Chapitre IV

Article 2- Évaluation *in vitro* d'agents hypoglycémiants afin de cibler le polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques humains : une protéine clé impliquée dans les dépôts d'amyloïde et la perte des cellules bêta

Contribution

J'ai participé à l'obtention de tous les résultats et à l'écriture de la première version du manuscrit. La correction des diverses versions de l'article a été effectuée sous la supervision de la Dre Marie-Odile Benoit-Biancamano. Cet article scientifique est présentement publié dans le *Canadian Journal of Diabetes* (DOI : 10.1016/j.cjcd.2015.01.291).

Résumé

Objectifs : Le dépôt de substance amyloïde dans les îlots pancréatiques a été associé à la mort des cellules bêta, ce qui favorise la progression du diabète. Plusieurs agents hypoglycémiants, dont la thiazolidinedione, le biguanide et les inhibiteurs de la dipeptidylpeptidase-4 sont connus pour préserver la masse des cellules bêta, possiblement par l'inhibition directe de la substance amyloïde dans les îlots pancréatiques. L'objectif général de cette étude était d'évaluer les effets des principaux représentants des différentes classes d'agents hypoglycémiants sur la formation de substance amyloïde en ayant recours aux approches moléculaires du dépistage *in vitro*. **Méthodes :** Dix prototypes représentatifs des agents hypoglycémiants ont été évalués quant à l'inhibition de la formation *in vitro* de substance amyloïde à l'aide de la fluorescence de la thioflavine T, du dichroïsme circulaire dans l'ultraviolet lointain, de la liaison croisée photo-induite et de la viabilité cellulaire. **Résultats :** Le glyburide, le répaglinide et la troglitazone ont montré le potentiel le plus élevé à retarder et réduire la formation de fibrilles. La troglitazone, une thiazolidinedione, était

l'agent le plus efficace pour empêcher la formation de fibrilles amyloïdes. La troglitazone nuit à la formation de structures secondaires lors d'incubation avec l'amyline humaine (hIAPP). Le spectre de dichroïsme circulaire a montré un retard de transition conformationnelle en feuillets bêta. Une analyse de l'oligomérisation par liaison croisée photo-induite a démontré que le répaglinide supprimait la formation d'oligomères de hIAPP, alors que le glyburide et la troglitazone étaient inefficaces pour inhiber l'oligomérisation. Les 3 composés réduisaient la toxicité cellulaire induite par le hIAPP. **Conclusion :** Cette étude offre de nouvelles perspectives qui détermineront possiblement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ralentir la progression de l'amyloïdose pancréatique des patients humains souffrant du diabète de type 2.

***In vitro* evaluation of hypoglycemic agents to target human islet amyloid polypeptide: A key protein involved in amyloid deposition and beta-cell loss**

Jessica S. Fortin, BPharm, BSc, MSc, DVM, Marie-Odile Benoit-Biancamano, DMV, PhD, DACVP, DECVP

Abbreviations: CD, circular dichroism; FBS, fetal bovine serum; HFIP, hexafluoroisopropanol; hIAPP, human islet amyloid polypeptide; INS-1, rat insulinoma cell line; PBS, phosphate buffered saline; T₅₀, time to reach half maximum signal strength; ThT, thioflavin T.

Abstract

Objectives: Deposition of islet amyloid has been associated with beta-cell death, thereby furthering diabetes progression. Several hypoglycemic agents, such as thiazolidinediones, biguanide and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors, have been known to preserve β -cell mass, possibly by direct inhibition of islet amyloid formation. The general objective of this study is to evaluate the impact of the major representatives of hypoglycemic agents on amyloid formation using *in vitro* molecular screening approaches. **Methods:** Ten prototypical representatives of hypoglycemic agents were evaluated for the inhibition of

amyloid formation *in vitro* using thioflavin fluorescence assays, far-ultraviolet circular dichroism, photo-induced cross linking (PICUP) assays and cell viability assays. **Results:** Glyburide, repaglinide and troglitazone showed the highest potency in delaying and reducing fibril formation. Troglitazone, a thiazolidinedione, was the most effective agent abrogating amyloid fibril formation. Troglitazone affected the secondary structures of incubated hIAPP. The circular dichroism spectra showed a delayed transition to the β sheet conformation. A photo-induced cross-linking based oligomerization assay demonstrated that repaglinide suppressed the formation of hIAPP oligomers, whereas glyburide and troglitazone were ineffective at inhibiting oligomerization. Cell toxicity induced by hIAPP was reduced by all three compounds. **Conclusion:** This study provides new insights that could potentially identify new therapeutic strategies to impede the progression of pancreatic amyloidosis in human patients suffering from type 2 diabetes.

Keywords: anti-amyloidogenic agents, hIAPP, islet of Langerhans, repaglinide, type 2 diabetes, troglitazone.

Introduction

Worldwide, the prevalence of diabetes for all age groups is projected to be around 4.4 % in 2030 (1). In North America, over 90% of diabetes patients are diagnosed with type 2 diabetes and this endocrine disease contributes to the death of over 200,000 Americans annually (1). Diabetes results in many medical conditions associated with long-term elevated blood glucose levels, such as myocardial infarction, stroke, renal failure, blindness and vascular complications leading to amputation (2). Type 2 diabetic patients develop insulin resistance associated with visceral obesity, dyslipidemia and dysfunction of fibrinolysis (2). The presence of hyperinsulinemia in patients with insulin resistance contributes to atherosclerosis and subsequently hypertension. Patients have a significantly reduced quality of life and longevity. Prevention of medical complications and the implementation of a pharmacotherapeutic regimen remain the best strategies to control blood glucose and avoid complications related to type 2 diabetes.

In early stages, type 2 diabetes is characterized by a peripheral resistance to insulin and a compensatory hyperinsulinemia (3). As the disease progresses, the physiological cyclicality

responses are altered, with diminished frequency of pulsed insulin secretion and a delayed response of glucagon to increased glucose levels (3). Type 2 diabetes is a progressive disease characterized by increased hepatic glucagon and, ultimately, impairment of insulin production (3). This metabolic disorder is associated with the loss of β -cells in pancreatic islets and hyperglycemia (3). The later stages of type 2 diabetes involve a complete loss of recognition of the glucose stimuli to induce insulin secretion by β -cells (3). Resistance to hypoglycemic agents develops over time, then therapy with insulin is required to attempt to maintain a normoglycemic state.

Human islet amyloid polypeptide (hIAPP), also designated as amylin, is a 37-residue peptide co-localizing with insulin in the β -cells of pancreatic islets. In its native conformation, IAPP is a satiety hormone that acts centrally to reduce food intake and lower postprandial blood glucose by delaying gastric emptying. hIAPP can also contribute to the progression of type 2 diabetes (4, 5). Indeed, in diabetes, hIAPP is misfolded, resulting in toxic oligomers and linear fibrils, which are pathological hallmarks of type 2 diabetes, occurring in the majority of human and feline patients (4-6). The transition to misfolded protein fibrils involves a conformational change of the secondary protein structure from an α helix to a β sheet conformation, which contributes to the assemblage of a nucleus from the lateral growth, and the elongation of mature fibrils (6). Histopathologically, those fibrils are identified as densely packed deposits of amyloid, occurring both extra- and intracellularly in the islets of Langerhans (5, 6). A characteristic apple-green birefringence occurs in polarized light when amyloid deposits are stained with Congo red dye (4).

IAPP is one of most amyloidogenic endogenous peptides known. Islet amyloid (AIAPP) deposition has been associated with decreased β -cell mass and function (5-7). hIAPP aggregation has been associated with β -cell death, thus furthering the progression of the disease process. *In vitro* studies on cultured β -cells in the presence of normal IAPP show that oligomers as well as the aggregation process generate membrane permeabilization and trigger the apoptotic pathway (5-7). Amyloid is highly cytotoxic and impeding its formation should be viewed as a potentially important adjuvant therapeutic approach for type 2 diabetes.

Chemotherapeutics that improve β -cell function and mass in patients with islet amyloidosis could improve the current therapeutic regimen. Several hypoglycemic agents, such as thiazolidinediones (8), biguanide (2, 3) and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors (9), have been shown to preserve β -cell mass. Recent investigation has shown that sitagliptin treatment prevented amyloid-induced β -cell loss in mice that express hIAPP despite the increased hIAPP release compared to controls (9). In this study, metformin treatment decreased islet amyloid deposition compared to untreated mice with islet amyloidosis (9). Interestingly, one study demonstrated that treatment of hIAPP transgenic mice with rosiglitazone for 1 year was associated with reduced islet amyloid deposition and a diminution in amyloid-associated β -cell loss *in vivo* compared with untreated controls (10). However, another study demonstrated that rosiglitazone did not decrease amyloid deposition in hIAPP transgenic islet grafts (8).

The effects of several hypoglycemic agents on the endocrine pancreas need to be further characterized. The β -cell-protection associated with hypoglycemic agents could hypothetically be explained by a direct inhibition of amyloid deposition. Hence, in the present study, we investigated the direct effect of ten prototypical representatives of hypoglycemic agents on amyloid formation *in vitro* using thioflavin fluorescence assays, far-ultraviolet circular dichroism, photo-induced cross linking (PICUP) assays and cell viability assays.

Methods

Chemicals

Chlorpropamide, DMSO, glyburide, hexafluoroisopropanol (HFIP), pioglitazone, resveratrol, resazurin, silibinin and thioflavin T (ThT) were obtained from Alfa Aesar (Ward Hill, MA). Gliclazide, metformin, repaglinide, rosiglitazone, sitagliptin, tolbutamide and troglitazone were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All drugs were dissolved in DMSO at a final concentration at 0.12 % (v/v) to avoid any cytotoxicity related to the vehicle.

Cell line and culture

INS-1 (rat insulinoma) cells were purchased from AddexBio (San Diego, CA) and cultured in RPMI1640 medium supplemented with 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1X sodium pyruvate, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 100 U/mL streptomycin, 100 U/mL of penicillin

G and 10 % fetal bovine serum (Wisent Inc., St-Bruno, Qc, Canada). Cells were maintained in a moisture saturated atmosphere at 37 °C under 5% CO₂.

Peptide synthesis

Synthetic hIAPP (1-37) was obtained from Peptidogen International Corp (Brossard, Qc, Canada). Peptides were prepared, as previously published, with a microwave peptide synthesizer, using 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry, and Fmoc-protected pseudoproline dipeptide derivatives were incorporated to facilitate the synthesis (11). The peptides were purified by reverse-phase HPLC using a C18 preparative column. The identity of the pure products was confirmed by mass spectrometry using a Bruker MALDI-TOF MS. Analytical HPLC was used to check the purity of the peptides ($\geq 95\%$) before each experiment. The purified peptide was lyophilized.

Sample preparation

hIAPP stock solutions were prepared by dissolving the hIAPP peptide at 1 mM in 100% HFIP and incubating for at least 12 h. For the ThT kinetics, circular dichroism spectrometry and photo-induced cross-linking based oligomerization assays, hIAPP peptide stock solutions were prepared by dissolving peptides at 1 mM in 100% HFIP. For the cytotoxicity assays, the IAPP peptide stock solutions of 1 mM were divided in aliquots to obtain the desired final concentration and were air-dried. Aliquots of the stock solutions were dried to remove organic solvents and suspended in 10 mM PBS buffer (pH 7.4) at the desired concentration. hIAPP was dissolved in DMSO and PBS. DMSO was used at a final concentration lower than 0.1 % (v/v) to avoid cell toxicity.

Thioflavin T (ThT) fluorescence assay

hIAPP peptide from the stock solution of 1mM were added to 10 mM PBS buffer (pH 7.4) and transferred to a black 96-well microplate with transparent bottom. Each well contained a final volume of 150 μ L with a peptide final concentration of 10 μ M. Experiments in the presence of hIAPP were initiated by adding a solution of ThT at a final concentration of 15 μ M ThT with different drug treatments. Final drug concentrations ranged from 12.5 to 100 μ M. The background signal consisted of 0.1 % HFIP without peptide. Thioflavin T-based fluorescence assays were used to detect the formation of amyloid. The fluorescence emission

experiments were performed with the excitation and emission wavelengths set at 440 and 485 nm, respectively, with a Synergy HT multi-mode microplate reader (BioTek, Winooski, VT). Measurements were taken at room temperature every 2 min with 10 seconds prior shaking over 6 h. Samples were measured in three replicates and the experiments were repeated three times using different IAPP stock solutions. For each time point, arbitrary units of fluorescence were calculated from the mean values normalized against the maximum value in each completed assay. Arbitrarily, the maximum value (100 %) for the fluorescence intensity was established for hIAPP (fragment 8-32) peptide. The lag time and the T_{50} were calculated as previously described (12).

Far-Ultraviolet (UV) circular dichroism (CD)

CD spectra of the secondary structure of hIAPP samples were recorded at 25 °C under a constant flow of N_2 using a JASCO-810 spectropolarimeter (Jasco, Easton, MD). Spectra were recorded over a wavelength range of 190–250 nm using a quartz cuvette of 1 mm path length and an instrument scanning speed of 100 nm/min, with a response time of 2 sec and a bandwidth of 1 nm. All IAPP samples were dissolved to a final concentration of 15 μ M in 10 mM PBS (pH 7.4) and 1% HFIP, and where appropriate, the samples contained different drug treatments at a final concentration of 25 μ M. Each result is given as the average scans taken of three measurements at room temperature. The data was converted to mean residue ellipticity (θ) and analyzed using the software CDPro as previously described (13). All CD spectra were averaged, smoothed and baseline-corrected for signal contributions due to the buffer.

Photo-induced cross-linking (PICUP) assay

hIAPP was diluted in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) to a final concentration of 250 μ M peptide and 1% HFIP. The peptide solution was sonicated for 1 min. Drugs were also freshly dissolved in DMSO and added to the peptide solution at a molar ratio of 1:5 (hIAPP:compound). The control consisted of samples that were photo-cross-linked using the PICUP method as described (14). The reaction buffer consisted of 938 μ M Ru(bpy), 18.8 mM ammonium persulfate and 250 μ M hIAPP. Cross-linking was induced by irradiation, for 3 s, of the mixture, at a final volume of 60 μ L, with a 150 W incandescent lamp installed in a homemade dark-box. After irradiation, 25 μ L of Lammeli loading buffer was immediately

added to the solution, followed by incubation at 37 °C for 15 min. The cross-linked samples were separated on a 16% Tricine-urea gel and visualized by silver staining.

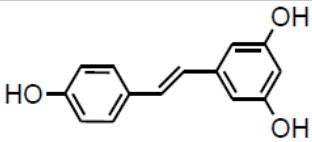
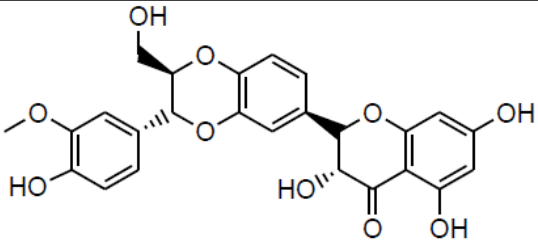
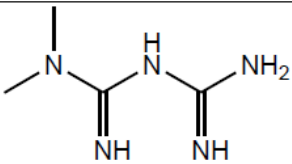
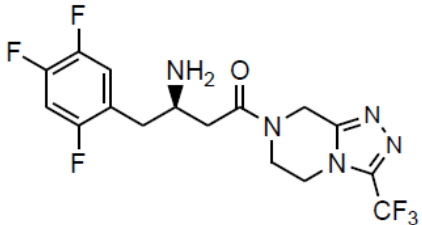
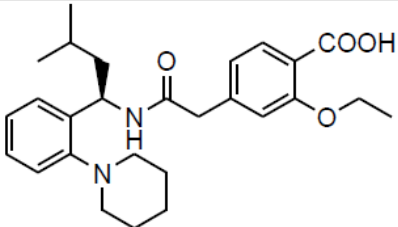
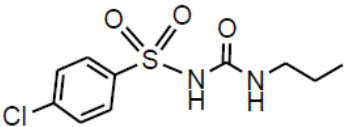
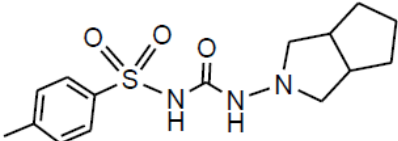
Cell viability assay

Cells were maintained in a 37 °C, 5% CO₂ incubator, in exponential growth, for the duration of the experiment. For this assay, cells were seeded in 96-well microtiter plates at a density of 5×10^3 Ins-1 cells per well for 24 h. Drugs freshly solubilized in DMSO were diluted in culture medium and aliquots containing sequential dilution of drugs were added subsequently after stimulation with 10 μM of hIAPP. hIAPP was dissolved and incubated in 10 mM PBS (pH 7.4, 25 °C) 24 h before addition to cells. Drugs were tested at 25 μM and DMSO concentration was maintained at 0.12% to avoid growth inhibition. Negative control consisted of DMSO with no added drug. Plates were incubated for 24h in the presence of drugs and hIAPP. Resazurin-based reduction assays were performed as previously described (15, 16). Briefly, Resazurin (25 μg/mL) was added to the culture medium of each well for 1h30 at 37 °C. The cell viability was calculated from fluorescence (excitation, 530 nm; emission, 590 nm) measured with a Synergy HT multi-mode microplate reader (BioTek, Winooski, VT). The data from experiments conducted in triplicate was corrected for the background fluorescence of the medium and was expressed as the mean percentage of fluorescence obtained for control DMSO-treated cells. The growth inhibition percentage was calculated with reference to DMSO-treated cells for each drug concentrations. The results were obtained from at least three separate experiments. The cell viability assay was considered valid when the variability among data for a given set of conditions, within the same experiment, was less than 10% with respect to the mean value. All values represent means ± SEM (n = 3).

Statistical analysis

All results in Table 2, Table 3 and Figure 4 were presented as mean ± SD. For the cell viability assays, data were analyzed by the one-way analysis of variance with Dunnett's multiple comparison between IAPP and several drug treatments. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Table 1. Classification and molecular structure of positive controls and hypoglycemic agents used in this study.

Pharmacological class	Generic name	Molecular structure
Positive controls	Resveratrol	
	Silibinin	
Biguanide	Metformin	
Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor	Sitagliptin	
Meglitinide	Repaglinide	
Sulfonylurea	Chlorpropamide	
	Gliclazide	

	Glyburide	
	Tolbutamide	
Thiazolidinedione	Pioglitazone	
	Rosiglitazone	
	Troglitazone	

Results

Glyburide, repaglinide and troglitazone inhibit hIAPP fibril formation

Table 1 shows the chemical structures of the positive controls and the hypoglycemic agents used in this study. The fluorescent dye thioflavin-T (ThT) specifically binds to the β -sheet structure of protein fibrils, providing a strong emission. The kinetic process of amyloid formation in the presence of 100 μ M of different hypoglycemic agents was monitored using thioflavin-T fluorescence assays (Table 2). The ThT binding assay suggested that hIAPP readily formed fibrils and gave a strong ThT emission with a lag time of 19.5 ± 0.5 minutes (Table 2). A time-dependent increase in ThT fluorescence was observed and followed a sigmoidal curve (Figure 1). Co-incubation of hIAPP with glyburide, repaglinide and troglitazone inhibited amyloid formation from hIAPP. Resveratrol and silibinin were used as

positive control and these also significantly reduced the fluorescence intensity. Troglitazone was the only drug that delayed the fibrillation process, with a lag time of 23.0 ± 0.8 minutes, in comparison to the control hIAPP alone which had a lag time of 19.5 ± 0.5 minutes. The ThT sigmoidal curve obtained from glyburide and repaglinide were similar (Figure 1). As indicated in Table 3, glyburide, repaglinide, troglitazone and the positive controls (resveratrol and silibinin) inhibited amyloid formation from hIAPP in a concentration-dependent manner. Troglitazone was effective at $12.5 \mu\text{M}$ and as potent as resveratrol (Figure 1 and Table 3).

Table 2. Fibrillar aggregation properties of hIAPP incubated with different drug treatments at $100 \mu\text{M}$, molar ratio 1:10. Standard deviation for each parameter was calculated.

Hypoglycemic agents ($100 \mu\text{M}$)	Fibril Formation ^a				
	Lag time ^b (min)	T ₅₀ ^c (min)	Slope	Intensity ^d (%)	Amyloidogenic ^e
Metformin	19.6 ± 0.4	30.3 ± 0.2	6.0 ± 0.1	112.7 ± 0.5	+++
Sitagliptin	19.0 ± 0.4	28.8 ± 0.1	6.0 ± 0.1	105.5 ± 0.4	+++
Repaglinide	10.8 ± 0.3	22.4 ± 1.6	11.1 ± 1.3	51.4 ± 0.8	++
Chlorpropamide	19.6 ± 0.4	30.0 ± 0.4	5.8 ± 0.1	111.2 ± 0.4	+++
Gliclazide	18.9 ± 0.4	28.7 ± 0.1	6.1 ± 0.1	116.3 ± 0.4	+++
Glyburide	11.3 ± 0.4	25.8 ± 1.0	10.5 ± 1.0	53.4 ± 0.5	++
Tolbutamide	19.1 ± 0.4	29.0 ± 0.1	5.9 ± 0.1	111.1 ± 0.4	+++
Pioglitazone	16.9 ± 0.4	24.8 ± 0.1	5.3 ± 0.1	94.8 ± 0.2	+++
Rosiglitazone	17.5 ± 0.4	31.3 ± 0.2	8.0 ± 0.2	118.6 ± 0.7	+++
Troglitazone	23.0 ± 0.8	25.8 ± 0.7	2.3 ± 0.6	10.4 ± 0.1	+
Resveratrol	7.2 ± 1.0	17.6 ± 1.0	17.6 ± 1.0	8.4 ± 0.1	-
Silibinin	17.7 ± 0.5	30.0 ± 0.2	6.8 ± 0.2	51.8 ± 0.2	++
HFIP 1%	19.5 ± 0.4	30.5 ± 0.1	6.4 ± 0.1	100.0 ± 0.4	+++

^a The concentration of hIAPP was $10 \mu\text{M}$.

^b The lag time indicates the time during which no significant fibril formation occurs followed by a rapid growth phase.

^c The T50 represents the time to reach half of the maximum signal strength.

^d The fluorescence intensity of hIAPP alone was set as 100 %.

^c The amyloidogenic parameter is a semi-quantitative analysis of ThT-fluorescence based amyloid formation: "+++" indicates samples with fluorescence intensity greater than 75 %, "++" represents values between 40 and 75 %, "+" is set for values between 10 and 40 %, and "-" underlines values lower than 10 %.

Table 3. Fibrillar aggregation properties of hIAPP incubated with different effective drug treatments at 50, 25 and 12.5 μ M. Standard deviation for each parameter was calculated.

Hypoglycemic agents	Fibril Formation ^a				
	Lag time ^b (min)	T ₅₀ ^c (min)	Slope	Intensity ^d (%)	Amyloidogenic ^e
50 μM, molar ratio 1:5					
Glyburide	8.4 \pm 0.3	30.0 \pm 1.4	17.3 \pm 2.4	51.6 \pm 2.4	++
Repaglinide	8.6 \pm 0.3	27.5 \pm 1.3	15.8 \pm 1.9	65.4 \pm 2.2	++
Troglitazone	17.8 \pm 1.1	25.3 \pm 1.0	3.2 \pm 0.9	10.0 \pm 0.1	+
Resveratrol	8.4 \pm 1.0	22.9 \pm 0.9	10.1 \pm 0.9	13.5 \pm 0.2	+
Silibinin	15.8 \pm 0.6	30.2 \pm 0.2	7.3 \pm 0.2	63.4 \pm 0.3	++
25 μM, molar ratio 1:2.5					
Glyburide	16.4 \pm 1.0	40.0 \pm 0.4	10.8 \pm 0.4	77.9 \pm 1.2	+++
Repaglinide	15.5 \pm 0.8	32.2 \pm 0.2	8.4 \pm 0.2	86.8 \pm 0.5	+++
Troglitazone	11.1 \pm 0.9	35.4 \pm 1.0	12.4 \pm 1.2	15.7 \pm 0.3	+
Resveratrol	13.3 \pm 0.8	28.5 \pm 0.3	7.8 \pm 0.3	23.7 \pm 0.2	+
Silibinin	15.8 \pm 0.5	28.7 \pm 0.2	6.8 \pm 0.2	81.5 \pm 0.4	+++
12.5 μM, molar ratio 1:1.25					
Glyburide	17.6 \pm 0.6	32.6 \pm 0.1	7.6 \pm 0.1	95.9 \pm 0.5	+++
Repaglinide	15.7 \pm 0.6	29.3 \pm 0.1	7.3 \pm 0.1	106.3 \pm 0.4	+++
Troglitazone	15.6 \pm 0.6	37.2 \pm 0.8	10.7 \pm 0.9	22.5 \pm 0.5	+
Resveratrol	15.3 \pm 0.7	28.6 \pm 0.2	6.8 \pm 0.2	36.1 \pm 0.2	+
Silibinin	17.1 \pm 0.5	28.9 \pm 0.2	6.7 \pm 0.2	97.4 \pm 0.6	+++
HFIP 1%	17.1 \pm 0.5	28.3 \pm 0.1	6.6 \pm 0.1	100 \pm 0.4	+++

^a The concentration of hIAPP was 10 μ M.

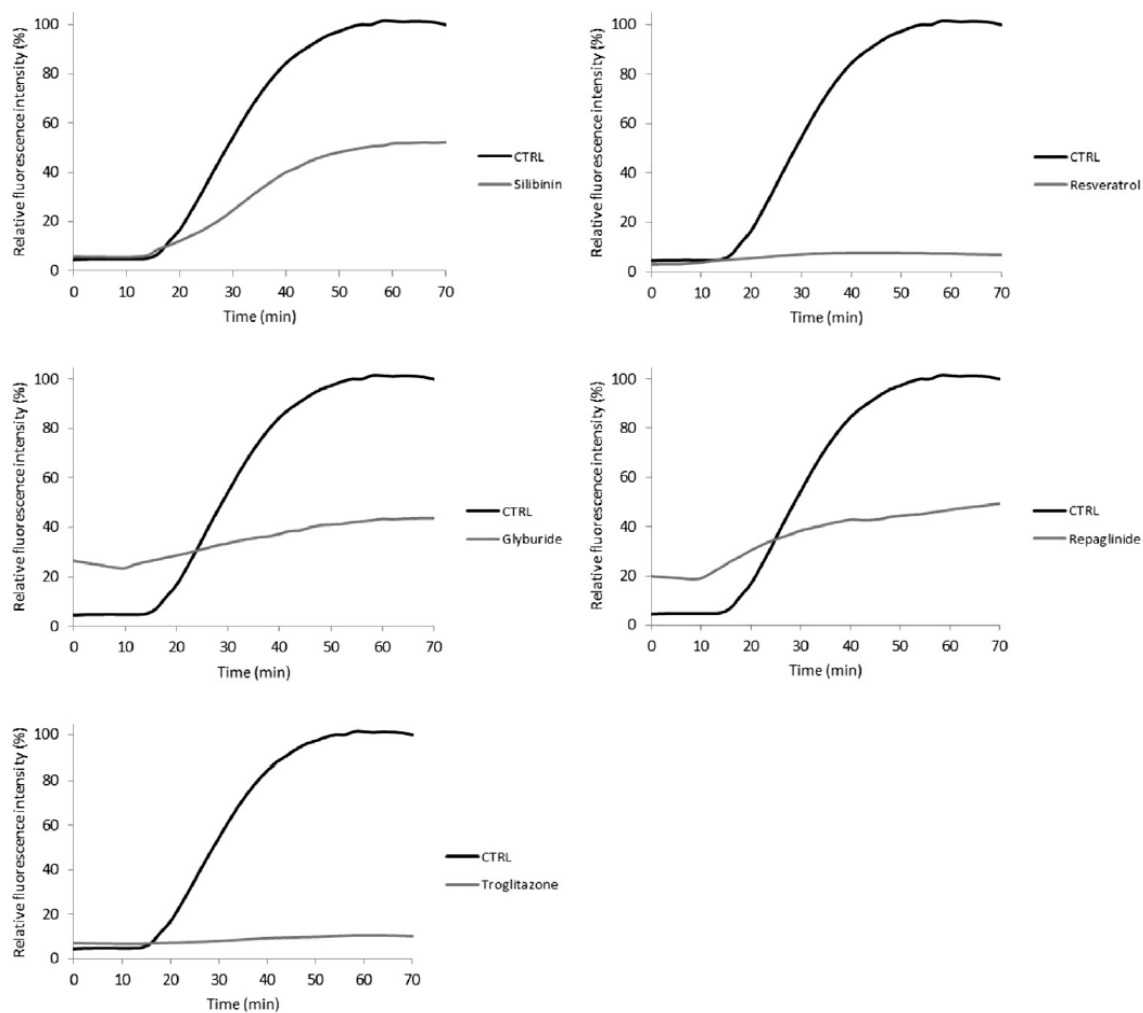
^b The lag time indicates the time during which no significant fibril formation occurs followed by a rapid growth phase.

^c The T₅₀ represents the time to reach half of the maximum signal strength.

^d The fluorescence intensity of hIAPP alone was set as 100 %.

^e The amyloidogenic parameter is a semi-quantitative analysis of ThT-fluorescence based amyloid formation: "+++" indicates samples with fluorescence intensity greater than 75 %, "++" represents values between 40 and 75 %, "+" is set for values between 10 and 40 %, and "-" underlines values lower than 10 %.

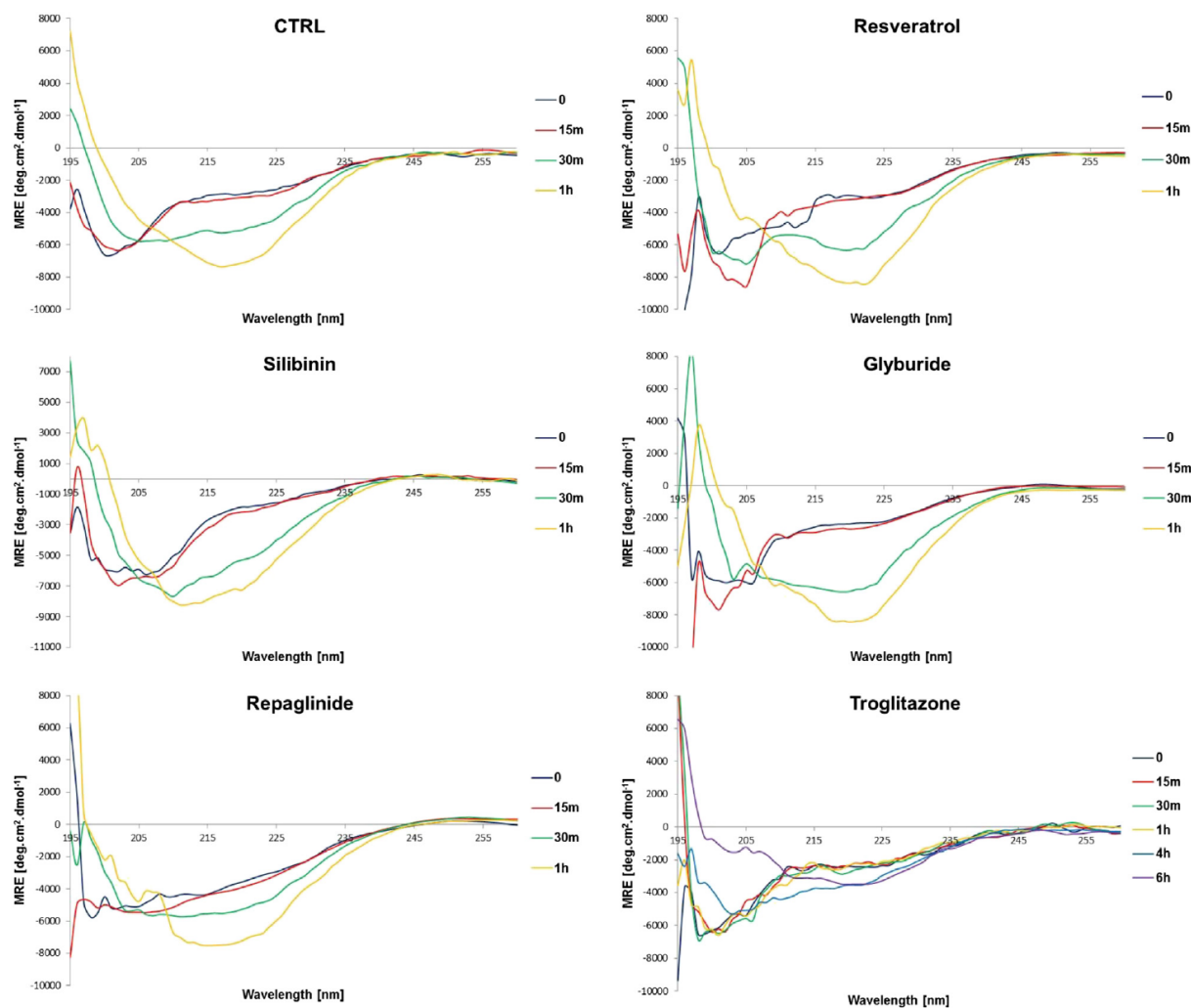
Figure 1. Relative ThT fluorescence intensity of hIAPP with different effective drug treatments (resveratrol, silibinin, glyburide, repaglinide and troglitazone) tested at a concentration of 100 μ M. ThT-fluorescence of hIAPP was assessed at 25°C in PBS buffer at a peptide concentration of 10 μ M and a molar ratio of 1:10.



The structural transition of hIAPP is influenced by troglitazone

The effect of glyburide, repaglinide, troglitazone and positive controls (resveratrol, silibinin) on hIAPP secondary structure formation were monitored with circular dichroism (CD) spectra at different time points. The hIAPP peptide, in the absence of treatment, initially showed a CD spectrum with a minimum at 200 nm, which is characteristic of a random coil formation (Figure 2). CD spectra recorded at 0, 15, 30 and 60 minutes demonstrated a time-dependent conversion from a random coil to a β -sheet conformation (Figure 2). The appearance of a negative peak at 220 nm reveals the presence of a β -sheet conformation. CD spectra remained unchanged versus control when glyburide or repaglinide was added to hIAPP. In contrast, the addition of troglitazone, resveratrol or silibinin at the prefibrillar state of hIAPP induced noticeable differences in the spectra by delaying the conversion from the random coil to the β -sheet conformation. Troglitazone was the most effective agent, delaying the transition of hIAPP secondary structure for at least 4 hours.

Figure 2. Far-UV circular dichroism spectra of hIAPP recorded in the presence of the vehicle (1% HFIP) or different drug treatments. Spectra were recorded at 25°C in PBS buffer using hIAPP at 15 μ M and drug treatments at 25 μ M (molar ratio of 1:1.67). The incubation time was 15 min, 30 min and 1h for most of the treatment and lasted 6h for troglitazone.

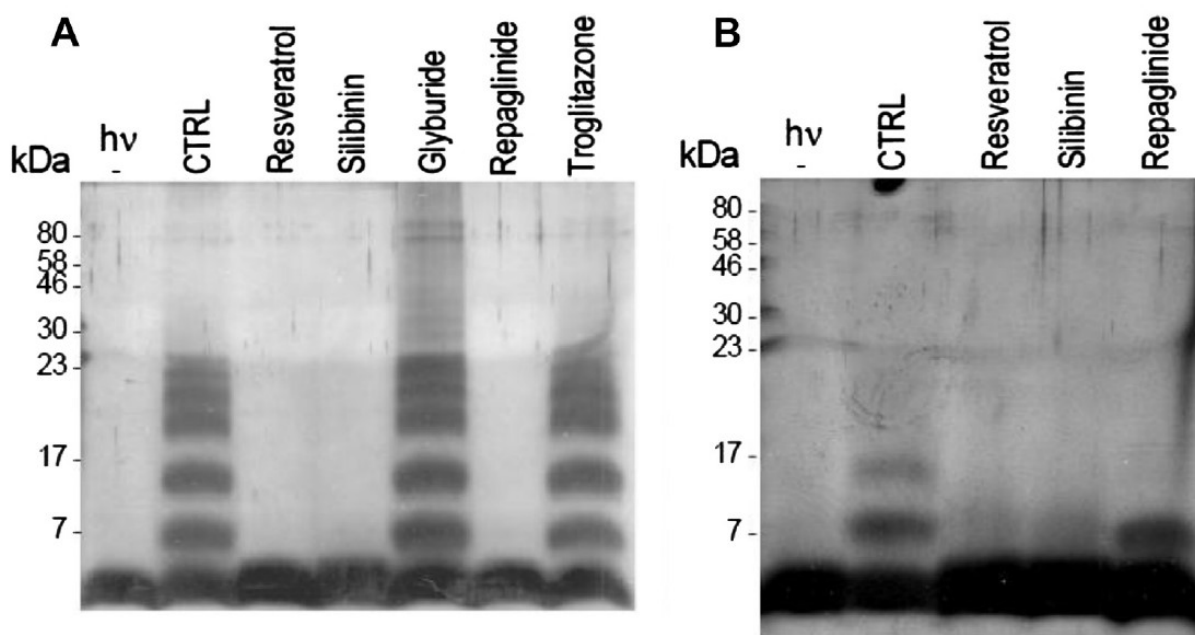


Repaglinide inhibits the oligomerization of hIAPP

Soluble oligomeric species of hIAPP are recognized as highly cytotoxic to cells, inducing membrane pores (and leakage) in the cellular membrane of pancreatic β -cells (4, 11, 17, 18). The effect of selected hIAPP fibrillation inhibitors on the oligomerization of hIAPP was assessed using PICUP assays. Freshly prepared hIAPP with 0.1% DMSO migrated as monomers without irradiation (Lane 1, Figure 3A and B). After a three-second exposure to

light, a mixture of hIAPP monomers and oligomers occurred (lane 2, Figure 3A and B) and this specific oligomeric state is recognized to be consistent with the highly amyloidogenic hIAPP. Treatment with repaglinide, resveratrol and silibinin (Figure 3A) significantly abrogated the oligomerization. As depicted in Figure 3B, repaglinide inhibition was dose-dependent. Glyburide and troglitazone treatments did not impede the multimerization of hIAPP.

Figure 3. Oligomerization status of hIAPP studied by the photo-induced cross linking (PICUP) assay. Lane 1, hIAPP without irradiation; lane 2, hIAPP irradiated for 3 s; lanes 3-7 or 3-5, hIAPP with different drug treatment irradiated for 3 s. (a) The molar ratio was 1:5, 0.25 mM of hIAPP and 1.25 mM of drugs. (b) The molar ratio was 1:1, 0.25 mM of hIAPP and 0.25 mM of drugs.

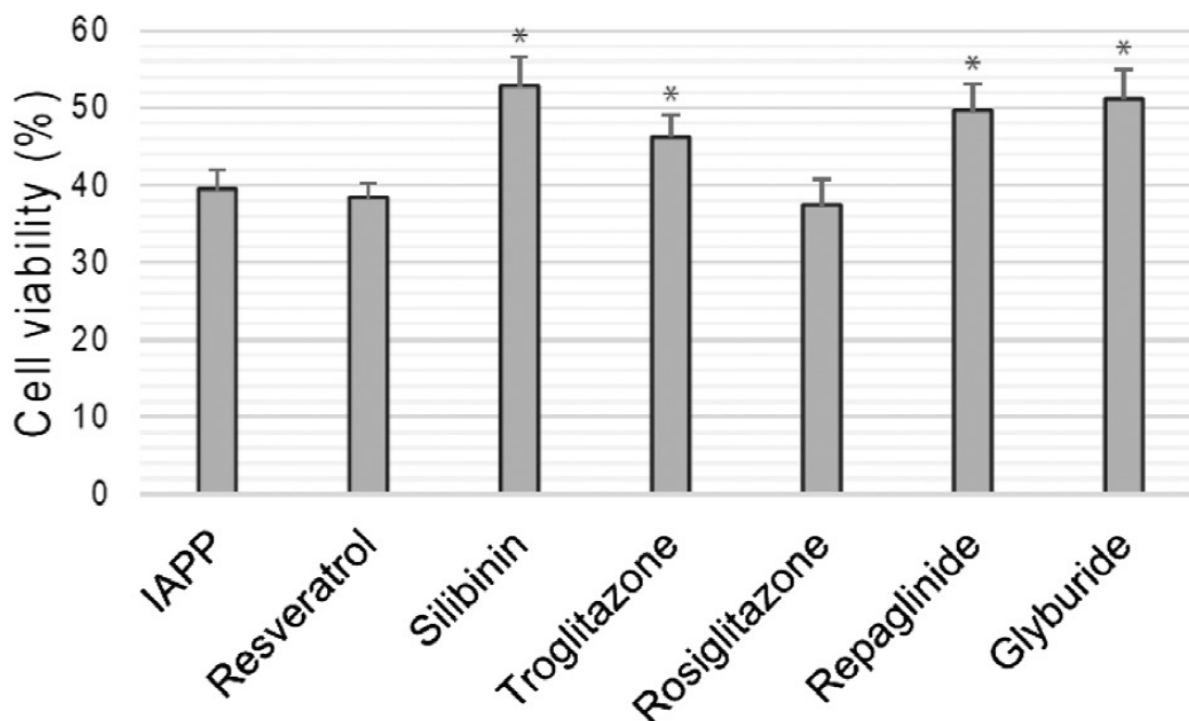


Glyburide, repaglinide and troglitazone decrease the cytotoxicity induced by exogenous hIAPP

hIAPP aggregates are highly cytotoxic *in vivo* and exogenous hIAPP fibrils are deleterious in cell culture (19). The effect of glyburide, repaglinide and troglitazone on hIAPP cytotoxicity was assessed on pancreatic INS-1 cells using resazurine-based assays. The cell viability was 41.9 ± 2.6 % for control cells incubated with 10 μ M hIAPP for 24h (Figure 4).

Consistent with previous studies, at 10 μ M, hIAPP exhibited a strong cytotoxic effect on INS-1 cells (20, 21). The resazurin assay revealed that cytotoxic effects of hIAPP on cultured INS-1 cells were noticeably reduced in the presence of glyburide, repaglinide and troglitazone at 25 μ M. The cell viability also increased with silibinin, the positive control. However, resveratrol did not reduce the cytotoxicity of hIAPP fibrils. Rosiglitazone did not confer cell protection in the presence of hIAPP fibrils, nor did it cause any cytotoxic effects on the cell line at 25 μ M by itself.

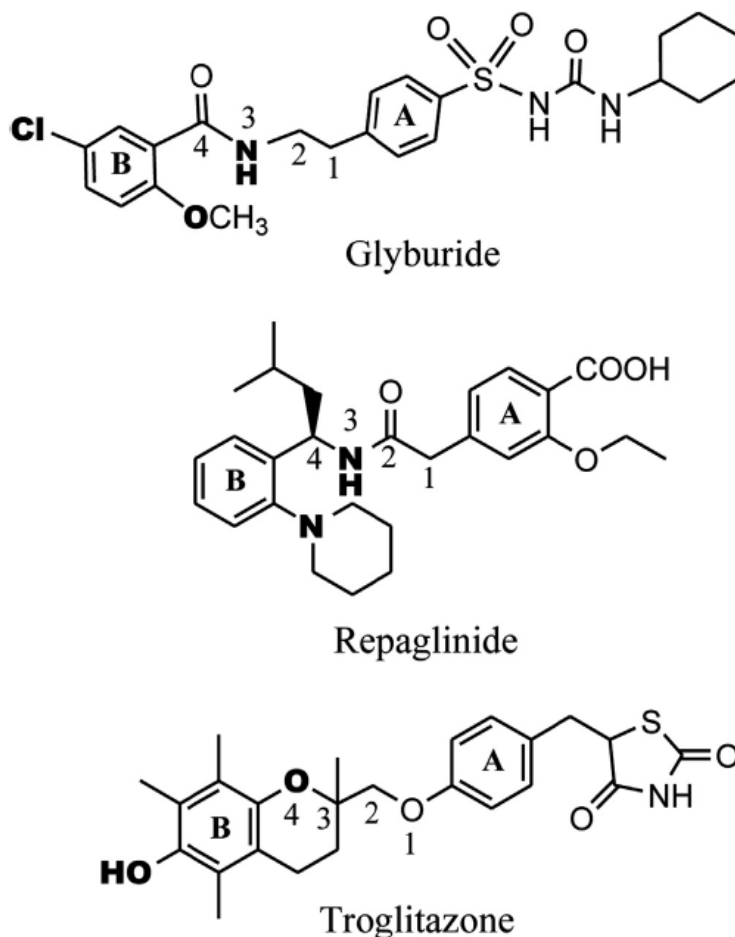
Figure 4. INS-1 cell viability in the presence of hIAPP alone and hIAPP with different drug treatments, such as resveratrol, silibinin, troglitazone, rosiglitazone, repaglinide and glyburide as determined by resazurin-based assays. hIAPP was tested at a concentration of 10 μ M and with 25 μ M of each drug. The molar ratio was 1:2.5. The one-way analysis of variance with Dunnett's multiple comparison test showed significant differences between IAPP and several drug treatments (* is indicative of $p < 0.05$).



Discussion

The number of patients with diabetes is rapidly increasing, thus it is imperative to develop new effective drugs to improve the pharmaceutical regimen (2). Small molecules that inhibit diabetes-related amyloid formation could improve pancreatic islet health and slow down disease progression (3, 5, 22). Multiple hIAPP fibrillation inhibitors have been found and include natural products (20, 23-29), organic molecules (30-33), nanoparticles (34) and hIAPP fragments (22, 35). In many cases, attention has been focused on targeting fibril formation by reducing β -sheet extension and assembly. Aggregation of hIAPP is associated with β -cell loss in type 2 diabetes (3, 5, 22). Several studies have shown that biguanide, thiazolidinedione and DPP-4 inhibitors protected β -cells (3, 8-10). However, *in vitro* activity of these compounds on amyloid formation has not been assessed. In this study, we established the therapeutically potential of ten hypoglycemic agents as amyloid inhibitors to promote structure-activity relationship investigations. Resveratrol and silibinin were used in different studies and they are known as potent inhibitors of hIAPP aggregation. Silibinin has been shown to have cytoprotective properties whereas further studies are required to evaluate the cytoprotective potential of resveratrol.

Figure 5. Proposed structure-activity relationship between glyburide, repaglinide and troglitazone. The numerical digits indicate the number of atoms between cycle A and B without referring to IUPAC nomenclature. The atoms in bold represent nucleophilic atoms found in similar region relative to the cycle B.



Amyloid formation from hIAPP is associated with an initial oligomerization step that forms pore-like oligomers, with predominant α -helical structures (4, 5, 17, 19). Subsequently, these oligomers form mature linear fibrils by self-assembling into β -sheet structures (4, 5, 17, 19). Glyburide, repaglinide and troglitazone were effective in reducing the fluorescent emission of ThT, suggesting the inhibition of fibrillar aggregation. Troglitazone was the only effective compound in this study to delay the lag time, which is the time required for the elongation and exponential growth of the fibrils. Among the sulfonylurea family, glyburide is the only molecule that bears a complex substituent adjacent to the sulphonylurea. That major

chemical structural difference could explain its activity against amyloid aggregation. In contrast to other thiazolidinedione members, troglitazone possesses a 2,5,7,8-tetramethylchroman-6-ol moiety. A simplified structure-activity relationship between glyburide, repaglinide and troglitazone is proposed in Figure 5. Glyburide, repaglinide and troglitazone have in common two aromatic moieties, identified as aromatic ring A and B in Figure 5. Interestingly, the aromatic ring A and B are separated by a small distance; four atoms link the aromatic rings. The three molecules have electron donors as substituent in the aromatic ring B at position ortho and/or para. The di-substituted benzene ring has substituents at the opposite side of the ring. Glyburide and troglitazone bear, respectively, a sulphonylurea and a thiazolidine-2,4-dione which share similar nucleophilicity. Repaglinide has a nucleophilic substituent at the same position, a 2-ethoxybenzoic acid. Further studies must consider modifying the substituent on the benzene ring A and B to provide more insight about the requirement of nucleophilicity at certain positions to impede hIAPP aggregation.

The CD recorded with the control and the majority of the hypoglycemic drugs showed a β -sheet conformation (negative peak at 220 nm) after 1 hour. At 4 hours, the CD spectra were also similar. The CD study indicated that troglitazone delayed the onset of hIAPP secondary structural conversion from a random coil to β -sheet structures. The CD spectra of troglitazone at 4 hours showed a similar negative peak at 220 nm, indicative of a β -sheet conformation. The inhibition binding could be at the prefibrillar stage. However, troglitazone did not prevent oligomerization of hIAPP. The CD spectra were limited to the concentrations used in this study. Spectra interferences were observed with all compounds used at 50 μ M in the far-UV region (195-210 nm). Aromatic moieties are present in all the drugs tested, which likely explains the spectrum of absorption observed in this region. Subtraction of important spectral interference can lead to false data. For glyburide and repaglinide, other techniques should be used to determine the binding status of hIAPP.

Targeting amyloid fibrils may not be a useful strategy due to an adverse effect of rapidly increasing oligomers (36). The PICUP assay was used to show the effects of hIAPP inhibitors on the oligomerization of hIAPP. Repaglinide, resveratrol and silibinin were potent inhibitors of hIAPP oligomerization. If those compounds bind to hIAPP in its monomeric state, it could impede the equilibrium shift towards the formation of oligomers/intermediate

toxic secondary structures. An attractive strategy to design new inhibitors is to target the monomeric helical state rather than the helix-helix association that leads to nuclei assembly and cytotoxic membrane pores (4, 17, 36). Structure-relation activity of repaglinide derivatives using chemical changes on the amide substituents must be assessed to develop more potent inhibitors of the helical state.

Glyburide, repaglinide and troglitazone conferred cell protection against toxic fibrils. Rosiglitazone was not protective and this result is supported by a previous study that demonstrated that rosiglitazone did not reduce amyloid deposits in hIAPP transgenic islet grafts (8). The protective effects of silibinin at a molar ratio of 1:2.5 is consistent with previous work where the cytotoxicity of hIAPP was attenuated with a molar ratio ranging from 1:1 to 1:5 (23). Resveratrol did not increase INS-1 survival at 25 μ M. To our knowledge, this is the first study that evaluated glyburide, repaglinide and troglitazone activity in a cell-based assay related to hIAPP proteotoxicity. The concentrations used in clinic are significantly higher than those used in our study. The pharmacological agents were designed to get a normoglycemic state and also to obtain an efficient blood concentration in regards to bioavailability, metabolism and elimination. Since their concentrations would be higher *in vivo*, we consider that they will remain potent inhibitors of hIAPP aggregation, but *in vivo* studies are needed to confirm their efficacy for amyloid inhibition. Herein, cell-based assays were limited to the cytotoxicity of drugs and were performed at 50 μ M. The effects of the drugs were not tested at higher concentrations. This also underlines the importance of developing more potent inhibitors.

Some drugs can be very potent to impede the *in vitro* fibrilization using the thioflavin assays and other related assays. The cell-based assay used in our study involved hIAPP amyloid pre-formed before the drug challenge. Consequently, the effective drugs must be able to destabilize the fibril state to demonstrate a cytoprotective effect and/or impede the activation of apoptosis. We performed an amyloid disaggregation experiment with hIAPP preformed fibrils and drug treatments that included the positive controls (silibinin, resveratrol) and the effective drugs (glyburide, repaglinide and troglitazone) (Supplementary data). The diminution of fluorescence observed with positive controls, repaglinide and troglitazone underline the capacity to destabilize fibrils conformation. The disaggregation of amyloid

observed with this assay explains the cytoprotective effect of those compounds. However, glyburide was not able to reduce the fluorescence intensity which is suggestive of an incapacity to disaggregate amyloid. The apoptotic pathways induced by amyloid formation can be altered by drugs that do not involve disaggregation of amyloid. The prevention of apoptotic pathways by drugs is a hypothesis to explain the cytoprotective effect conferred by glyburide. Further studies are needed to elucidate the precise cytoprotective mechanism of this hypoglycemic agent.

Conclusion

In vitro studies indicate that glyburide and troglitazone prevent hIAPP fibrillation and attenuate its cytotoxicity. Repaglinide impedes hIAPP oligomerization and troglitazone prolongs the random coil state of hIAPP. Troglitazone is not currently commercialized because of idiosyncratic hepatotoxicity that occurred after extensive clinical use (37). However, for both molecules, further structure-relationship studies must be assessed to improve their chemical structure and potency of anti-amyloid activity. Structure-activity relationship studies are critical to target the monomeric helical state of hIAPP and to prolong the life span of β -cells. The design of a molecule that exhibits dual activities, such as a hypoglycemic and anti-amyloid agent, could lead to the preservation of the pancreatic islets in type 2 diabetic patients.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Diabète Québec. JF would like to thank the Faculté de médecine vétérinaire for its contribution during the DMV-PhD combined program. We are grateful for the technical advice and support offered by Frédéric Berthiaume and Dr. Jacques Lussier.

References

1. www.diabetes.org.
2. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position

statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes care*. 2012;35(6):1364-79.

3. Lee SC, Pervaiz S. Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(3):497-504.

4. Abedini A, Schmidt AM. Mechanisms of islet amyloidosis toxicity in type 2 diabetes. *FEBS letters*. 2013;587(8):1119-27.

5. Westermark P, Andersson A, Westermark GT. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiological reviews*. 2011;91(3):795-826.

6. Jaikaran ET, Clark A. Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochimica et biophysica acta*. 2001;1537(3):179-203.

7. Hoppener JW, Nieuwenhuis MG, Vroom TM, Ahren B, Lips CJ. Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus: consequence or cause? *Molecular and cellular endocrinology*. 2002;197(1-2):205-12.

8. Udayasankar J, Zraika S, Aston-Mourney K, Subramanian SL, Brooks-Worrell BM, Taborsky GJ, et al. Rosiglitazone treatment does not decrease amyloid deposition in transplanted islets from transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Transplantation proceedings*. 2013;45(2):574-9.

9. Aston-Mourney K, Subramanian SL, Zraika S, Samarasekera T, Meier DT, Goldstein LC, et al. One year of sitagliptin treatment protects against islet amyloid-associated beta-cell loss and does not induce pancreatitis or pancreatic neoplasia in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2013;305(4):E475-84.

10. Hull RL, Shen ZP, Watts MR, Kodama K, Carr DB, Utzschneider KM, et al. Long-term treatment with rosiglitazone and metformin reduces the extent of, but does not prevent, islet amyloid deposition in mice expressing the gene for human islet amyloid polypeptide. *Diabetes*. 2005;54(7):2235-44.

11. Cao P, Abedini A, Wang H, Tu LH, Zhang X, Schmidt AM, et al. Islet amyloid polypeptide toxicity and membrane interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(48):19279-84.

12. Zhang X, Cheng B, Gong H, Li C, Chen H, Zheng L, et al. Porcine islet amyloid polypeptide fragments are refractory to amyloid formation. *FEBS letters*. 2011;585(1):71-7.
13. Sreerama N, Woody RW. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods in enzymology*. 2004;383:318-51.
14. Bitan G, Teplow DB. Rapid photochemical cross-linking - A new tool for studies of metastable, amyloidogenic protein assemblies. *Accounts Chem Res*. 2004;37(6):357-64.
15. Fortin J, Patenaude A, Deschesnes RG, Cote MF, Petitclerc E, R CG. ASK1-P38 pathway is important for anoikis induced by microtubule-targeting aryl chloroethylureas. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*. 2010;13(2):175-90.
16. Patenaude A, Fortin JS, Deschenes R, Cote MF, Lacroix J, R CG, et al. Chloroethyl urea derivatives block tumour growth and thioredoxin-1 nuclear translocation. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2010;88(11):1102-14.
17. Buchanan LE, Dunkelberger EB, Tran HQ, Cheng PN, Chiu CC, Cao P, et al. Mechanism of IAPP amyloid fibril formation involves an intermediate with a transient beta-sheet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(48):19285-90.
18. Guardado-Mendoza R, Davalli AM, Chavez AO, Hubbard GB, Dick EJ, Majluf-Cruz A, et al. Pancreatic islet amyloidosis, beta-cell apoptosis, and alpha-cell proliferation are determinants of islet remodeling in type-2 diabetic baboons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(33):13992-7.
19. Gurlo T, Ryazantsev S, Huang CJ, Yeh MW, Reber HA, Hines OJ, et al. Evidence for proteotoxicity in beta cells in type 2 diabetes: toxic islet amyloid polypeptide oligomers form intracellularly in the secretory pathway. *The American journal of pathology*. 2010;176(2):861-9.
20. Cheng B, Liu X, Gong H, Huang L, Chen H, Zhang X, et al. Coffee components inhibit amyloid formation of human islet amyloid polypeptide in vitro: possible link between

coffee consumption and diabetes mellitus. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(24):13147-55.

21. Paulsson JF, Benoit-Biancamano MO, Schaffer L, Dahl K. Ferret islet amyloid polypeptide (IAPP): characterization of in vitro and in vivo amyloidogenicity. *Amyloid*. 2011;18(4):222-8.

22. Potter KJ, Scrocchi LA, Warnock GL, Ao Z, Younker MA, Rosenberg L, et al. Amyloid inhibitors enhance survival of cultured human islets. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1790(6):566-74.

23. Cheng B, Gong H, Li X, Sun Y, Zhang X, Chen H, et al. Silibinin inhibits the toxic aggregation of human islet amyloid polypeptide. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;419(3):495-9.

24. Daval M, Bedrood S, Gurlo T, Huang CJ, Costes S, Butler PC, et al. The effect of curcumin on human islet amyloid polypeptide misfolding and toxicity. *Amyloid*. 2010;17(3-4):118-28.

25. Noor H, Cao P, Raleigh DP. Morin hydrate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide and disaggregates amyloid fibers. *Protein Sci*. 2012;21(3):373-82.

26. Bruno E, Pereira C, Roman KP, Takiguchi M, Kao PY, Nogaj LA, et al. IAPP aggregation and cellular toxicity are inhibited by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose. *Amyloid*. 2013;20(1):34-8.

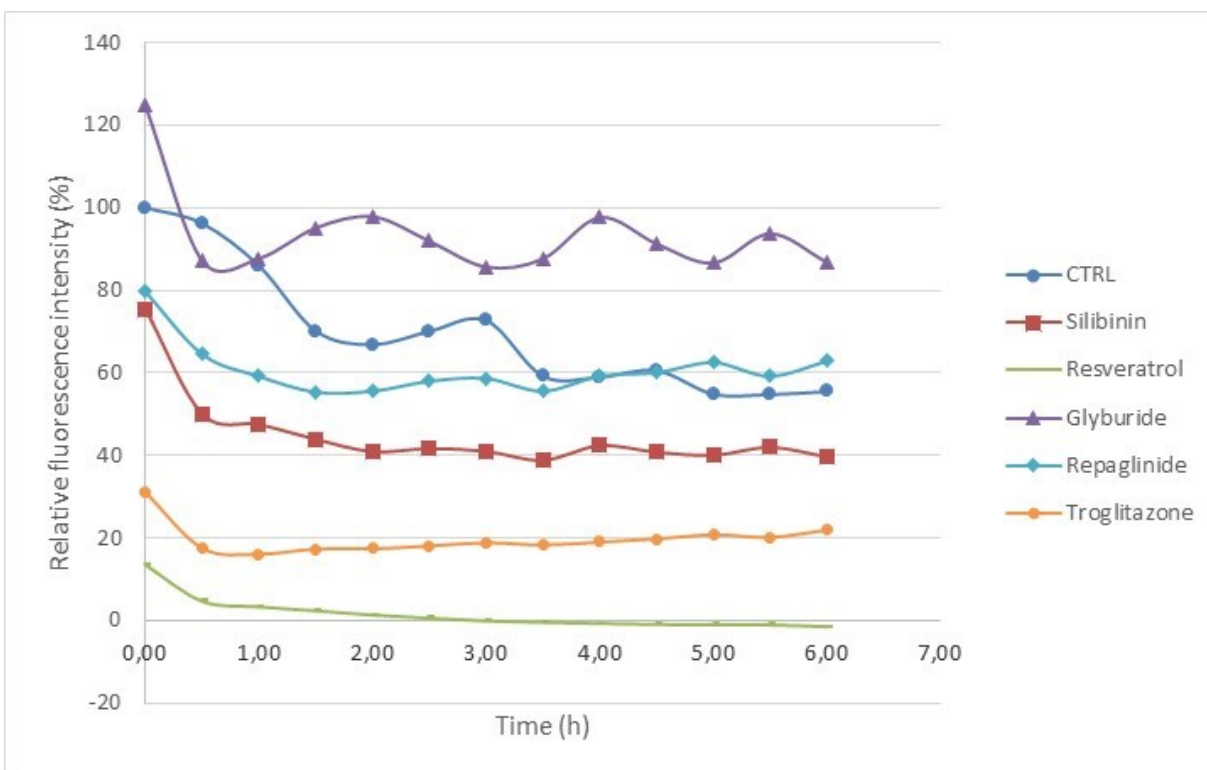
27. Cao P, Raleigh DP. Analysis of the inhibition and remodeling of islet amyloid polypeptide amyloid fibers by flavanols. *Biochemistry*. 2012;51(13):2670-83.

28. Jiang P, Li W, Shea JE, Mu Y. Resveratrol inhibits the formation of multiple-layered beta-sheet oligomers of the human islet amyloid polypeptide segment 22-27. *Biophysical journal*. 2011;100(6):1550-8.

29. Cui L, Li T, Liu YY, Zhou L, Li PH, Xu BL, et al. Salvianolic Acid B Prevents Bone Loss in Prednisone-Treated Rats through Stimulation of Osteogenesis and Bone Marrow Angiogenesis. *Plos One*. 2012;7(4).

30. Hebda JA, Saraogi I, Magzoub M, Hamilton AD, Miranker AD. A peptidomimetic approach to targeting pre-amyloidogenic states in type II diabetes. *Chemistry & biology*. 2009;16(9):943-50.
31. Li X, Ma L, Zheng W, Chen T. Inhibition of islet amyloid polypeptide fibril formation by selenium-containing phycocyanin and prevention of beta cell apoptosis. *Biomaterials*. 2014;35(30):8596-604.
32. Hagihara M, Takei A, Ishii T, Hayashi F, Kubota K, Wakamatsu K, et al. Inhibitory effects of choline-O-sulfate on amyloid formation of human islet amyloid polypeptide. *FEBS open bio*. 2012;2:20-5.
33. Bahramikia S, Yazdanparast R. Inhibition of human islet amyloid polypeptide or amylin aggregation by two manganese-salen derivatives. *Eur J Pharmacol*. 2013;707(1-3):17-25.
34. Guo J, Li J, Zhang Y, Jin X, Liu H, Yao X. Exploring the influence of carbon nanoparticles on the formation of beta-sheet-rich oligomers of IAPP(2)(2)(-)(2)(8) peptide by molecular dynamics simulation. *Plos One*. 2013;8(6):e65579.
35. Scrocchi LA, Chen Y, Waschuk S, Wang F, Cheung S, Darabie AA, et al. Design of peptide-based inhibitors of human islet amyloid polypeptide fibrillogenesis. *Journal of molecular biology*. 2002;318(3):697-706.
36. Hebda JA, Miranker AD. The interplay of catalysis and toxicity by amyloid intermediates on lipid bilayers: insights from type II diabetes. *Annual review of biophysics*. 2009;38:125-52.
37. Watanabe I, Tomita A, Shimizu M, Sugawara M, Yasumo H, Koishi R, et al. A study to survey susceptible genetic factors responsible for troglitazone-associated hepatotoxicity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2003;73(5):435-55.

Supplementary materials



Supplementary data. Relative ThT fluorescence intensity of pre-formed hIAPP aggregates. Amyloid disaggregation experiment was performed with the normal procedures of the ThT fluorescence assay using hIAPP at 10 μ M. Positive controls (silibinin and resveratrol) and effective drugs (glyburide, repaglinide, troglitazone) were added at a concentration of 100 μ M 48h after the initiation of fiber formation.

Chapitre V

Article 3- Inhibition de l'agrégation et de la cytotoxicité associée au polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques (IAPP) par les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)

Contribution

J'ai participé à l'obtention de tous les résultats et à l'écriture de la première version du manuscrit. La correction des diverses versions de l'article a été effectuée sous la supervision de la Dre Marie-Odile Benoit-Biancamano. Ce manuscrit est publié dans le *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* (DOI : 10.1139/cjpp-2015-0117).

Résumé

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) constituent une importante classe pharmacothérapeutique pour laquelle, depuis la dernière décennie, ont élargi le champ d'applications à une multitude de conditions médicales. Ils ont été testés dans le cadre de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer pour réduire l'inflammation et aussi dans l'optique de diminuer les dépôts d'amyloïde. Toutefois, l'utilisation d'AINS en tant qu'inhibiteurs de l'agrégation n'a pas été étudiée pour les dépôts d'amyloïde dans le pancréas. L'amyloïdose pancréatique implique le changement de conformation du polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques humains (hIAPP) et contribue à la progression du diabète de type 2 chez les humains et les félins. Afin de décrire leur activité anti-amyloïdogénique, quelques AINS ont été testés en utilisant la fluorescence de la thioflavine T, le dichroïsme circulaire, la liaison croisée photo-induite et la viabilité cellulaire. Le célécoxib, le diclofénac, l'indométhacine, le méloxicam, l'acide niflumique, le nimésulide, la phénylbutazone, le piroxicam, le sulindac et le ténoxicam ont réduit la formation de fibrilles à un ratio molaire de 1 : 10. Le diclofénac, l'acide niflumique, le nimésulide, la phénylbutazone et le ténoxicam ont retardé la conversion des structures secondaires en un feuillet bêta. L'oligomérisation de

l'hIAPP a été abrogée suite à un traitement avec le diclofénac et le sulindac à un ratio molaire de 1 : 5. La survie cellulaire de cellules en présence d'hIAPP a augmenté significativement suite à un co-traitement avec certains AINS pendant 24 h, soit le diclofénac, le méloxicam, la phénylbutazone, le sulindac et le ténoxicaam à un ratio molaire de 1 : 10. Nos résultats démontrent que les AINS peuvent fournir un motif structural de base afin de générer des nouveaux agents anti-amyloïdogènes prometteurs qui pourront être utilisés en monothérapie ou en thérapie co-adjuvante.

Inhibition of islet amyloid polypeptide (IAPP) aggregation and associated cytotoxicity by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

Jessica S. Fortin and Marie-Odile Benoit-Biancamano

Abstract

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) constitute an important pharmacotherapeutic class which, over the past decade, have expanded in application to a panoply of medical conditions. They have been tested for neurodegenerative diseases such as Alzheimer's to reduce the inflammation and also in the attempt to abrogate amyloid deposition. However, the use of NSAID as aggregation inhibitors has not been extensively studied in pancreatic amyloid deposition. Pancreatic amyloidosis involves the misfolding of islet amyloid polypeptide (IAPP) and contributes to the progression of type 2 diabetes in the human and feline. To ascertain their anti-amyloidogenic activity, several NSAIDs were tested using fluorometric ThT assays, circular dichroism, photo-induced cross-linking assays and cell culture. Celecoxib, diclofenac, indomethacin, meloxicam, niflumic acid, nimesulide, phenylbutazone, piroxicam, sulindac, tenoxicam reduced fibrillization at a molar ratio of 1:10. The circular dichroism spectra of diclofenac, piroxicam and sulindac showed characteristic spectral signatures found in predominantly α -helical structures. The oligomerization of hIAPP was abrogated with diclofenac and sulindac at a molar ratio of 1:5. The cytotoxic effects of pre-incubated hIAPP on cultured INS-1 cells were noticeably reduced in the presence of

diclofenac, meloxicam, phenylbutazone, sulindac and tenoxicam at a molar ratio of 1:10. Our results demonstrate that NSAIDs can provide chemistry scaffolds to generate new promising anti-amyloidogenic agents that can be used alone or as a coadjuvant therapy.

Key words: Amyloid, anti-amyloidogenic activity, degenerative disease, fibrils, IAPP, NSAID, protein misfolding, type 2 diabetes.

Introduction

Diseases involving abnormal folding of proteins and conversion to an insoluble state are numerous in human and veterinary medicine, with more than thirty diseases related specifically to amyloid formation, including Alzheimer's disease (AD), type 2 diabetes, Parkinson's disease, prion disease and familial amyloidosis (Sipe et al. 2014). Protein misfolding, in amyloidosis, is characterized by a monomeric protein which is assembled into β -sheet insoluble fibrils (Hard and Lendel 2012). These amyloid deposits damage the cell membrane, inducing reactive oxygen species and apoptosis (Abedini and Schmidt 2013; Jayasinghe and Langen 2007; Jelinek and Sheynis 2010). Amyloid deposits may be localized in a tissue or generalized in different organs depending on the origin of the constitutive protein (Hard and Lendel 2012; Sipe et al. 2014). Amyloidogenic proteins do not share a common amino acid sequence nor a similar secondary or tertiary conformation in the native state. However, all types of amyloid have in common the formation of fibrils, with unique physicochemical characteristics as follows: a diameter of 5-15 nm, a cross- β sheet quaternary structure, a poor solubility in acidic or basic environments, and a resistance to extreme temperatures (Cheng et al. 2013; Hard and Lendel 2012). Several amyloidogenic proteins, such as TTR, are rich in beta-sheet in their soluble native conformation.

In the past few decades, extensive effort has been expended to understand the pathophysiology of amyloidosis related to degenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) and type 2 diabetes, potentially leading to new therapeutic strategies. Although the actual details of many of the steps are unclear, the assembly of amyloidogenic proteins into a fibrillar structure occurs in stepwise fashion. An apparent early step in the aggregation is the formation of a set of conformationally diverse oligomers (Brender et al. 2015; Buchanan et al. 2014; Mishra et al. 2009), present at low abundance (Suzuki et al. 2012), with structures

different from either the native largely unstructured peptide (Reddy et al. 2010; Williamson and Miranker 2007; Yonemoto et al. 2008) or the mature amyloid fiber (Luca et al. 2007). Subsequently, the oligomers assemble into a mature fibril. At this point, the proteins have a β -sheet secondary structure (Luca et al. 2007; Westermark et al. 2011). In parallel, these oligomers act as a seed, thereby initiating the aggregation and propagation of fibrils (Westermark et al. 2011). Although several factors can influence the fibrillar aggregation, the precise mechanisms are not clearly identified. More research on the mechanisms underlying the fibrillar aggregation will be crucial in the discovery of new anti-amyloidogenic agents. The development of an inhibitor is also challenging considering that it doesn't require to stabilize solely the native protein or the oligomers (Cheng et al. 2013; Hard and Lendel 2012; Porat et al. 2006). The most common approach in pharmaceutical discovery research against amyloidogenic proteins involves exploring inhibitors of fibrillar deposition (Cheng et al. 2013; Hard and Lendel 2012; Porat et al. 2006). Perhaps, the best way to inhibit amyloid formation is by stabilizing the native conformation by small molecules, i.e. Tafamidis and TTR.

Substantive clinical research has focused on inflammation as a critical component in amyloidogenic diseases. The use of NSAIDs has been demonstrated to delay the onset of Alzheimer's disease (AD) (Dong et al. 2014; Lim et al. 2000; Yan et al. 2003). Whether selective COX-2 inhibitors have clinical benefits with direct effects on brain amyloid deposition remain to be elucidated. Interestingly, the diarylamine classes, including diclofenac, were effective in inhibiting fibril formation related to other diseases, such as familial amyloid cardiomyopathy (FAC) and familial amyloid polyneuropathy (FAP), that involve transthyretin (TTR) amyloid formation (Oza et al. 2002). Others studies were performed in the attempt to inhibit amyloid formation related to type 2 diabetes. Amyloid deposits localized in the islets involve the misfolding of islet amyloid polypeptide (IAPP) and contribute to the progression of type 2 diabetes in human and diabetes mellitus in adult cats (Hoppener et al. 2002; Jaikaran and Clark 2001; O'Brien et al. 1993; Westermark et al. 2011). The effect of aspirin and ketoprofen were examined in pancreatic amyloidosis (Tu et al. 2014). However, these drugs failed to inhibit amyloid formation or to disaggregate preformed fibrils (Tu et al. 2014).

The implication of NSAIDs as IAPP aggregation inhibitors has not been extensively explored and their clinical benefits remain to be elucidated. This study focusses on the investigation of NSAIDs in inhibiting amyloidosis related to type 2 diabetes, with a potential therapeutic target of hIAPP fibrils. We describe the inhibition activity of a number of commercially available NSAIDs on hIAPP fibrils formation. The information gained from this study will help further structure-activity relationship studies for designing new derivatives with improved potency.

Methods

Chemicals

Aceclofenac, diclofenac, DMSO, Hexafluoroisopropanol (HFIP), ibuprofen, ketoprofen, meloxicam, naproxen, nimesulide, phenylbutazone, resveratrol, resazurin, silibinin, sulindac, tenoxicam and thioflavin-T (ThT) were obtained from Alfa Aesar (Ward Hill, MA). Celecoxib, etoricoxib, indometacin, ketorolac, flurbiprofen, niflumic acid, oxaprozin, piroxicam, rofecoxib and valdecoxib were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Cell line and culture

INS-1 (rat insulinoma) cells were purchased from AddexBio (San Diego, CA) and cultured in RPMI1640 medium supplemented with 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1X sodium pyruvate, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 100 U/mL streptomycin, 100 U/mL of penicillin G and 10 % fetal bovine serum (Wisent Inc., St-Bruno, Qc, Canada). Cells were maintained in a moisture saturated atmosphere at 37 °C under 5% CO₂.

Peptide synthesis

Synthetic hIAPP (1-37) was obtained from Peptidogen International Corp (Brossard, Qc, Canada). Peptides were prepared, as previously published, with a microwave peptide synthesizer, using 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry, and Fmoc-protected pseudoproline dipeptide derivatives were incorporated to facilitate the synthesis (Cao et al. 2013). The peptides were purified by reverse-phase HPLC using a C18 preparative column. The identity of the pure products was confirmed by mass spectrometry using a Bruker

MALDI-TOF MS. Analytical HPLC was used to check the purity of the peptides ($\geq 95\%$) before each experiment. The purified peptide was lyophilized.

Sample preparation

hIAPP stock solutions were prepared by dissolving the hIAPP peptide at 1 mM in 100% HFIP and incubating for at least 12 h. For the ThT kinetics, circular dichroism spectrometry and photo-induced cross-linking based oligomerization assays, hIAPP peptide stock solutions were prepared by dissolving peptides at 1 mM in 100% HFIP. For the cytotoxicity assays, the IAPP peptide stock solutions of 1 mM were divided in aliquots to obtain the desired final concentration and were air-dried. Aliquots of the stock solutions were dried to remove organic solvents and suspended in 10 mM PBS buffer (pH 7.4) at the desired concentration. hIAPP was dissolved in DMSO and PBS. DMSO was used at a final concentration lower than 0.1 % (v/v) to avoid cell toxicity.

Thioflavin T (ThT) fluorescence assay

hIAPP peptide from the stock solution of 1mM were added to 10 mM PBS buffer (pH 7.4) and transferred to a black 96-well microplate with transparent bottom (Corning Incorporated Costar® 3603). Each well contained a final volume of 150 μ L with a peptide final concentration of 10 μ M. Experiments in the presence of hIAPP were initiated by adding a solution of ThT at a final concentration of 10 μ M ThT with different drug treatments. Final drug concentrations ranged from 25 to 100 μ M. All drugs were dissolved in DMSO at a final concentration lower than 0.25 % (v/v). The vehicle DMSO was tested on hIAPP, without drug treatment, and did not change the kinetics.

The background signal consisted of 1 % HFIP without peptide. Thioflavin T-based fluorescence assays were used to detect the formation of amyloid. The fluorescence emission experiments were performed with the excitation and emission wavelengths set at 440 and 485 nm, respectively, with a Synergy HT multi-mode microplate reader (BioTek, Winooski, VT). Measurements were taken with two different periods of agitation prior to plate reading. Agitation during incubation leads to shorter aggregation times due to the increased rate of nucleation due to the formation of new nuclei by the breakage of amyloid fibers during agitation (Padrick and Miranker 2002; Ruschak and Miranker 2007; Shvadchak et al. 2015).

For measurements with long agitation, measurements were taken at room temperature every 2 min with 10 seconds shaking prior measurements over 6 h. Short agitation measurements were obtained by shaking the plate prior measurement for 5 sec to ensure proper mixing and subsequently measuring the fluorescence intensity every 10 min. Samples were measured in three replicates and the experiments were repeated three times using different IAPP stock solutions. For each time point, arbitrary units of fluorescence were calculated from the mean values normalized against the maximum value in each completed assay. Arbitrarily, the maximum value (100 %) for the fluorescence intensity was established for hIAPP peptide. The lag time and the T_{50} were calculated as previously described (Zhang et al. 2011).

Far-Ultraviolet (UV) circular dichroism (CD)

CD spectra of the secondary structure of hIAPP samples were recorded at 25 °C under a constant flow of N_2 using a JASCO-810 spectropolarimeter (Jasco, Easton, MD). Spectra were recorded over a wavelength range of 190–250 nm using a quartz cuvette of 1 mm path length and an instrument scanning speed of 100 nm/min, with a response time of 2 sec and a bandwidth of 1 nm. Samples were not agitated. All IAPP samples were dissolved to a final concentration of 15 μ M in 10 mM PBS (pH 7.4) and 1% HFIP, and where appropriate, the samples contained different drug treatments at a final concentration of 25 μ M. Each result is given as the average scans taken of three measurements at room temperature. The data were converted to mean residue ellipticity (θ) and analyzed using the software CDPro as previously described (Sreerama and Woody 2004). All CD spectra were averaged, smoothed and baseline-corrected for signal contributions due to the buffer.

Photo-induced cross-linking (PICUP) assay

hIAPP was diluted in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) to a final concentration of 250 μ M peptide and 1% HFIP. The peptide solution was sonicated for 1 min. Drugs were also freshly dissolved in DMSO and added to the peptide solution at a molar ratio of 1:5 (hIAPP:compound). The control consisted of samples that were photo-cross-linked using the PICUP method as described (Bitan and Teplow 2004). The reaction buffer consisted of 938 μ M Ru(bpy), 18.8 mM ammonium persulfate and 250 μ M hIAPP. Cross-linking was induced by irradiation, for 3 s, of the mixture, at a final volume of 60 μ L, with a 150 W incandescent

lamp installed in a homemade dark-box. After irradiation, 25 μL of Lammeli loading buffer was immediately added to the solution, followed by incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min. The cross-linked samples were separated on a 16% Tricine-urea gel and visualized by silver staining.

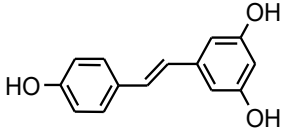
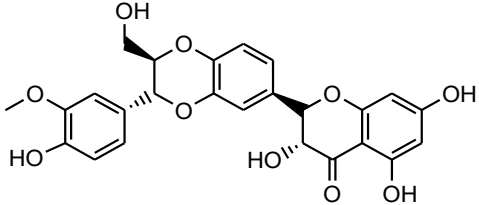
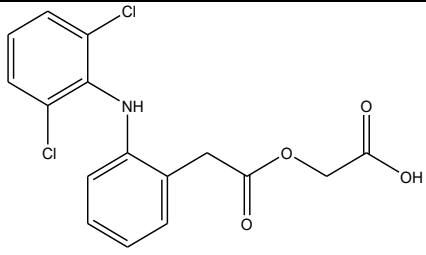
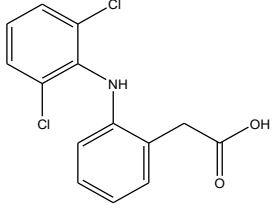
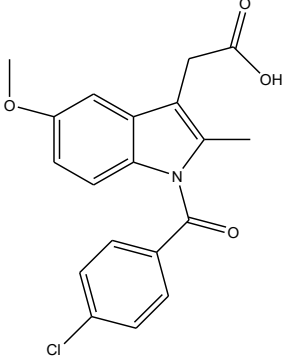
Cell viability assay

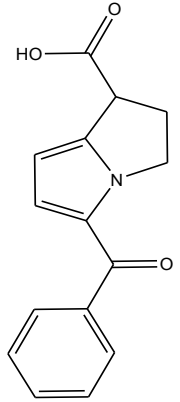
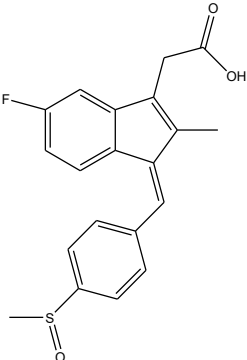
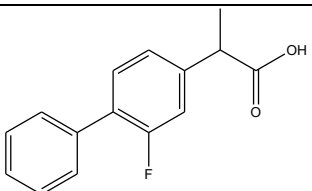
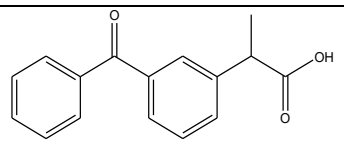
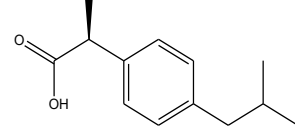
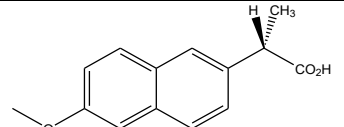
Cells were maintained in a 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 incubator, in exponential growth, for the duration of experimentation. For this assay, cells were seeded in 96-well microtiter plates at a density of 5×10^3 Ins-1 cells per well for 24 h. Drugs freshly solubilized in DMSO were diluted in culture medium and aliquots containing sequential dilution of drugs were added subsequently after stimulation with 2.5 μM of hIAPP. hIAPP was dissolved and incubated in 10 mM PBS (pH 7.4, 25 $^{\circ}\text{C}$) 24 h before addition to cells. Drugs were tested at 25 and 50 μM and DMSO concentration was maintained at 0.1 % to avoid growth inhibition. Negative control consisted of DMSO with no added drug. Plates were incubated for 24h in the presence of drugs and hIAPP. Resazurin-based reduction assays were performed as previously described (Fortin et al. 2010). Briefly, resazurin (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to the culture medium of each well for 1h30 at 37 $^{\circ}\text{C}$. The cell viability was calculated from fluorescence (excitation, 530 nm; emission, 590 nm) measured with a Synergy HT multi-mode microplate reader (BioTek, Winooski, VT). The data from experiments conducted in triplicate were corrected for the background fluorescence of the medium and was expressed as the mean percentage of fluorescence obtained for control DMSO-treated cells. The growth inhibition percentage was calculated with reference to DMSO-treated cells for each drug concentrations. The results were obtained from at least three separated experiments. The cell viability assay was considered valid when the variability among data for a given set of conditions, within the same experiment, was less than 10% with respect to the mean value. All values represent means \pm SEM (n = 3).

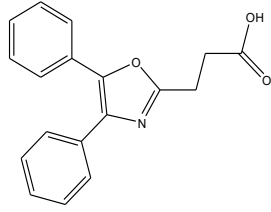
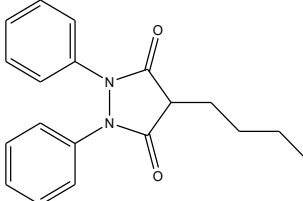
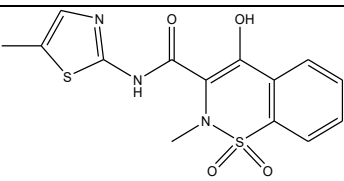
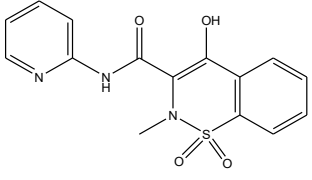
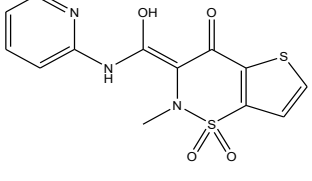
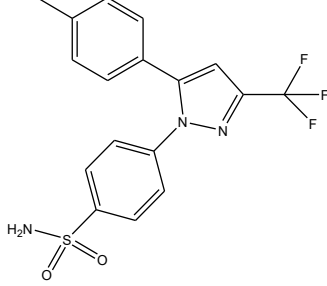
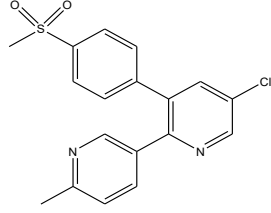
Statistical analysis

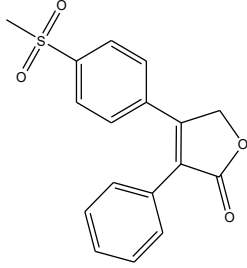
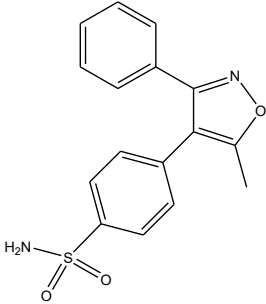
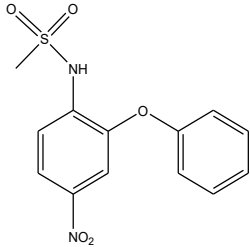
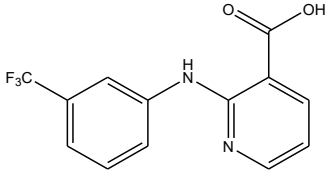
All results in Table 2, Table 3 and Figure 4 were presented as mean \pm SD. For the cell viability assays, data were analyzed by the one-way analysis of variance with Dunnett's multiple comparison between IAPP and several drug treatments. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ and $p < 0.001$.

Table 1. Classification and molecular structure of positive controls and NSAIDs used in this study.

Pharmacological class		Generic name	Molecular structure
Positive controls		Resveratrol	
		Silibinin	
Acetic acids	Phenylacetic acids	Aceclofenac	
		Diclofenac	
	Carbo- and Hetero-Cyclic Acetic Acids	Indomethacin	

		Ketorolac	
		Sulindac	
Propionic acids		Flurbiprofen	
		Ketoprofen	
		Ibuprofen	
		Naproxen	

		Oxaprozin	
Enolic acids	Pyrazolone	Phenylbutazone	
	Oxicams	Meloxicam	
		Piroxicam	
		Tenoxicam	
Selective COX-2 inhibitors		Celecoxib	
		Etoricoxib	

	Rofecoxib	
	Valdecoxib	
Sulfonanilide	Nimesulide	
Aminopyridine	Niflumic acid	

Results

NSAIDs are effective inhibitors of hIAPP aggregation

Table 1 displays the classification and molecular structure of NSAIDs used in this study. The effects of NSAIDs on the kinetics of hIAPP fibrillization using thioflavin T (ThT) fluorescence assay were examined. ThT binds to the cross β -structure of amyloid fibrils, theoretically in the surface grooves generated by stacking parallel β -sheets (Buell et al. 2010). The self-quenching of the fluorescent dye is relieved by the conformational changes induced by amyloid binding, resulting in fluorescence enhancement (Buell et al. 2010). The expected sigmoidal time course is observed when hIAPP is incubated without drug treatments (**Fig. 1**) (Paulsson et al. 2011). In the absence of drugs, the time required to reach half of the total

fluorescence signal (T_{50}) was 39.9 ± 0.2 min for samples with longer agitation during measurement and $105,3 \pm 0.7$ min for samples with shorter agitation during measurement. For both samples, diclofenac and phenylbutazone significantly increased the T_{50} at a molar ratio of 1:10 (10 μ M of hIAPP:100 μ M of drug) (**Table 2** and **Table 4**). Positive controls (resveratrol, silibinin) (Cheng et al. 2012; Jiang et al. 2011) and NSAIDs treatments shown in **Fig. 1** (celecoxib, diclofenac, indomethacin, meloxicam, niflumic acid, nimesulide, phenylbutazone, piroxicam, sulindac, tenoxicam) significantly reduced the fluorescence intensity at a molar ratio of 1:10. The curves in these graphs exhibit a different slope for the treated and untreated groups. The time during which no significant fibril formation occurs followed by a rapid growth phase (lag time) was shorter for meloxicam, nimesulide, piroxicam, sulindac, tenoxicam, resveratrol and silibinin in **Table 4**. Interestingly, diclofenac and phenylbutazone prolonged the lag time. NSAID treatments such as niflumic acid, nimesulide and sulindac maintained their efficacy in reducing the amyloidogenicity of hIAPP fibrils using a molar ratio of 1:5 (10 μ M of hIAPP:50 μ M of drug). The ThT fluorescence of h-IAPP was reduced by the presence of 25 μ M and 50 μ M of meloxicam (**Table 3**). Other NSAIDs, such as COX-2 inhibitors, had no detectable effect on the kinetics of amyloid formation and the final fluorescence intensity.

Table 2. Fibrillar aggregation properties of hIAPP incubated with different drug treatments at 100 μ M, molar ratio 1:10. Data were obtained using a longer agitation. Standard deviation for each parameter was calculated.

NSAIDs (100 μ M)	Fibril Formation ^a			
	Lag time ^b (min)	T ₅₀ ^c (min)	Intensity ^d (%)	Amyloidogenic ^e
Aceclofenac	17.6 \pm 0.8	40.8 \pm 0.3	89.1 \pm 0.4	+++
Celecoxib	13.1 \pm 0.7	22.9 \pm 0.7	74.0 \pm 0.4	++
Deracoxib	19.2 \pm 0.4	39.2 \pm 0.5	115.0 \pm 0.5	+++
Diclofenac	20.7 \pm 0.8	45.5 \pm 0.3	55.9 \pm 0.3	++
Etoricoxib	27.6 \pm 0.4	44.2 \pm 0.3	118.8 \pm 0.7	+++
Flurbiprofen	21.6 \pm 0.6	41.5 \pm 0.2	105.8 \pm 0.4	+++
Ibuprofen	23.1 \pm 0.5	40.1 \pm 0.2	112.7 \pm 0.5	+++
Indomethacin	19.1 \pm 0.9	43.8 \pm 0.3	75.9 \pm 0.7	++
Ketoprofen	21.9 \pm 0.6	39.4 \pm 0.2	106.1 \pm 0.3	+++
Ketorolac	21.5 \pm 0.6	37.9 \pm 0.2	111.6 \pm 0.4	+++
Meloxicam	16.3 \pm 0.7	37.9 \pm 0.4	32.8 \pm 0.2	+
Naproxen	20.0 \pm 0.6	38.3 \pm 0.2	106.7 \pm 0.5	+++
Niflumic acid	17.6 \pm 0.3	41.6 \pm 0.5	45.9 \pm 0.4	++
Nimesulide	19.2 \pm 0.2	37.0 \pm 0.3	39.9 \pm 0.2	++
Oxaprozin	19.6 \pm 0.7	37.9 \pm 0.2	114.9 \pm 0.4	+++
Phenylbutazone	21.4 \pm 0.4	43.9 \pm 0.5	62.8 \pm 0.7	++
Piroxicam	16.6 \pm 2.0	38.4 \pm 0.3	62.2 \pm 0.3	++
Rofecoxib	21.7 \pm 0.6	40.1 \pm 0.2	105.6 \pm 0.5	+++
Sulindac	17.6 \pm 0.3	39.9 \pm 0.4	39.8 \pm 0.2	++
Tenoxicam	17.8 \pm 1.6	38.1 \pm 0.2	60.1 \pm 0.2	++
Valdecoxib	23.4 \pm 0.6	39.9 \pm 0.2	103.4 \pm 0.4	+++
Resveratrol	7.2 \pm 1.0	11.6 \pm 1.0	10.7 \pm 0.4	-
Silibinin	17.6 \pm 0.2	40.1 \pm 0.5	52.1 \pm 0.5	++
HFIP 1%	23.2 \pm 0.6	39.9 \pm 0.2	100.0 \pm 0.3	+++

^a The concentration of hIAPP was 10 μ M.

^b The lag time indicates the time during which no significant fibril formation occurs followed by a rapid growth phase.

^c The T_{50} represents the time to reach half of the maximum signal strength.

^d The fluorescence intensity of hIAPP alone was set as 100 %.

^e The amyloidogenic parameter is a semi-quantitative analysis of ThT-fluorescence based amyloid formation: "+++" indicates samples with fluorescence intensity greater than 75 %, "++" represents values between 40 and 75 %, "+" is set for values between 10 and 40 %, and "-" underlines values lower than 10 %.

Table 3. Fibrillar aggregation properties of hIAPP incubated with different effective drug treatments at 25 and 50 μM . Data were obtained using a longer agitation. Standard deviation for each parameter was calculated.

NSAIDs	Fibril Formation ^a			
	Lag time ^b (min)	T ₅₀ ^c (min)	Intensity ^d (%)	Amyloidogenic ^e
50 μM, molar ratio 1:5				
Celecoxib	19.1 \pm 0.5	32.8 \pm 0.2	131.0 \pm 0.8	+++
Diclofenac	17.4 \pm 0.6	31.4 \pm 0.2	77.2 \pm 0.5	+++
Indomethacin	13.8 \pm 0.6	29.2 \pm 0.2	107.6 \pm 0.7	+++
Meloxicam	14.0 \pm 0.6	29.1 \pm 0.2	46.7 \pm 0.3	++
Niflumic acid	15.9 \pm 0.4	30.6 \pm 0.3	63.0 \pm 0.6	++
Nimesulide	15.7 \pm 0.6	30.0 \pm 0.2	54.7 \pm 0.3	++
Phenylbutazone	17.4 \pm 0.5	31.6 \pm 0.2	76.4 \pm 0.6	+++
Piroxicam	13.8 \pm 0.4	27.5 \pm 0.2	93.6 \pm 0.7	+++
Sulindac	15.5 \pm 0.4	29.7 \pm 0.2	58.3 \pm 0.5	++
Tenoxicam	15.3 \pm 0.5	27.9 \pm 0.2	94.3 \pm 0.5	+++
Resveratrol	8.5 \pm 0.8	21.8 \pm 0.6	19.9 \pm 0.2	+
Silibinin	17.3 \pm 0.5	30.8 \pm 0.1	83.3 \pm 0.5	+++
25 μM, molar ratio 1:2.5				
Diclofenac	17.7 \pm 0.4	31.3 \pm 0.3	95.7 \pm 1.0	+++
Meloxicam	15.3 \pm 0.3	28.2 \pm 0.4	64.0 \pm 0.7	++
Niflumic acid	15.9 \pm 0.3	30.5 \pm 0.4	77.1 \pm 1.1	+++
Nimesulide	17.4 \pm 0.4	30.0 \pm 0.2	77.3 \pm 0.5	+++
Phenylbutazone	17.3 \pm 0.4	29.9 \pm 0.2	91.9 \pm 0.7	+++
Sulindac	17.0 \pm 0.3	29.7 \pm 0.3	74.1 \pm 0.8	+++
Resveratrol	13.1 \pm 0.7	27.6 \pm 0.2	29.8 \pm 0.2	+
Silibinin	17.5 \pm 0.3	30.1 \pm 0.3	101.2 \pm 0.9	+++
HFIP 1%	17.3 \pm 0.8	36.5 \pm 0.2	100 \pm 1.0	+++

^a The concentration of hIAPP was 10 μM .

^b The lag time indicates the time during which no significant fibril formation occurs followed by a rapid growth phase.

^c The T₅₀ represents the time to reach half of the maximum signal strength.

^d The fluorescence intensity of hIAPP alone was set as 100 %.

^e The amyloidogenic parameter is a semi-quantitative analysis of ThT-fluorescence based amyloid formation: "+++" indicates samples with fluorescence intensity greater than 75 %, "++" represents values between 40 and 75 %, "+" is set for values between 10 and 40 %, and "-" underlines values lower than 10 %.

Table 4. Fibrillar aggregation properties of hIAPP incubated with different drug treatments at 100 μM, molar ratio 1:10. Data were obtained using a shorter agitation. Standard deviation for each parameter was calculated.

NSAIDs (100 μM)	Fibril Formation ^a				
	Lag time ^b (min)	T ₅₀ ^c (min)	Slope	Intensity ^d (%)	Amyloidogenic ^e
Diclofenac	69.3 ± 1.6	142.0 ± 1.1	35.4 ± 1.2	58.5 ± 0.7	++
Meloxicam	38.9 ± 1.4	86.6 ± 2.1	35.1 ± 1.8	41.1 ± 0.4	++
Niflumic acid	52.7 ± 2.0	101.4 ± 1.0	29.5 ± 1.0	56.2 ± 0.4	++
Nimesulide	33.7 ± 2.4	73.6 ± 1.9	24.5 ± 1.6	59.0 ± 0.5	++
Phenylbutazone	64.8 ± 2.6	141.1 ± 0.4	35.3 ± 0.6	72.8 ± 0.4	++
Piroxicam	32.9 ± 2.1	70.6 ± 1.7	25.2 ± 1.3	75.5 ± 0.5	+++
Sulindac	27.6 ± 2.3	67.5 ± 2.5	27.8 ± 1.8	55.7 ± 0.5	++
Tenoxicam	42.2 ± 2.4	85.7 ± 1.6	27.0 ± 1.4	71.1 ± 0.6	++
Resveratrol	32.0 ± 1.2	51.5 ± 1.8	14.9 ± 1.4	8.8 ± 0.1	-
Silibinin	33.5 ± 2.1	74.2 ± 2.1	26.8 ± 1.7	54.5 ± 0.5	++
HFIP 1%	53.8 ± 2.3	105.3 ± 0.7	29.2 ± 0.7	101.2 ± 0.5	+++

^a The concentration of hIAPP was 10 μM.

^b The lag time indicates the time during which no significant fibril formation occurs followed by a rapid growth phase.

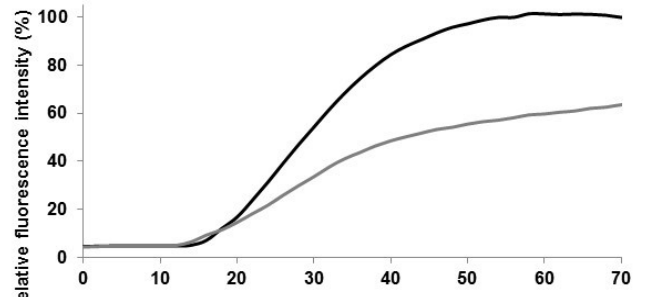
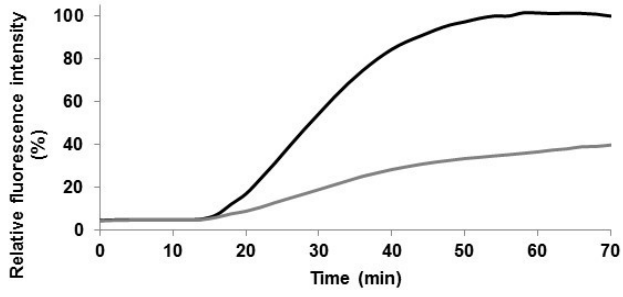
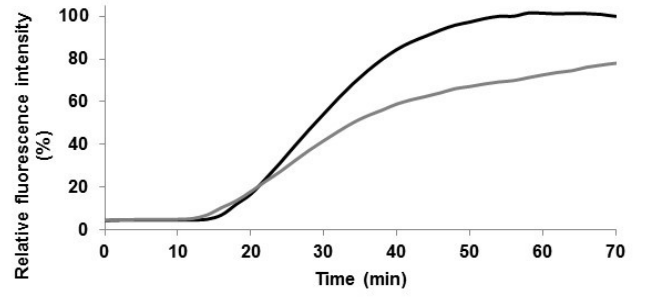
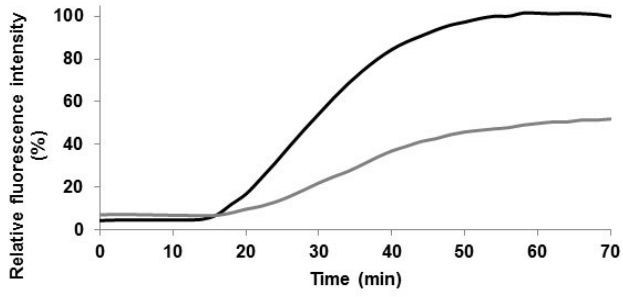
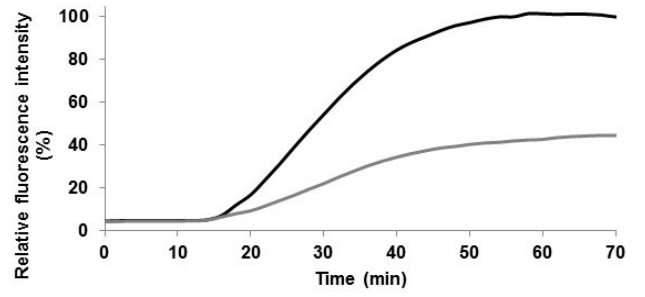
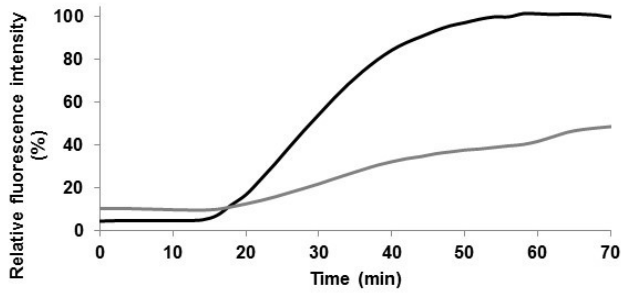
^c The T₅₀ represents the time to reach half of the maximum signal strength.

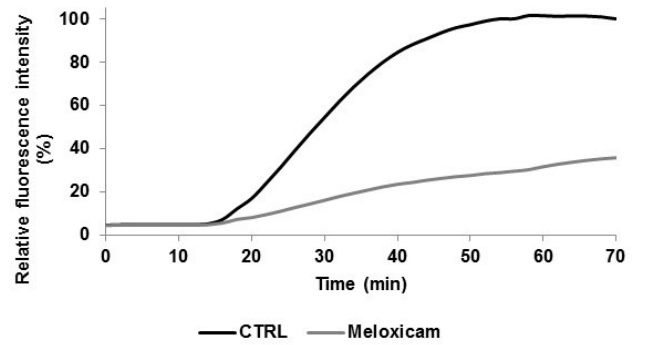
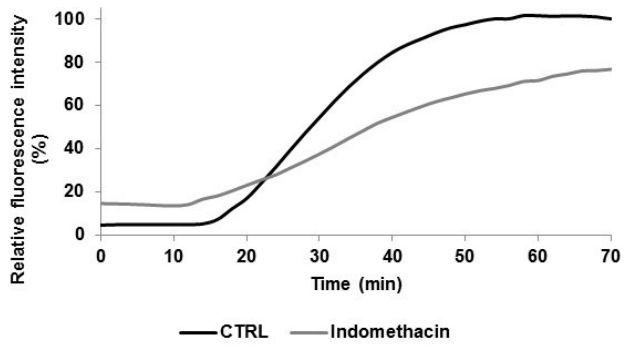
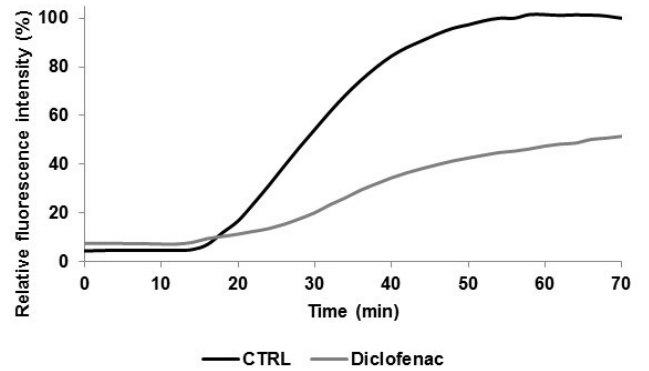
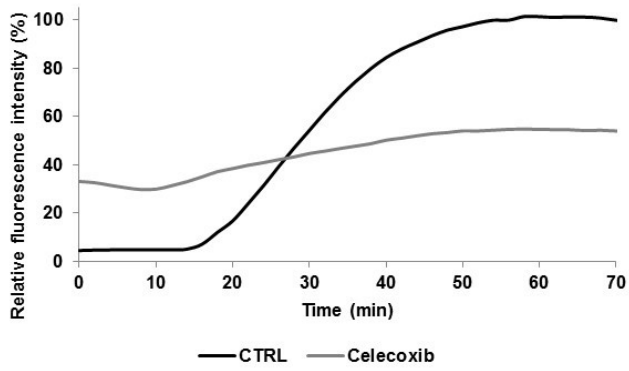
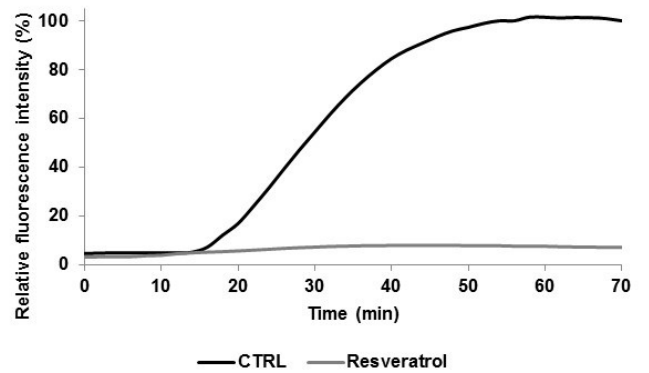
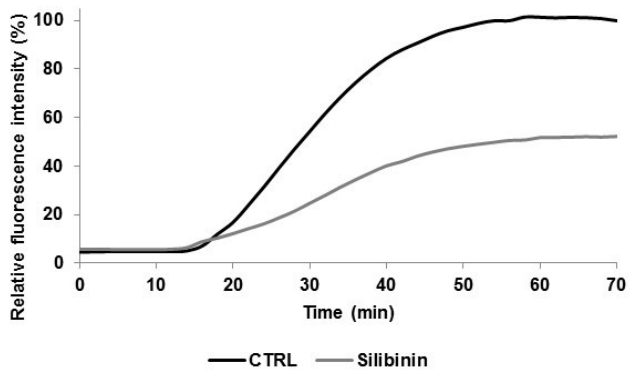
^d The fluorescence intensity of hIAPP alone was set as 100 %.

^e The amyloidogenic parameter is a semi-quantitative analysis of ThT-fluorescence based amyloid formation: "+++" indicates samples with fluorescence intensity greater than 75 %, "++" represents values between 40 and 75 %, "+" is set for values between 10 and 40 %, and "-" underlines values lower than 10 %.

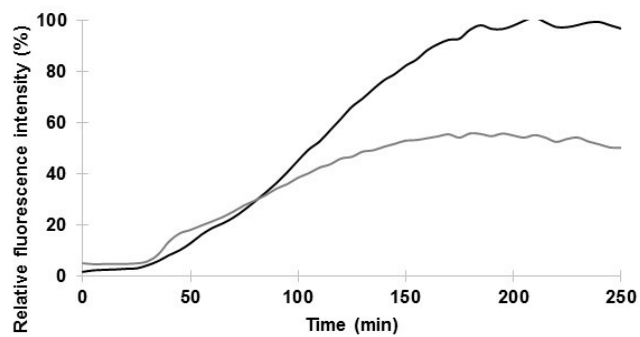
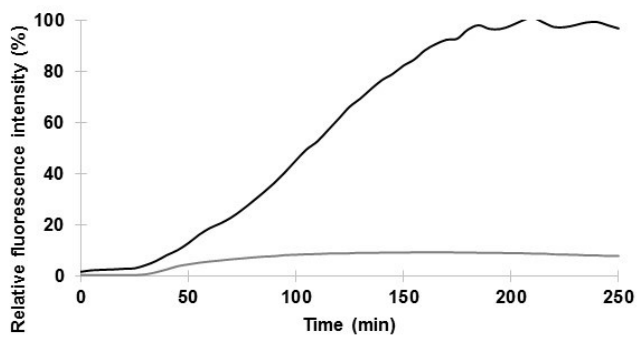
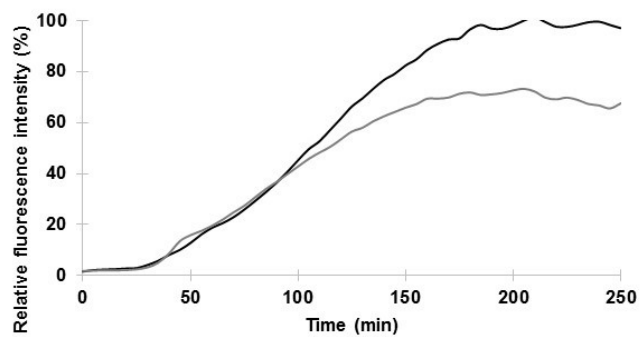
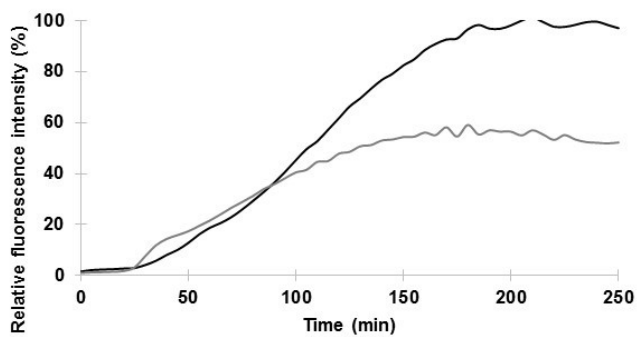
Fig. 1. A Relative ThT fluorescence intensity of hIAPP with different effective drug treatments (silibinin, resveratrol, celecoxib, diclofenac, indomethacin, meloxicam, niflumic acid, nimesulide, phenylbutazone, piroxicam, sulindac, and tenoxicam) tested at a concentration of 100 μ M (longer agitation). ThT-fluorescence of hIAPP was assessed at 25°C in PBS buffer at a peptide concentration of 10 μ M and a molar ratio of 1:10. **B** Relative ThT fluorescence intensity of hIAPP with identical drug treatments obtained from a shorter agitation.

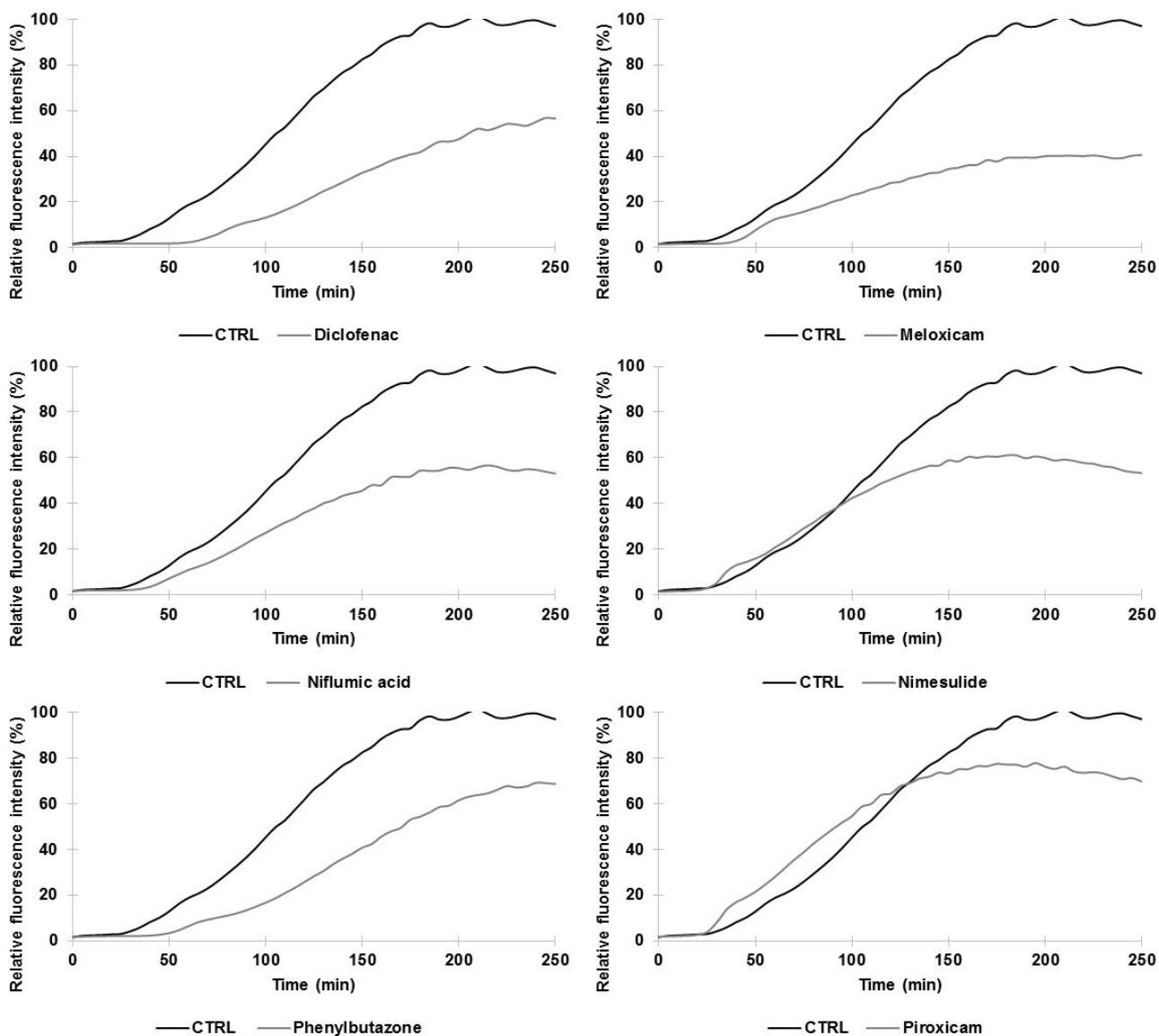
A





B



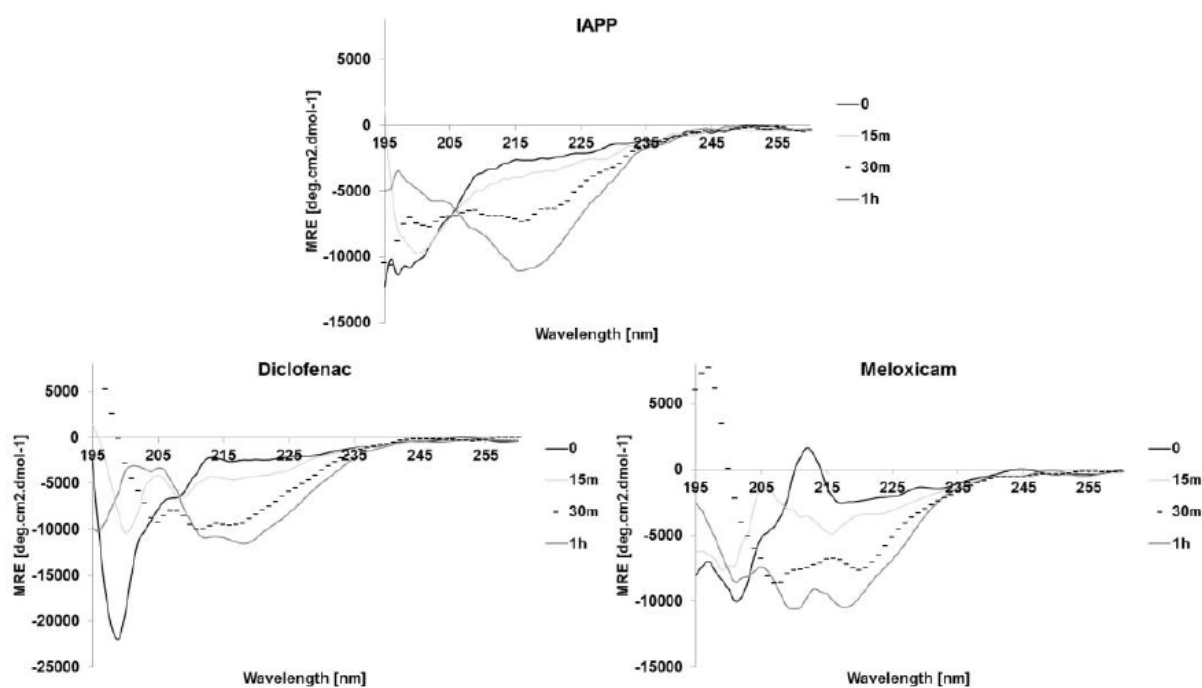


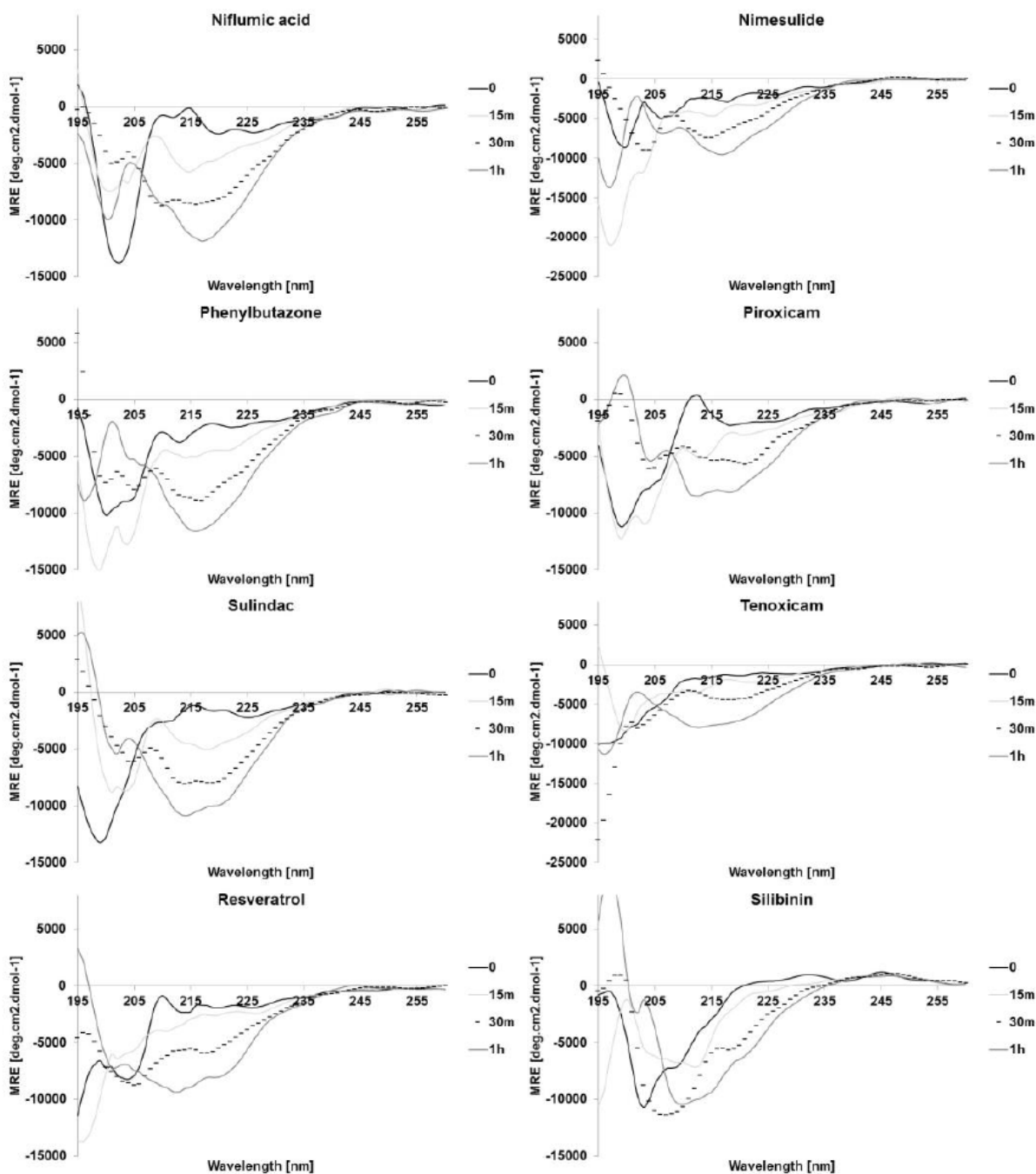
NSAIDs induce secondary structure changes of hIAPP

Amyloid formation involves the oligomerization of hIAPP and the formation of mature linear fibrils by the oligomer self-assembly (Buchanan et al. 2013; Cao et al. 2013; Hard and Lendel 2012). The first and the last steps are characterized by the α -helical structure and β -sheet structure, respectively (Buchanan et al. 2013; Cao et al. 2013; Hard and Lendel 2012). To monitor the effect of NSAIDs on hIAPP oligomerization and self-assembly into mature fibrils, the secondary structure was determined by Far-UV CD. Spectra were recorded using hIAPP at 15 μ M and drug treatments at 25 μ M (molar ratio of 1:1.67). The assay is limited by

the spectral interference of aromatic compounds at higher concentration. Random coil structures were predominant for the untreated condition at an incubation time of time 0 and 15 minutes (data not shown). Spectra indicative of random coil structure are characterized by a single minimum around 200-205 nm. A conformational transition to β -sheet occurred after an incubation time of 30 minutes (data not shown). After an incubation time of 1h, a major negative peak at 220 nm was observed, indicative of a predominant β -sheet secondary structure. The CD spectra recorded at an incubation time of 1h were shown to compare the untreated and treated conditions (**Fig. 2**).

Fig. 2. Far-UV circular dichroism spectra of hIAPP recorded in the presence of the vehicle (1% HFIP) or different drug treatments. Spectra were recorded at 25°C in PBS buffer using hIAPP at 15 μ M and drug treatments at 25 μ M (molar ratio of 1:1.67). The incubation time were 0, 15, 30 and 60 min.





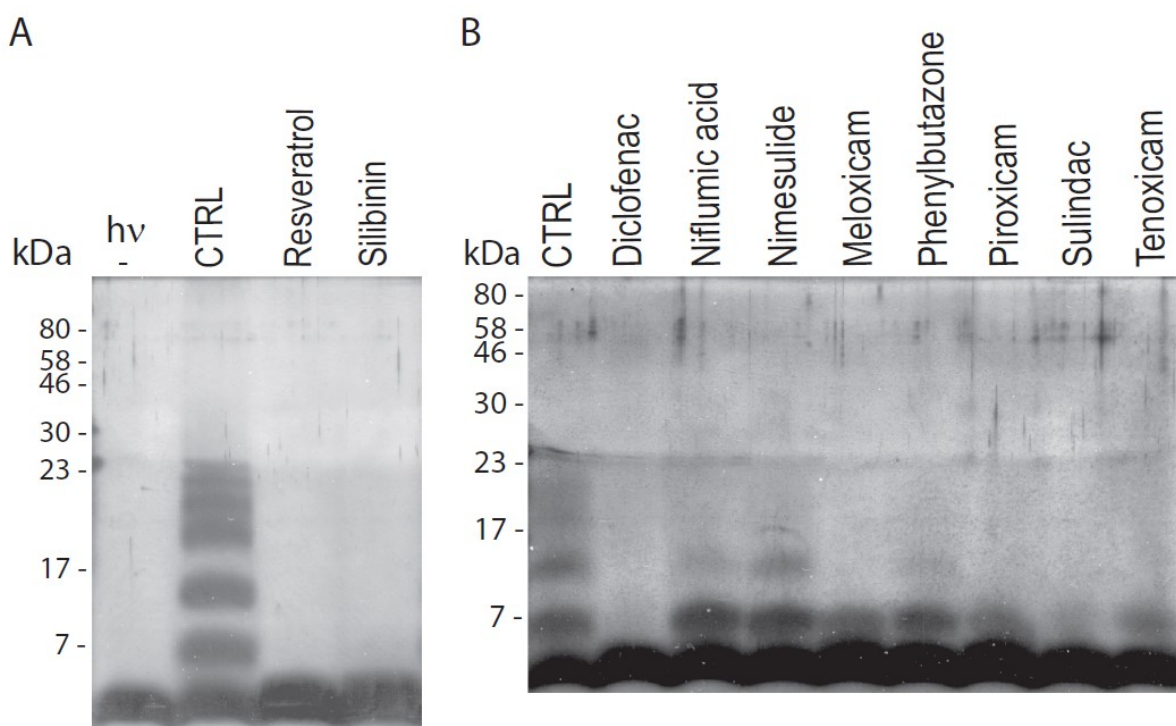
The CD spectra of niflumic acid, phenylbutazone, and nimesulide showed evidence of extensive β -sheet formation at the final time point, suggesting the decrease in ThT fluorescence intensity may be due to the displacement of the ThT dye (Suzuki et al. 2012) or to the formation of non-fibrillar but still β -sheet aggregates. The spectrum of IAPP in presence of diclofenac, piroxicam and, to a lesser extent,

sulindac shows the two negative peaks at 208 nm and around 220-221 nm characteristic of the exciton splitting found in predominantly α -helical structures. Silibinin, tenoxicam, and meloxicam showed a mixed β -sheet/random coil spectra at the final time-point, indicating a delayed transition or the formation of more disordered aggregates than the fibers produced in the absence of these inhibitors. Resveratrol showed a more complicated, less easily interpreted spectrum.

NSAIDs abrogate the oligomerization of hIAPP

Soluble oligomeric species of hIAPP contribute to the deleterious cellular effect by binding to bilipidic membranes leading to cell membrane leakage (Buchanan et al. 2013; Cao et al. 2013; Gurlo et al. 2010; Jayasinghe and Langen 2007; Jelinek and Sheynis 2010; Khemtemourian et al. 2008). PICUP assays were performed to determine the effect of NSAIDs on the oligomerization of hIAPP. The potent NSAIDs in affecting hIAPP aggregate were tested at a molar ratio of 1:5. Without NSAID and irradiation treatments, hIAPP was predominantly in a monomeric state. When hIAPP was subjected to light exposure, a mixture of monomer, dimer, trimer, tetramer and higher oligomers was obtained (**Fig. 3**), illustrating the strong oligomerization potential of hIAPP. The oligomerization of hIAPP was inhibited for samples treated with resveratrol and silibinin, consistent with previous experiments (Cheng et al. 2012; Jiang et al. 2011).

Fig. 3. Oligomerization status of hIAPP studied by the photo-induced cross linking (PICUP) assay. (a) Lane 1, hIAPP without irradiation; lane 2, hIAPP irradiated for 3 sec; lanes 3-4, hIAPP with positive controls irradiated for 3 sec. The molar ratio was 1:5, 0.25 mM of hIAPP and 1.25 mM of positive controls (resveratrol and silibinin). (b) Lane 1, hIAPP irradiated for 3 sec; lanes 2-9, hIAPP with different drug treatment irradiated for 3 sec. The molar ratio was 1:5, 0.25 mM of hIAPP and 1.25 mM of drugs (diclofenac, meloxicam, niflumic acid, nimesulide, phenylbutazone, piroxicam, sulindac and tenoxicam).



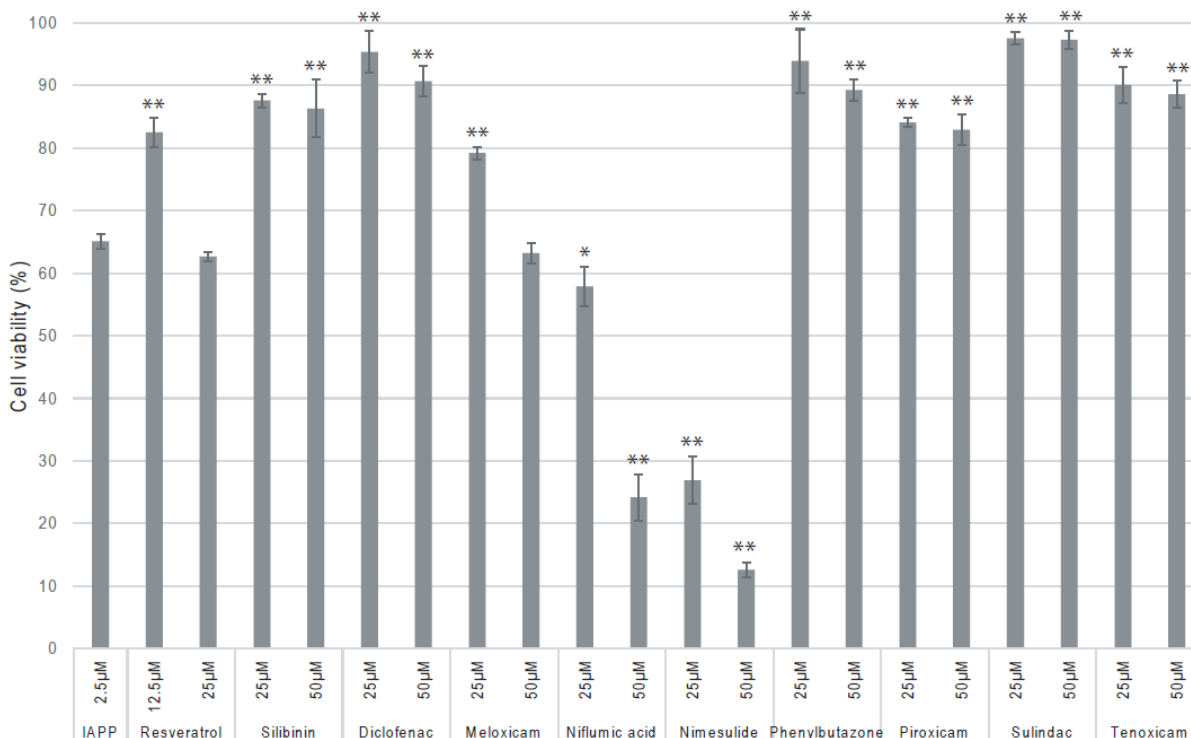
The oligomerization of hIAPP was abrogated following a treatment with diclofenac. The second most potent inhibitor was sulindac. The dimeric state was observed in samples treated with the oxicam family (meloxicam, piroxicam and tenoxicam). Niflumic acid, nimesulide and phenylbutazone were able to partially block the oligomerization process.

NSAIDs protect INS-1 cells from toxic hIAPP fibrils

The potential protective effect of NSAIDs against hIAPP fibrils cytotoxicity was investigated. Pre-incubated hIAPP was added to INS-1 cells for 24 h in the presence or absence of increasing concentration of NSAIDs (**Fig. 4**). Resveratrol protected cells at 12.5 μ M (molar ratio 1:5). The cell viability was significantly preserved with silibinin, diclofenac,

meloxicam, phenylbutazone, sulindac and tenoxicam at a molar ratio of 1:10. These drugs were not toxic at a higher concentration (50 μ M, molar ratio of 1:20). Higher concentrations of meloxicam and resveratrol (50 μ M) did not have a protective effect, whereas lower concentrations (25 μ M) reduced the deleterious effect of hIAPP fibrils. The protective effect of resveratrol and meloxicam against hIAPP aggregation has a narrow therapeutic window. Niflumic acid and nimesulide are toxic at concentrations affecting hIAPP aggregation. Thus, a protective effect of these drugs was not observed.

Fig. 4. INS-1 cell viability in the presence of hIAPP alone and hIAPP with different drug treatments, such as resveratrol, silibinin, diclofenac, meloxicam, niflumic acid, nimesulide, phenylbutazone, piroxicam, sulindac and tenoxicam, as determined by resazurin-based assays. hIAPP was tested at a concentration of 2.5 μ M and with effective concentrations (12.5, 25 or 50 μ M) of each drug. The molar ratios were 1:5, 1:10 and 1:20. The one-way analysis of variance with Dunnett's multiple comparison test showed significant differences between IAPP and several drug treatments (* and ** are indicative of $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively).



Discussion

The global prevalence of type 2 diabetes among adults population worldwide was approximated to be 9 % in 2014 (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/). Up to 1.5 million deaths were estimated in 2012 to be directly attributed to type 2 diabetes (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/). There is a compelling need to improve the prevention and/or treatment of type 2 diabetes. IAPP possesses a potent ability to aggregate into mature fibrils in the islet of Langerhans (Buchanan et al. 2013). Mature linear fibrils and intermediate forms, such as oligomers, provoke cell damage, oxidative stress and apoptosis (Abedini and Schmidt 2013; Cao et al. 2013; Gurlo et al. 2010; Jayasinghe and Langen 2007; Khemtemourian et al. 2008). Amyloid deposition contributes to the β -cell loss and the progression of the disease (Abedini and Schmidt 2013; Hoppener et al. 2002; Jaikaran and Clark 2001; Kamata et al. 2014). Treatment with inhibitors of hIAPP fibril or oligomer formation presents a potential new pharmacotherapeutic strategy for the management of type 2 diabetes (Cheng et al. 2013; Frydman-Marom et al. 2011; Hard and Lendel 2012; Porat et al. 2006).

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been used in a plethora of inflammatory conditions based on the inhibition of COX-2. There are contradictory reports in regard to the amyloid inhibitory effect of NSAIDs in Alzheimer's disease (AD) (Browne et al. 2006; Cole et al. 2004; Dong et al. 2014; Hillmann et al. 2012; Lim et al. 2000; McKee et al. 2008; Netland et al. 1998; Yan et al. 2003). Previous investigations reported that the A β -amyloid induces inflammation, but the inflammatory responses occur earlier than the formation of the senile plaque (Cole et al. 2004). The physiopathology underlying AD involves an inflammatory process that has not been fully understood and clinical studies have been reported conflicting data (Browne et al. 2006; Cole et al. 2004; Dong et al. 2014; Hillmann et al. 2012; Lim et al. 2000; McKee et al. 2008; Netland et al. 1998; Yan et al. 2003). Rofecoxib, a selective COX-2 inhibitor, failed to reduce the progression of cognitive impairment in patients suffering from mild or moderate AD (Aisen et al. 2003). However, another study reported that COX-2 inhibition improves the suppression of memory associated with A β -amyloid deposition in patients with AD. In a transgenic mouse model of AD, ibuprofen, a non-selective COX-2 inhibitor, reduced AD-type pathologic change after 6

months of treatment in comparison with an untreated control group (Lim et al. 2000). Whether selective COX-2 inhibitors have clinical benefit remains to be elucidated.

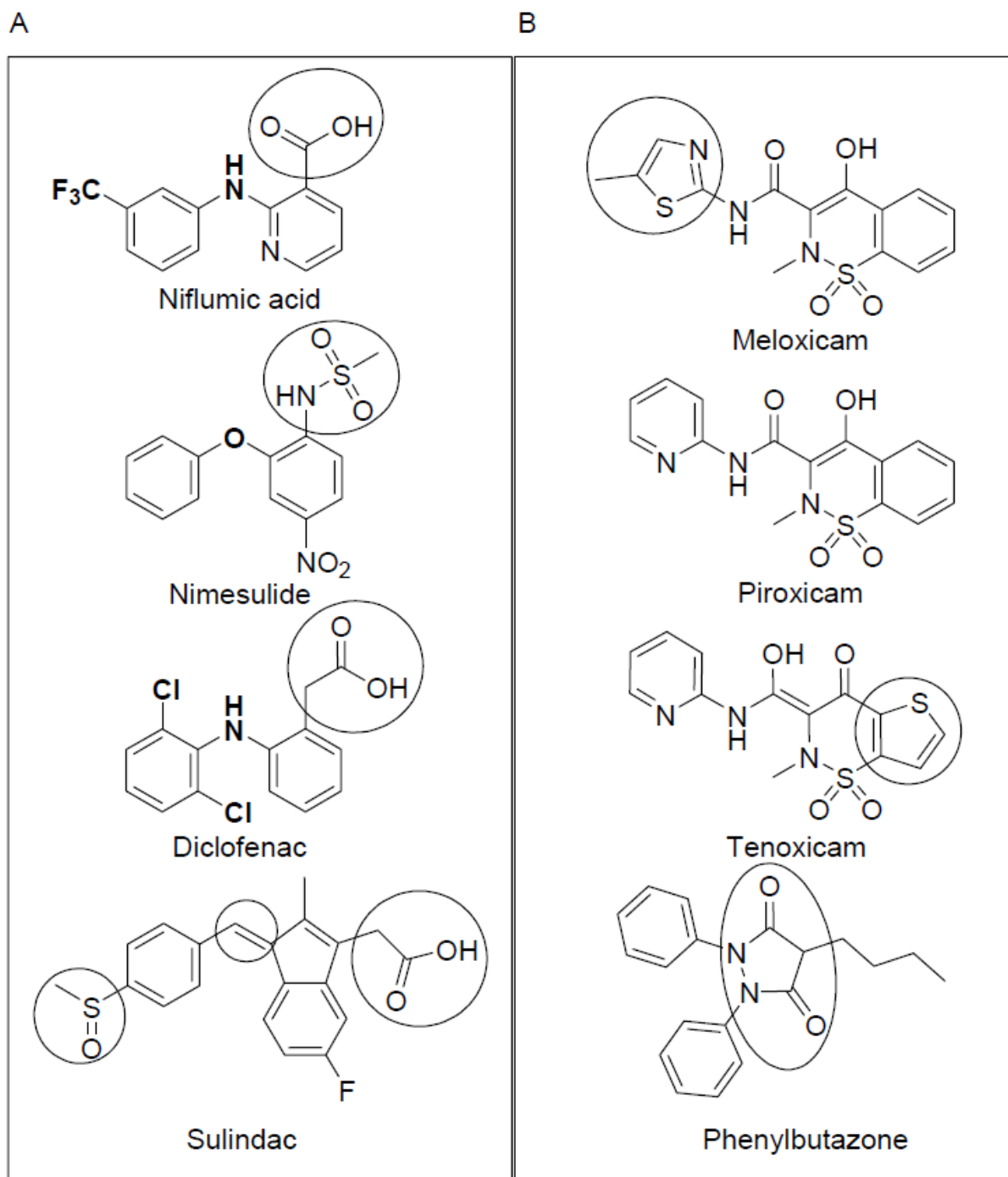
There are limits to the interpretation of each assay that was performed, hence it is critical to consider the results of the different assays altogether before drawing conclusions. This study highlights compounds and structures of potential interest. For practical purposes, assays were completed within few hours (shorter and longer kinetics). ThT assays can be optimized by simple variations of initial testing conditions, compromising between physiologically relevant conditions and the need for a relatively fast reaction. When high-throughput screening of small molecules in relation to aggregation is used, it is important to complement the study with other assays, particularly a cell-based assay. Drugs may be capable of displacing ThT binding, resulting in false positives (false hit compound). Which is why, we complemented the Thioflavin T-based fluorescence assays with the Far-UV circular dichroism spectrometry, the photo-induced cross-linking (PICUP) assay and a biological assay. There are some limits in the interpretation of CD spectra for the apparent decrease at 220 nm due to the absorbance of the inhibitors, which stresses the importance of performing multiple assays before drawing conclusions on the potential efficacy of compounds. The cell-based assay used in our study involved pre-formed hIAPP amyloid before the drug challenge. Consequently, the effective drugs must be able to destabilize the fibril state to demonstrate a cytoprotective effect and/or impede the activation of apoptosis.

Few studies have evaluated the NSAIDs potential to abrogate the formation of fibrils. A series of analogues of diclofenac were effective *in vitro* in inhibiting the transthyretin fibrillization (Oza et al. 2002). In our study, several NSAIDs, such as diclofenac, phenylbutazone, sulindac and the oxicam representatives, exerted a significant inhibitory effect on fibril formation and delayed the structural transition of hIAPP. Meloxicam and sulindac were the most potent inhibitors of fibrillization, whereas diclofenac and sulindac were more potent in abrogating oligomerization of hIAPP. They protected pancreatic INS-1 cell from the deleterious effect of hIAPP fibrils. Ketorolac was not effective compounds, consistent with previous studies (Tu et al. 2014).

The diclofenac derivatives prepared in the transthyretin amyloid fibril formation study depicted structure-activity relationships, applicable to impedance of hIAPP aggregation (Oza

et al. 2002). Diclofenac and its related derivatives bind to the retinol binding pocket of TTR via computational docking. However, other interactions and targets are possible and we hypothesized that these molecules act as universal amyloid inhibitors, such as polyphenols, by inhibiting aggregation with a combination of structural rigidity and aromatic stacking. This study highlighted the requirement of a carboxylic acid directly attached to the benzene ring or separated with a methylene (Oza et al. 2002). In the second column of **Figure 5** display the potent molecules that bear a carboxylic acid or sulfonamide in the current study. The protection of the carboxylic acid moiety, found in aceclofenac, abolished the activity to compare with diclofenac. To gain further information, it would be interesting to study the impact of acidic moieties with various pKas on hIAPP amyloidosis. Another information arising from the transthyretin study is the chlorines attached to the aromatic ring that bind to the protein (Oza et al. 2002). The chlorines were either positioned symmetrically in ortho or meta to provide binding, whereas their absence abolished the activity (Oza et al. 2002). Adding a carboxylic acid in para allowed an additional electrostatic interaction with the protein transthyretin (Oza et al. 2002). Herein, the NSAIDs molecular screening on hIAPP fibrils formation led to similar conclusions regarding the substitution patterns on the benzene ring. Interestingly, the aromatic ring of nimesulide is devoid of halides and niflumic acid benzene bears a trifluoromethyl group. Niflumic acid and nimesulide were less potent than diclofenac. Sulindac has a similar fibril inhibition activity to diclofenac. The aromatic ring has a methylsulfinyl moiety in para, not found in ketorolac, suggesting that an electron donor is required for fibril inhibition and could be important in the absence of halides.

Fig. 5. Proposed structure-activity relationships between the acetic acid class (A) and between the enolic acid class (B).



The structure-activity relationships between diclofenac, niflumic acid, nimesulide, and their fibril inhibition activities against hIAPP underline the importance of a negatively charged

substituent between the aromatic rings (**Fig. 5**). Sulindac has a double bond that can be delocalized easily to provide electrons, considering the electronic resonance. Sulindac has similarity in structure with the exception of an indenyl moiety, suggesting that the benzene ring could be substituted by a fused ring or heterocyclic aromatic ring. Amyloid inhibitors bear aromatic moieties that can potentially be stacked between other aromatic residues from the protein and abrogate the self-assembly of oligomers (Cheng et al. 2013; Frydman-Marom et al. 2011; Hard and Lendel 2012; Porat et al. 2006). The aromatic structure found in the diarylamine (second column **Fig. 5**) and oxicam scaffold (first column **Fig. 5**) abrogates the oligomerization of hIAPP potentially by preventing the aromatic interactions between the aromatic residues of hIAPP.

Phenylbutazone and the oxicam family provide a different chemistry scaffold than the diarylamine scaffold (diclofenac), to prepare other derivatives (first column of **Fig. 5**). Among the oxicam family members, meloxicam had the strongest fibril inhibition activity and tenoxicam provided the highest survival when INS-1 cells were challenged with toxic fibrils. Tenoxicam bears a 2,3-dihydrothiophene that is substituted by a benzene moiety in meloxicam and piroxicam. Meloxicam differs from Piroxicam and tenoxicam, having a 5-methyl-2-thiazolyl rather than a pyridine moiety. However, the 5-methyl-2-thiazolyl moiety could potentially explain the deleterious effect of meloxicam on INS-1 cells and further study is needed to confirm this hypothesis. The molecular structure of phenylbutazone is quite similar to the oxicam family with a heterocycle bearing two amines and two carbonyls, resulting in nucleophilicity. Phenylbutazone is very toxic to human, causing aplastic anemia and liver damage (Goodman et al. 2011). However, it has been extensively used in veterinary medicine (Kahn et al. 2010). Chemical modification will be required not only to improve its efficacy toward hIAPP fibrillization but to modify the toxicologic effect in humans.

The present *in vitro* study demonstrates that several NSAIDs inhibit amyloid formation. Multiple probes were used to study the inhibition of the toxic hIAPP assembly. It has been reported that oligomers are important entities involved in the mechanism of hIAPP amyloid cytotoxicity. The most potent drugs against hIAPP oligomerization were diclofenac and sulindac. Diclofenac, meloxicam, phenylbutazone, piroxicam, sulindac and tenoxicam conferred cell protection against toxic fibrils. Chemical scaffold from the enolic acid class

(oxicam and phenylbutazone) and the acetic acid class (diclofenac, sulindac) could be modified to generate new inhibitors of hIAPP aggregation. NSAID derived compound scaffolds are interesting potential candidates for the development of type 2 diabetes treatment.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Diabètes Québec. We are very grateful to Mr. Frédéric Berthiaume for the technical advice and Dr. Mostafa Hatam for the peptide synthesis.

References

- Abedini, A., and Schmidt, A.M. 2013. Mechanisms of islet amyloidosis toxicity in type 2 diabetes. *FEBS Lett.* **587**(8): 1119-1127. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.017.
- Aisen, P.S., Schafer, K.A., Grundman, M., Pfeiffer, E., Sano, M., Davis, K.L., Farlow, M.R., Jin, S., Thomas, R.G., Thal, L.J., and Alzheimer's Disease Cooperative, S. 2003. Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.* **289**(21): 2819-2826. doi: 10.1001/jama.289.21.2819.
- Bitan, G., and Teplow, D.B. 2004. Rapid photochemical cross-linking--a new tool for studies of metastable, amyloidogenic protein assemblies. *Accounts of C Research*, **37**(6): 357-364. doi: 10.1021/ar000214l.
- Brender, J. R., Krishnamoorthy, J., Sciacca, M. F. M., Vivekanandan, S., D'Urso, L., Chen, J., La Rosa, C., and Ramamoorthy, A. 2015. Probing the Sources of the Apparent Irreproducibility of Amyloid Formation: Drastic Changes in Kinetics and a Switch in Mechanism Due to Micelle like Oligomer Formation at Critical Concentrations of IAPP. *J. Phys. Chem. B* **119**(7), 2886-2896. doi:10.1021/jp511758w.
- Browne, K.D., Iwata, A., Putt, M.E., and Smith, D.H. 2006. Chronic ibuprofen administration worsens cognitive outcome following traumatic brain injury in rats. *Exp. Neurol.* **201**(2): 301-307. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.04.008.
- Buchanan, L.E., Dunkelberger, E.B., Tran, H.Q., Cheng, P.N., Chiu, C.C., Cao, P., Raleigh, D.P., de Pablo, J.J., Nowick, J.S., and Zanni, M.T. 2013. Mechanism of IAPP amyloid

- fibril formation involves an intermediate with a transient beta-sheet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**(48): 19285-19290. doi: 10.1073/pnas.1314481110.
- Buell, A.K., Dobson, C.M., Knowles, T.P., and Welland, M.E. 2010. Interactions between amyloidophilic dyes and their relevance to studies of amyloid inhibitors. *Biophys. J.* **99**(10): 3492-3497. doi: 10.1016/j.bpj.2010.08.074.
- Cao, P., Abedini, A., Wang, H., Tu, L.H., Zhang, X., Schmidt, A.M., and Raleigh, D.P. 2013. Islet amyloid polypeptide toxicity and membrane interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**(48): 19279-19284. doi: 10.1073/pnas.1305517110.
- Cheng, B., Gong, H., Li, X., Sun, Y., Zhang, X., Chen, H., Liu, X., Zheng, L., and Huang, K. 2012. Silibinin inhibits the toxic aggregation of human islet amyloid polypeptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419**(3): 495-499. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.042.
- Cheng, B., Gong, H., Xiao, H., Petersen, R.B., Zheng, L., and Huang, K. 2013. Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: a therapeutic strategy for protein misfolding diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**(10): 4860-4871. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.06.029.
- Cole, G.M., Morihara, T., Lim, G.P., Yang, F., Begum, A., and Frautschy, S.A. 2004. NSAID and antioxidant prevention of Alzheimer's disease: lessons from in vitro and animal models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1035**: 68-84. doi: 10.1196/annals.1332.005.
- Dong, Z., Yan, L., Huang, G., Zhang, L., Mei, B., and Meng, B. 2014. Ibuprofen partially attenuates neurodegenerative symptoms in presenilin conditional double-knockout mice. *Neuroscience*, **270**: 58-68. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.03.048.
- Fortin, J., Patenaude, A., Deschesnes, R.G., Cote, M.F., Petitclerc, E., and C-Gaudreault, R. 2010. ASK1-P38 Pathway is Important for Anoikis Induced by Microtubule-Targeting Aryl Chloroethylureas. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **13**(2): 175-190.
- Frydman-Marom, A., Shaltiel-Karyo, R., Moshe, S., and Gazit, E. 2011. The generic amyloid formation inhibition effect of a designed small aromatic beta-breaking peptide. *Amyloid*, **18**(3): 119-127. doi: 10.3109/13506129.2011.582902.

- Goodman, L.S., Brunton, L.L., Chabner, B., and Knollmann, B.C. 2011. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill Medical,, New York ; Toronto.
- Gurlo, T., Ryazantsev, S., Huang, C.J., Yeh, M.W., Reber, H.A., Hines, O.J., O'Brien, T.D., Glabe, C.G., and Butler, P.C. 2010. Evidence for proteotoxicity in beta cells in type 2 diabetes: toxic islet amyloid polypeptide oligomers form intracellularly in the secretory pathway. *Am. J. Pathol.* **176**(2): 861-869. doi: 10.2353/ajpath.2010.090532.
- Hard, T., and Lendel, C. 2012. Inhibition of amyloid formation. *J. Mol. Biol.* **421**(4-5): 441-465. doi: 10.1016/j.jmb.2011.12.062.
- Hillmann, A., Hahn, S., Schilling, S., Hoffmann, T., Demuth, H.U., Bulic, B., Schneider-Axmann, T., Bayer, T.A., Weggen, S., and Wirths, O. 2012. No improvement after chronic ibuprofen treatment in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, **33**(4): 833 e839-850. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.006.
- Hoppener, J.W., Nieuwenhuis, M.G., Vroom, T.M., Ahren, B., and Lips, C.J. 2002. Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus: consequence or cause? *Mol. Cell. Endocrinol.* **197**(1-2): 205-212.
- Jaikaran, E.T., and Clark, A. 2001. Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta*, **1537**(3): 179-203.
- Jayasinghe, S.A., and Langen, R. 2007. Membrane interaction of islet amyloid polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**(8): 2002-2009. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.01.022.
- Jelinek, R., and Sheynis, T. 2010. Amyloid - membrane interactions: experimental approaches and techniques. *Current protein & peptide science*, **11**(5): 372-384.
- Jiang, P., Li, W., Shea, J.E., and Mu, Y. 2011. Resveratrol inhibits the formation of multiple-layered beta-sheet oligomers of the human islet amyloid polypeptide segment 22-27. *Biophys. J.* **100**(6): 1550-1558. doi: 10.1016/j.bpj.2011.02.010.
- Kahn, C.M., Line, S., and Merck & Co. 2010. The Merck veterinary manual. 10th ed. Merck & Co., Whitehouse Station, N.J.

- Kamata, K., Mizukami, H., Inaba, W., Tsuboi, K., Tateishi, Y., Yoshida, T., and Yagihashi, S. 2014. Islet amyloid with macrophage migration correlates with augmented beta-cell deficits in type 2 diabetic patients. *Amyloid*, **21**(3): 191-201. doi: 10.3109/13506129.2014.937857.
- Khemtemourian, L., Killian, J.A., Hoppener, J.W., and Engel, M.F. 2008. Recent insights in islet amyloid polypeptide-induced membrane disruption and its role in beta-cell death in type 2 diabetes mellitus. *Exp. Diabetes Res.* **2008**: 421287. doi: 10.1155/2008/421287.
- Lim, G.P., Yang, F., Chu, T., Chen, P., Beech, W., Teter, B., Tran, T., Ubeda, O., Ashe, K.H., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. 2000. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **20**(15): 5709-5714.
- Luca, S., Yau, W. M., Leapman, R., and Tycko, R. 2007. Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: Constraints from solid-state NMR. *Biochemistry*, **46**(47): 13505-13522. doi: 10.1021/bi701427q.
- Mishra, R., Geyer, M., and Winter, R. 2009. NMR spectroscopic investigation of early events in IAPP amyloid fibril formation. *Chembiochem*, **10**(11): 1769-1772. Doi: 10.1002/cbic.200900237.
- McKee, A.C., Carreras, I., Hossain, L., Ryu, H., Klein, W.L., Oddo, S., LaFerla, F.M., Jenkins, B.G., Kowall, N.W., and Dedeoglu, A. 2008. Ibuprofen reduces A β , hyperphosphorylated tau and memory deficits in Alzheimer mice. *Brain Res.* **1207**: 225-236. doi: 10.1016/j.brainres.2008.01.095.
- Netland, E.E., Newton, J.L., Majocha, R.E., and Tate, B.A. 1998. Indomethacin reverses the microglial response to amyloid beta-protein. *Neurobiology of aging*, **19**(3): 201-204.
- O'Brien, T.D., Butler, P.C., Westermark, P., and Johnson, K.H. 1993. Islet amyloid polypeptide: a review of its biology and potential roles in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Vet. Pathol.* **30**(4): 317-332.
- Oza, V.B., Smith, C., Raman, P., Koepf, E.K., Lashuel, H.A., Petrassi, H.M., Chiang, K.P., Powers, E.T., Sachettinni, J., and Kelly, J.W. 2002. Synthesis, structure, and activity of diclofenac analogues as transthyretin amyloid fibril formation inhibitors. *J. Med. Chem.* **45**(2): 321-332.

- Padrick, S. B., and Miranker, A. D. 2002. Islet amyloid: Phase partitioning and secondary nucleation are central to the mechanism of fibrillogenesis. *Biochemistry*, **41**(14), 4694-4703. doi: 10.1021/bi0160462.
- Paulsson, J.F., Benoit-Biancamano, M.O., Schaffer, L., and Dahl, K. 2011. Ferret islet amyloid polypeptide (IAPP): characterization of in vitro and in vivo amyloidogenicity. *Amyloid*, **18**(4): 222-228. doi: 10.3109/13506129.2011.627956.
- Porat, Y., Abramowitz, A., and Gazit, E. 2006. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chemical biology & drug design*, **67**(1): 27-37. doi: 10.1111/j.1747-0285.2005.00318.x.
- Reddy, A. S., Wang, L., Singh, S., Ling, Y. L., Buchanan, L., Zanni, M. T., Skinner, J. L., and de Pablo, J. J. 2010. Stable and Metastable States of Human Amylin in Solution. *Biophysique journal*, **99**(7): 2208-2216. doi: 10.1016/j.bpj.2010.07.014.
- Ruschak, A.M., and Miranker, A.D. 2007. Fiber-dependent amyloid formation as catalysis of an existing reaction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**(30): 12341-12346. doi: 10.1073/pnas.0703306104.
- Shvadchak, V.V., Claessens, M.M.A.E., and Subramaniam, V. 2015. Fibril Breaking Accelerates alpha-Synuclein Fibrillization. *J. Phys. Chem. B* **119**(5): 1912-1918. doi: 10.1021/jp5111604.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J., and Westermarck, P. 2014. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid*, **21**(4): 221-224. doi: 10.3109/13506129.2014.964858.
- Sreerama, N., and Woody, R.W. 2004. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Meth. Enzymol.* **383**: 318-351. doi: 10.1016/S0076-6879(04)83013-1.
- Suzuki, Y., Brender, J.R., Hartman, K., Ramamoorthy, A., and Marsh, E.N.G. 2012. Alternative Pathways of Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation Distinguished by

- F-19 Nuclear Magnetic Resonance-Detected Kinetics of Monomer Consumption. *Biochemistry*, **51** (41), 8154-8162. doi: 10.1021/bi3012548.
- Tu, L.H., Noor, H., Cao, P., and Raleigh, D.P. 2014. Aspirin, diabetes, and amyloid: re-examination of the inhibition of amyloid formation by aspirin and ketoprofen. *ACS Chemical Biology*, **9**(7): 1632-1637. doi: 10.1021/cb500162w.
- Westermarck, P., Andersson, A., and Westermarck, G.T. 2011. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol. Rev.* **91**(3): 795-826. doi: 10.1152/physrev.00042.2009.
- Williamson, J.A., and Miranker, A.D. 2007. Direct detection of transient alpha-helical states in islet amyloid polypeptide. *Protein Science*, **16**(1): 110-117. doi: 10.1110/ps.062486907.
- Yan, Q., Zhang, J., Liu, H., Babu-Khan, S., Vassar, R., Biere, A.L., Citron, M., and Landreth, G. 2003. Anti-inflammatory drug therapy alters beta-amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **23**(20): 7504-7509.
- Yonemoto, I.T., Kroon, G.J., Dyson, H.J., Balch, W.E., and Kelly, J.W. 2008. Amylin proprotein processing generates progressively more amyloidogenic peptides that initially sample the helical state. *Biochemistry*, **47**(37), 9900-9910. doi: 10.1021/bi800828u.
- Zhang, X., Cheng, B., Gong, H., Li, C., Chen, H., Zheng, L., and Huang, K. 2011. Porcine islet amyloid polypeptide fragments are refractory to amyloid formation. *FEBS Lett.* **585**(1): 71-77. doi: 10.1016/j.febslet.2010.11.050.

Chapitre VI

Article 4- Découverte de dérivés éthyle urée comme inhibiteurs de l'agrégation fibrillaire et de la cytotoxicité

Contribution

J'ai participé à l'obtention de tous les résultats et à l'écriture de la première version du manuscrit. Les molécules ont été préparées dans le cadre de mon projet de maîtrise réalisé à la Faculté de pharmacie de l'Université Laval. La correction des diverses versions de l'article a été effectuée sous la supervision des Dre Marie-Odile Benoit-Biancamano et Dr René C.-Gaudreault. Ce manuscrit est tout récemment accepté pour être publié dans le *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.

Résumé

Le polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques humains (hIAPP) peut changer de conformation et former des dépôts dans les îlots pancréatiques, contribuant ainsi à la progression du diabète de type 2. De nouvelles molécules anti-amyloïdogéniques plus puissantes, présentant à la fois des propriétés adéquates de biodisponibilité et une efficacité *in vivo*, sont à développer. Les *N*-phényle-*N'*-(2-éthyle) urées (EU) sont de petites molécules non cytotoxiques récemment développées dans notre laboratoire. Notre programme de découverte en chimie médicinale implique l'évaluation du rôle des groupements aryles substitués sur l'inhibition de la formation de fibrilles provenant de l'hIAPP. Quelques EUs ont été testées *in vitro* pour leur activité anti-amyloïdogène en utilisant la fluorescence de la thioflavine T, la liaison croisée photo-induite et la viabilité cellulaire sur les cellules pancréatiques MIN-6. EU-362 et EU-418 étaient capables d'inhiber significativement la formation de fibrilles et de protéger les cellules contre les effets toxiques de l'amyloïde. De plus, EU-362 a abrogé l'oligomérisation de l'hIAPP. Nos résultats suggèrent qu'une augmentation du potentiel

nucléophile sur le groupement aryle augmente significativement l'activité anti-amyloïdogènes de ces molécules.

Discovery of ethyl urea derivatives as inhibitors of islet amyloid polypeptide fibrillization and cytotoxicity

Jessica S. Fortin, Marie-Odile Benoit-Biancamano, René C.-Gaudreault

Abstract

Islet amyloid polypeptide (IAPP) has been shown to form amyloid deposits in pancreatic islets, thereby furthering type 2 diabetes disease progression. Further discovery of new molecules is needed to create a diverse set of molecules that impede pancreatic amyloidosis. We have recently designed and synthesized *N*-phenyl-*N'*-(2-ethyl)ureas (EU) that are non-cytotoxic small molecules, to evaluate the role of the aryl-substituted moiety on the inhibition of hIAPP fibrilization. Several EUs were tested in vitro for their anti-amyloidogenic activity using the fluorometric ThT assay, the photo-induced cross-linking (PIUCP) assay and cell survival assay in pancreatic MIN-6 cells. EU-362 and EU-418 were able to significantly inhibit the formation of hIAPP fibrils and protected cells from amyloid cytotoxic effects. Our results suggest that increasing the nucleophilic potency of the aryl moiety significantly enhances the anti-amyloidogenic activity of the molecules.

Key words: *N*-phenyl-*N'*-(2-ethyl)urea (EU), amyloid, IAPP, diabetes, inhibitors of fibrillization.

Introduction

Amyloidosis is a progressive and still incurable disease caused by various misfolded proteins that aggregate into toxic oligomers and fibrils (Sipe et al. 2014). Amyloid research over the past decades has focused on the characterization of the great biological variability of amyloid deposits. Amyloidosis encompasses a vast panoply of pathologic processes, including more than 25 human diseases, which is explained, in part, by the diversity of underlying causal proteins (Hard and Lendel 2012; Sipe et al. 2014). For example, degenerative human diseases

such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and type 2 diabetes involve amyloid formation with a crucial role in the pathogenesis (Hard and Lendel 2012; Sipe et al. 2014). In addition, various biochemical forms of amyloid occur in different animal species (Sipe et al. 2014).

In the islets of Langerhans of patients with type 2 diabetes, islet amyloid polypeptide (IAPP), namely amylin, is a precursor for amyloid protein deposition (Sipe et al. 2014). Cell membranes play paradoxical roles in the pathogenesis of amyloid deposits related to type 2 diabetes. Bilipid membranes contribute to the formation and the elongation of the fibrils on their surface through binding of IAPP, found at the alpha helix secondary structure state (Cao et al. 2013). Cell membrane interactions with IAPP lead to a beta sheet conformation and, consequently, result in pore formation and cellular leakage (Cao et al. 2013). Other factors play a significant role in disturbing the protein-folding homeostasis. The extracellular matrix components of the islets of Langerhans, such as glycosaminoglycan (GAG), have been reported to accelerate the formation of amyloid deposits (Abedini and Schmidt 2013). Chronic inflammation is also an important contributing factor to amyloidosis protein toxicity (Kamata et al. 2014). There is supporting evidence that amyloid activates macrophages via the release of cytokines, such as IL-1 β and IL-6, by impaired beta cells. Macrophages were found in pancreatic tissue containing densely packed amyloid deposits (Kamata et al. 2014). Proinflammatory processes contribute to the pathogenetic development of lesions in the pancreatic tissue (Kamata et al. 2014).

The process underlying amyloid formation is complex and multifactorial. The conversion of amylin to the cross beta-pleated sheet fibrils is not fully understood. Many studies report that soluble intracellular oligomers (Bram et al. 2014), fibril elongation and amyloid deposits induce oxidative stress and apoptosis of beta cells in the islet of Langerhans (Abedini and Schmidt 2013; Westermark et al. 2011). Accumulation of islet amyloid deposits develops over time and contributes significantly to the progression of type 2 diabetes (Abedini and Schmidt 2013; Westermark et al. 2011). Commercialized hypoglycemic agents become ineffective over time in maintaining a normoglycemic state. A potential diabetes co-adjuvant therapy could be a small molecule inhibitor of IAPP-dependent amyloid formation to prevent, at least in part, the disease progression. However, major impediments to the development of

new therapeutic agents that inhibit amyloid formation in type 2 diabetes include specificity as well as poor biopharmaceutical properties, such as bioavailability. Several natural products have been promoted and studied, including flavonoids, curcumin, resveratrol and silibinin (Cao and Raleigh 2012; Cheng et al. 2012; Daval et al. 2010; Hard and Lendel 2012; Jiang et al. 2011). These compounds are polyphenols that have a poor bioavailability and/or a short biological half-life (Chow et al. 2005; Muzzio et al. 2012; Yang et al. 2007). In addition, drug candidates that displayed evidence of efficacy *in vitro* must be distributed into the pancreatic tissue *in vivo*, crucial for effectiveness.

Hence new molecules need to be designed and, to this end, we have developed new compounds referred to as *N*-phenyl-*N'*-(2-ethyl)ureas (**EUs**). EUs are small molecules which originated from our research program on covalent-binding protein inhibitors (Fortin et al. 2008; Fortin et al. 2007). These molecules are non-toxic derivatives synthesized by removing the reactive electrophilic 2-chloroethyl amino moiety of the *N*-phenyl-*N'*-(2-chloroethyl)ureas (**CEUs**) (Fortin et al. 2008; Fortin et al. 2007). CEUs exhibit an anti-cancer activity and have a good bioavailability in mice (Mounetou et al. 2010). Prototypical CEUs were shown to be specifically distributed in the gastro-intestinal tract in mice but are cytotoxic (Mounetou et al. 2010). In contrast, EUs have been described to be non-cytotoxic (Fortin et al. 2008; Fortin et al. 2007). EUs may exhibit a good bioavailability, similarly to their cytotoxic counterparts. EUs that are aromatic amines were selected for this molecular screening for hIAPP-based amyloid inhibition because small aromatic molecules such as flavonoids, curcumin, resveratrol and silibinin interfere with fibril formation of amyloidogenic protein hIAPP (Cao and Raleigh 2012; Cheng et al. 2012; Daval et al. 2010; Hard and Lendel 2012; Jiang et al. 2011). The EU scaffolds may inhibit the fibril aggregation with the urea part of the molecule, known to stabilize hIAPP protein structure in an unfolded monomeric state, thus restraining hIAPP nuclei formation (Seeliger et al. 2013). We conducted our studies to explore the role of the aryl substituent on the abrogation of hIAPP amyloid formation and the reduction of hIAPP-based amyloid cytotoxicity. This is the first anti-amyloidogenic structure-activity relationship study with EUs.

Methods

Chemicals

All drugs were dissolved in DMSO at 40 mM. Hexafluoroisopropanol (HFIP), DMSO, resazurin and thioflavin-T (ThT) were obtained from Alfa Aesar (Ward Hill, MA). EUs were prepared as published previously (Fortin et al. 2008; Fortin et al. 2007). Controls for each assay included drug excipient.

Peptide synthesis

Synthetic hIAPP (1-37) was obtained from Peptidogen International Corp (Brossard, Qc, Canada). IAPP described herein was prepared, as published previously, with a microwave peptide synthesizer, using the 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry, and Fmoc-protected pseudoproline dipeptide derivatives were incorporated to facilitate the synthesis (Cao et al. 2013).

Cell line and culture

Min-6 (mice insulinoma) cells were purchased from AddexBio (San Diego, CA). Min-6 cells were grown in DMEM medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 1X sodium pyruvate, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 100 U/mL streptomycin, 100 U/mL of penicillin G and 15 % fetal bovine serum (Wisent Inc., St-Bruno, Qc, Canada). Cells were maintained in a moisture saturated atmosphere at 37 °C under 5% CO₂.

Thioflavin T (ThT) fluorescence assay

hIAPP peptide from the stock solution of 1mM were added to 10 mM PBS buffer (pH 7.4) and transferred to a black 96-well microtiter plate with transparent bottom. Each well contained a final volume of 150 μ L with a peptide final concentration of 10 μ M. Experiments in the presence of hIAPP were performed using a solution of ThT at a final concentration of 15 μ M with different drug treatments. Final drug concentrations ranged from 25 to 100 μ M. The background signal consisted of 1 % HFIP without peptide. The fluorescence emission experiments were performed as previously published (Fortin and Benoit-Biancamano 2015). The lag time and the T₅₀ were calculated as previously described (Zhang et al. 2011).

Photo-induced cross-linking (PICUP) assay

hIAPP was diluted in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) to a final concentration of 250 μ M and using 1% HFIP. The peptide solution was sonicated for 1 min. Drugs were also freshly dissolved in DMSO and added to the peptide solution at a molar ratio of 1:5 (hIAPP:compound). DMSO concentration was less than 0.12%. The control consisted of samples that were photo-cross-linked using the PICUP method. The conditions used for the PICUP experiments have been previously described (Fortin and Benoit-Biancamano 2015). The cross-linked samples were separated on a 16% Tricine-urea gel and visualized by silver staining.

Transmission electron microscopy (TEM)

hIAPP was incubated in 10 mM PBS (pH 7.4, 25 °C) at 60 μ M for 1 h with drug treatment (EU-362 or EU-418) at 300 or 600 μ M. Disaggregation experiments were performed by incubating hIAPP for 24 h prior to drug treatment, then incubated 24 h with the pharmacologic agent. A volume of 200 μ L was applied on a 400-mesh Formvar-carbon-coated copper grid (Canemco Marivac, Lakefield, QC, Canada) using an Airfuge tube. They were next centrifuged with an Airfuge Air-Driven Ultracentrifuge (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada) for 20 minutes. The grids were air-dried and incubated for 1 minute in distilled water. Then they were carefully air-dried and incubated for 1 minute in a fresh solution of 1% uranyl acetate. Samples were air-dried one last time and observed using a transmission microscope (Hitachi Model HT7700 120 kV Compact-Digital Biological TEM, Toronto, ON, Canada). Pictures were acquired at an accelerating voltage of 80 kV and magnification of 40 k.

Cell viability assay

Cells were maintained in a 37 °C, 5% CO₂ incubator, in exponential growth, for the duration of the experimentation. For this assay, cells were seeded in 96-well microtiter plates at a density of 5×10^3 Min-6 cells per well for 24 h. Drugs freshly solubilized in DMSO were diluted in culture medium and aliquots containing sequential dilution of drugs were added subsequently after stimulation with 10 μ M of hIAPP. hIAPP was dissolved and incubated in 10 mM PBS (pH 7.4, 25 °C) 24 h before addition to cells. Drugs were tested at 50 μ M, and

DMSO concentration was maintained at 0.12% to avoid growth inhibition. Negative control consisted of DMSO alone. Plates were incubated for 24h in the presence of drugs and hIAPP. Resazurin-based reduction assays were performed as previously described (Fortin and Benoit-Biancamano 2015).

Statistical analysis

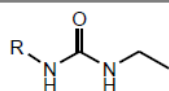
All results in **Table 1** were presented as values \pm SD. For the cell viability assays, data were analyzed by the one-way analysis of variance with Dunnett's multiple comparison between IAPP and several drug treatments. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ and $p < 0.001$.






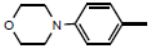
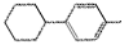
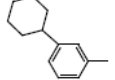
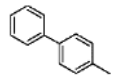
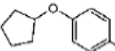
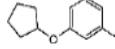
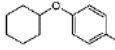
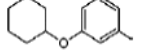
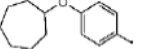
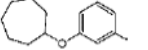
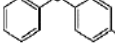
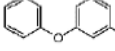
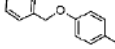
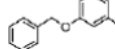
Results













EUs inhibit hIAPP aggregation

The goal of our study was to investigate the inhibitory potential of EUs on the hIAPP aggregation and to examine which chemical groups are effective in impeding amyloid formation. Various structural analogs of EUs were tested at a final concentration of 100 μ M, 10X molar excess compared to hIAPP. The results are summarized in **Table 1** and expressed as the fluorescence intensity (%) and the anti-amyloidogenic potency for each compound tested. The results show that the decrease in ThT fluorescence noticed with EUs is related to the presence of the phenylurea moiety. Accordingly, EU derivatives that are devoid of the phenylurea moiety, such as EU-424 and EU-523, did not inhibit the formation of fibrils in this study at 100 μ M (1:10 molar ratio). However, all EU derivatives (EU-362, EU-474, EU-477, EU-486, EU-513) bearing an electron donating group on the 3-position displayed potent anti-amyloidogenic activity. Substitution on the 2-position with identical sets of structural modification did not provide an inhibition of the fibrillization when compared with the corresponding EU derivative. Among the effective EUs, EU-362 and EU-418 inhibited the amyloid formation of hIAPP in a concentration-dependent manner (**Fig. 1**) and the IC_{50} values are 49.9 and 4.1 μ M, respectively.

Table 1. Fibrillar aggregation properties of hIAPP incubated with different drug treatments at 100 μ M, molar ratio 1:10. Standard deviation for each parameter was calculated.

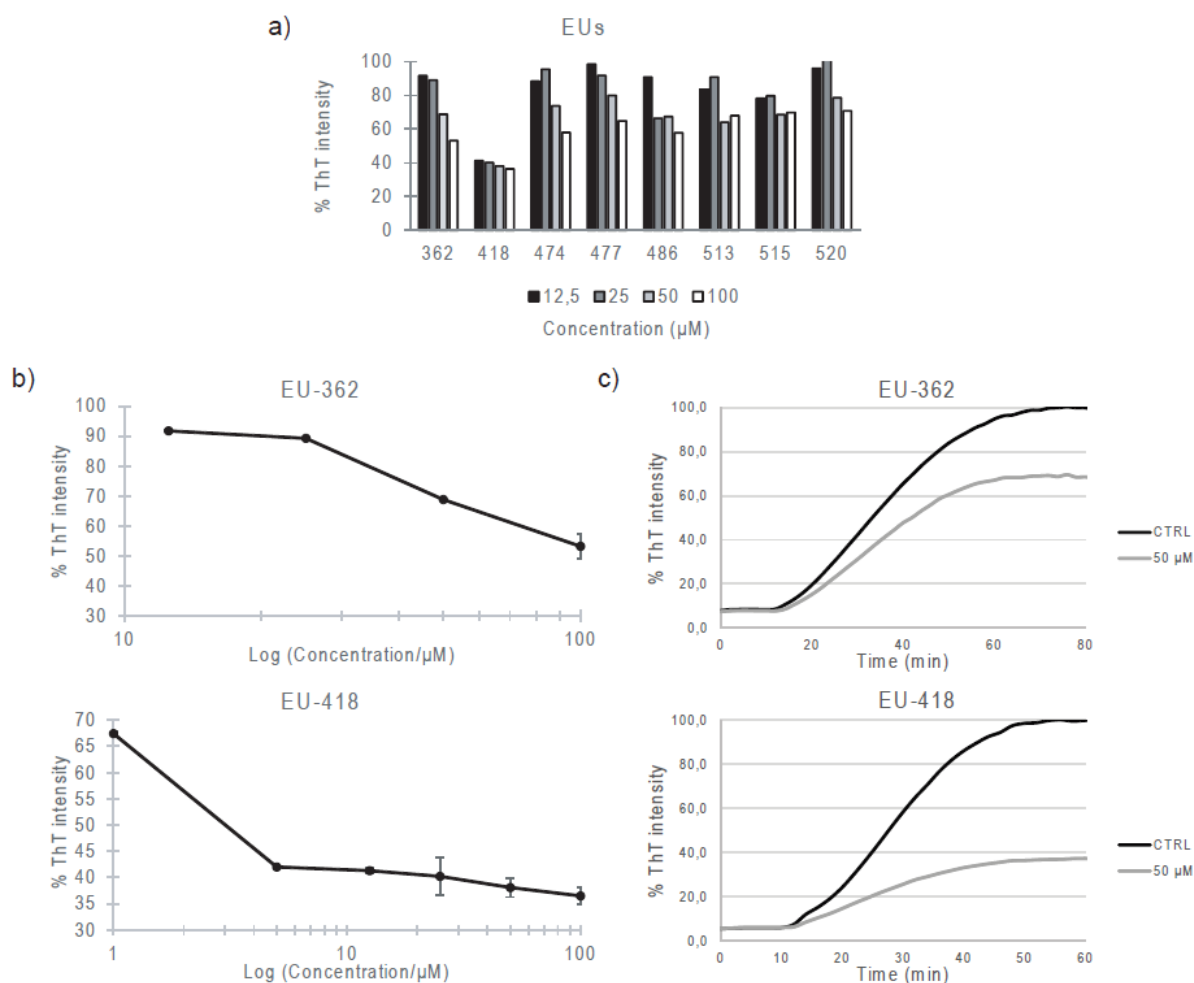


Fibril formation ^a			
R	EU #	Intensity (%) ^b	Amyloidogenic ^c
	421	90.9 ± 0.3	+++
	455	100.7 ± 0.6	+++
	520	70.8 ± 6.3	-
	418	35.4 ± 3.3	--
	424	113.2 ± 4.4	++++
	362	53.2 ± 4.2	-
	360	102.4 ± 3.6	+++
	580	129.0 ± 3.5	++++
	515	69.9 ± 5.8	-
	477	64.9 ± 4.7	-
	483	106.9 ± 2.4	+++
	474	58.1 ± 2.9	-
	470	107.2 ± 4.5	+++
	486	57.8 ± 5.2	-
	489	170.1 ± 9.5	+++++
	493	97.6 ± 2.9	+++
	501	107.9 ± 2.8	+++
	513	68.1 ± 4.1	-
	518	100.6 ± 1.4	+++

	091	99.1 ± 0.4	+++
	361	105.2 ± 0.5	+++
	442	99.6 ± 1.5	+++
	433	104.2 ± 0.3	+++
	430	107.6 ± 0.4	+++
	436	106.8 ± 0.4	+++
	427	94.4 ± 0.3	+++
	451	100.2 ± 8.5	+++
	439	96.5 ± 0.8	+++
	448	102.9 ± 0.8	+++
	445	100.7 ± 0.5	+++
	523	96.3 ± 1.7	+++
HFIP 1 %		100 ± 0.4	+++

^a The concentration of hIAPP was 10 μM. ^b The fluorescence intensity of hIAPP alone was set as 100 %. ^c The amyloidogenic parameter is a semi-quantitative analysis of ThT-fluorescence-based amyloid formation and indicates samples with fluorescence intensity values between: 140 and 175 %, "+++++"; 110 and 140 %, "++++"; 75 and 110 %, "+++"; 40 and 75 %, "-"; and 10 and 40 %, "- -". HFIP = Hexafluoroisopropanol

Fig. 1. Effect of potent EU inhibitors on hIAPP fibril formation. a) Histogram of the inhibition of hIAPP fibril formation, expressed by the fluorescence intensity, using the most potent EUs at different concentrations. b) Dose-dependent inhibition of hIAPP fibrils formation by EU-362 and EU-418. Data are expressed as a ratio of the ThT fluorescence intensity of hIAPP incubated with EUs at each concentration for 1 hour to that of the control, hIAPP without treatment. c) Relative ThT fluorescence intensity of hIAPP with different effective pharmacologic treatments (EU-362, EU-418) tested at a concentration of 50 μ M. ThT-fluorescence of hIAPP was assessed at 25 $^{\circ}$ C in PBS buffer at a peptide concentration of 10 μ M and a molar ratio of 1:5.



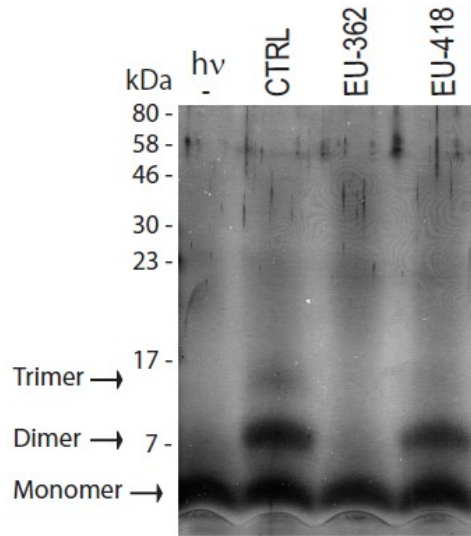
EU-362 interferes with hIAPP oligomerization and fibril formation

The PICUP-based photo-cross-linking assay was conducted to evaluate the potential of EU-362 and EU-418 to impede hIAPP oligomerization. As shown in **Fig. 2 a)**, freshly

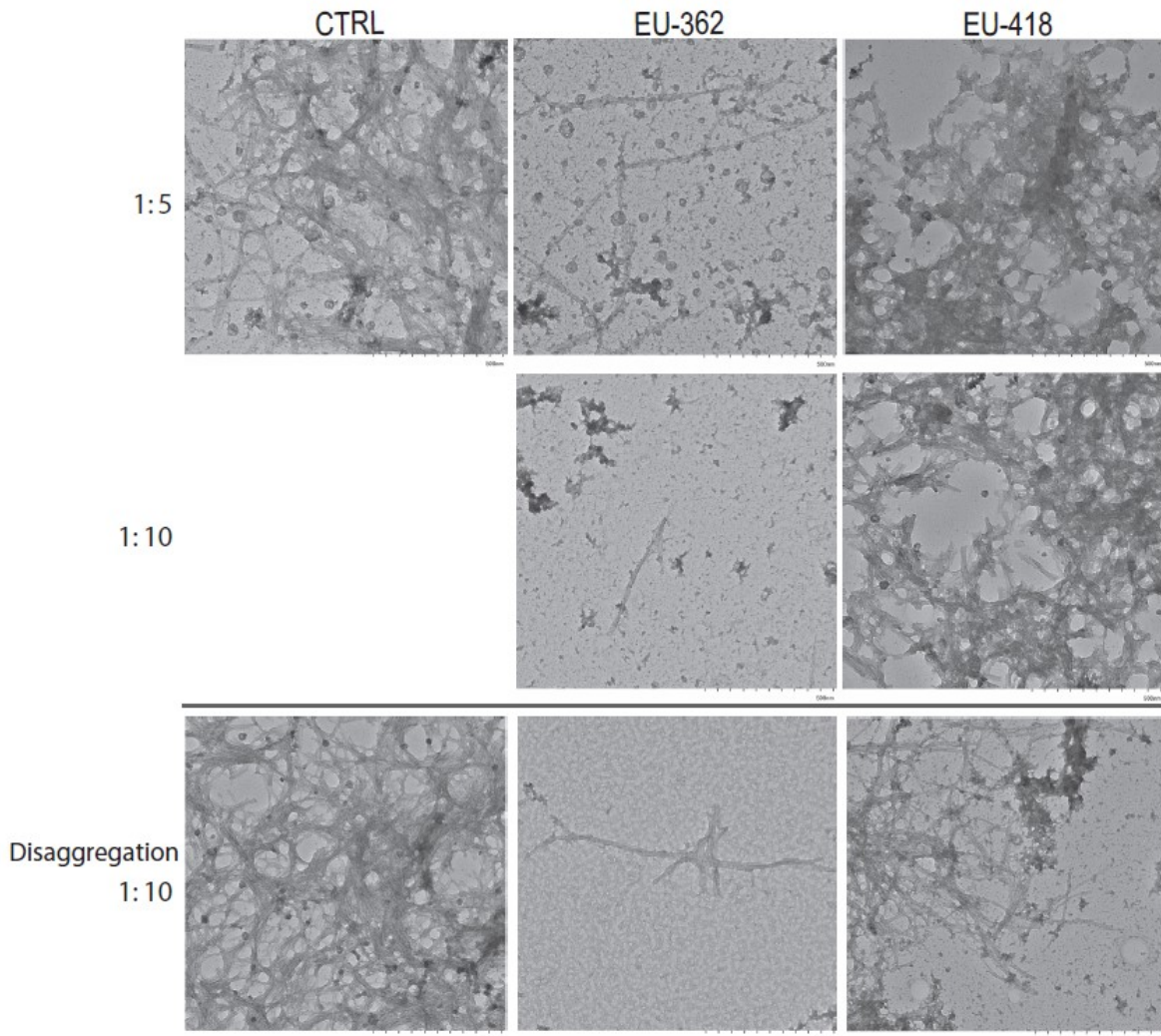
prepared hIAPP was in a monomeric state. After being subjected to a short light exposure, hIAPP was in a monomeric and oligomeric forms with cross-linking. EU-362 treatment abrogated the oligomerization of hIAPP: only the monomers were identified following the migration in the gel. EU-418 was not able to reduce or to stop the oligomerization at a molar ratio of 1:5. Transmission electronic microscopy (TEM) experiments confirmed that the addition of EU-362 at a molar ratio of 1:5 decreased fibril formation, in contrast to EU-418 (**Fig. 2 b**). The most significant changes were observed using a molar ratio of 1:10. EU-362 was effective at reversing or disaggregating fibril formation when added to preformed fibrils.

Fig. 2. Oligomerization and fibril formation of hIAPP studied by the photo-induced cross-linking (PICUP) assays and (TEM), respectively. a) Lane 1, hIAPP without irradiation; lane 2, hIAPP with irradiation; lanes 3-4, 1:5 molar ratio of hIAPP/EUs with irradiation. b) Transmission electron microscopy (TEM) images of hIAPP peptide with and without treatment. Each peptide was incubated in PBS buffer for 1 h at 60 μ M with the drugs at either 600 μ M or 300 μ M. A second experiment (disaggregation) was performed using the same concentrations, however, hIAPP was incubated for 24 h prior to pharmacologic treatments. Drugs were incubated in the presence of hIAPP for 24 h.

a)



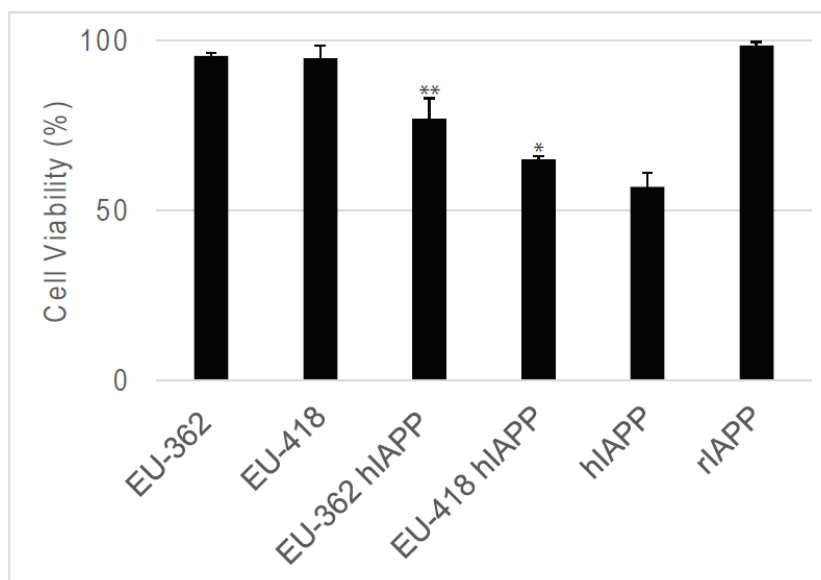
b)



EUs reduce the cytotoxicity of hIAPP fibrils

Cell viability assays were performed using MIN-6 cells to evaluate the potential of EUs to protect cells from toxic hIAPP fibrils. The resazurin assay was performed after treatment with hIAPP in the presence or the absence of EU-362 or EU-418 at a molar ratio of 1:5. The fluorescence intensity of MIN-6 cells alone was set arbitrarily at 100%. The survival assay demonstrated that EU-362 has superior protective properties (**Fig. 3**). The viability of cells subjected to hIAPP decreased to 57 % after an incubation time of 24 h. The addition of EU-362 and EU-418 were both beneficial to keep cell viability at 77 % and 65 %, respectively. In the absence of hIAPP, EU-362 and EU-418 had no effect on cells.

Fig. 3. MIN-6 cell viability in the presence of hIAPP alone and hIAPP with EU-362 or EU-418, as determined by resazurin-based assays. hIAPP was tested at 10 μ M and with effective concentrations (50 μ M) of each drug. The molar ratios were 1:5. Rat IAPP (rIAPP) and drug treatments without peptides were used as negative controls. The one-way analysis of variance with Dunnett's multiple comparison test showed significant differences between IAPP and several pharmacologic treatments (* and * * are indicative of $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively).



Discussion

ThT specifically binds to the β -sheet structure of protein fibrils, providing a strong fluorescence emission (Zhang et al. 2011). Since the fluorescence emission increases with fibril formation, the kinetic process of fibrillization is routinely assessed using ThT fluorescence assays to study the effect of potential drug inhibitors. A major challenge involved the difficulty of using the ThT assays to perform high throughput screening. The effect of drugs on the ThT kinetics aggregation assay could be related to the displacement of ThT binding to the amyloids (Meng et al. 2008). Thus we recognized the importance of using methodology that allows direct testing or observation of amyloid formation. To achieve this, we combined the Thioflavin T-based fluorescence assays with the PICUP, TEM and biological assays. TEM evaluation revealed that EU-418 didn't significantly reduce hIAPP fibril formation. EU-362 was effective in impeding hIAPP oligomerization and fibrillization, as well as disaggregating pre-formed fibrils. EU-362 and 418 were more effective inhibitors than EU-474, EU-477, EU-486 and EU-513, suggesting that a supplementary phenyl ring or a morpholinyl moiety is important in suppressing amyloid formation. Interestingly, EU-362 was more potent than EU-418 in exerting protective effects on MIN-6 cells. Considering the biophysical and biological evaluations of this study, EU-362 alters hIAPP fibril formation.

Although more insights are presented on the fibrillization process, further studies are needed for the development of effective and relevant inhibitors of pancreatic amyloidosis. Most natural products bearing aromatic groups and polyphenols that have been found to inhibit hIAPP fibril formation present potential challenge for clinical use such as inadequate bioavailability and/or metabolism via cytochrome CYP450 enzymes. EUs are potent inhibitors of hIAPP amyloid formation by reducing amyloid fibrilization, oligomerization and cell toxicity. Indeed, we demonstrated inhibition of hIAPP fibril formation using a totally new scaffold, the ethylurea, at a micromolar concentration. The ethylurea scaffold is of potential interest for development of new anti-diabetes therapies because of their non-cytotoxic impact on various cell lines. Proto-fibrils have been shown to be toxic to cells and, consequently, a valuable amyloid inhibitor should counteract monomer or early oligomer formation, thus preventing the buildup of toxic species. Herein, we have reported EUs that were potent

inhibitors of oligomerization. EUs could represent a new class of effective inhibitors of hIAPP fibril and oligomer formation relevant to the development of new therapies for type 2 diabetes.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Diabète Québec. This work was supported by a grant from Diabète Québec. The transmission electron microscopy infrastructure was financially supported by Canada Foundation for Innovation (CFI) Leaders Fund (Dr. Carl A. Gagnon). We are grateful for the technical advice and support offered by Dr. Carl A. Gagnon and Dr. Chantale Provost.

References

- Abedini, A., and Schmidt, A.M. 2013. Mechanisms of islet amyloidosis toxicity in type 2 diabetes. *FEBS Lett* **587**(8): 1119-1127. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.017.
- Bram, Y., Frydman-Marom, A., Yanai, I., Gilead, S., Shaltiel-Karyo, R., Amdursky, N., and Gazit, E. 2014. Apoptosis induced by islet amyloid polypeptide soluble oligomers is neutralized by diabetes-associated specific antibodies. *Sci Rep* **4**: 4267. doi: 10.1038/srep04267.
- Cao, P., Abedini, A., Wang, H., Tu, L.H., Zhang, X., Schmidt, A.M., and Raleigh, D.P. 2013. Islet amyloid polypeptide toxicity and membrane interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(48): 19279-19284. doi: 10.1073/pnas.1305517110.
- Cao, P., and Raleigh, D.P. 2012. Analysis of the inhibition and remodeling of islet amyloid polypeptide amyloid fibers by flavanols. *Biochemistry* **51**(13): 2670-2683. doi: 10.1021/bi2015162.
- Cheng, B., Gong, H., Li, X., Sun, Y., Zhang, X., Chen, H., Liu, X., Zheng, L., and Huang, K. 2012. Silibinin inhibits the toxic aggregation of human islet amyloid polypeptide. *Biochem Biophys Res Commun* **419**(3): 495-499. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.042.
- Chow, H.H., Hakim, I.A., Vining, D.R., Crowell, J.A., Ranger-Moore, J., Chew, W.M., Celaya, C.A., Rodney, S.R., Hara, Y., and Alberts, D.S. 2005. Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of

- Polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res* **11**(12): 4627-4633. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2549.
- Daval, M., Bedrood, S., Gurlo, T., Huang, C.J., Costes, S., Butler, P.C., and Langen, R. 2010. The effect of curcumin on human islet amyloid polypeptide misfolding and toxicity. *Amyloid* **17**(3-4): 118-128. doi: 10.3109/13506129.2010.530008.
- Fortin, J.S., and Benoit-Biancamano, M.O. 2015. In Vitro Evaluation of Hypoglycemic Agents to Target Human Islet Amyloid Polypeptide: A Key Protein Involved in Amyloid Deposition and Beta-Cell Loss. *Can J Diabetes*. doi: 10.1016/j.jcjd.2015.01.291.
- Fortin, J.S., Cote, M.F., Lacroix, J., Petitclerc, E., and R, C.G. 2008. Aromatic 2-chloroethyl urea derivatives and bioisosteres. Part 2: Cytocidal activity and effects on the nuclear translocation of thioredoxin-1, and the cell cycle progression. *Bioorg Med Chem* **16**(15): 7477-7488. doi: 10.1016/j.bmc.2008.06.006.
- Fortin, J.S., Lacroix, J., Desjardins, M., Patenaude, A., Petitclerc, E., and R, C.G. 2007. Alkylation potency and protein specificity of aromatic urea derivatives and bioisosteres as potential irreversible antagonists of the colchicine-binding site. *Bioorg Med Chem* **15**(13): 4456-4469. doi: 10.1016/j.bmc.2007.04.028.
- Hard, T., and Lendel, C. 2012. Inhibition of amyloid formation. *J Mol Biol* **421**(4-5): 441-465. doi: 10.1016/j.jmb.2011.12.062.
- Jiang, P., Li, W., Shea, J.E., and Mu, Y. 2011. Resveratrol inhibits the formation of multiple-layered beta-sheet oligomers of the human islet amyloid polypeptide segment 22-27. *Biophys J* **100**(6): 1550-1558. doi: 10.1016/j.bpj.2011.02.010.
- Kamata, K., Mizukami, H., Inaba, W., Tsuboi, K., Tateishi, Y., Yoshida, T., and Yagihashi, S. 2014. Islet amyloid with macrophage migration correlates with augmented beta-cell deficits in type 2 diabetic patients. *Amyloid* **21**(3): 191-201. doi: 10.3109/13506129.2014.937857.
- Meng, F., Marek, P., Potter, K.J., Verchere, C.B., and Raleigh, D.P. 2008. Rifampicin does not prevent amyloid fibril formation by human islet amyloid polypeptide but does inhibit fibril thioflavin-T interactions: implications for mechanistic studies of beta-cell death. *Biochemistry* **47**(22): 6016-6024. doi: 10.1021/bi702518m.

- Mounetou, E., Miot-Noirault, E., Gaudreault, R.C., and Madelmont, J.C. 2010. N-4-iodophenyl-N'-2-chloroethylurea, a novel potential anticancer agent with colon-specific accumulation: radioiodination and comparative in vivo biodistribution profiles. *Invest New Drugs* **28**(2): 124-131. doi: 10.1007/s10637-009-9222-z.
- Muzzio, M., Huang, Z., Hu, S.C., Johnson, W.D., McCormick, D.L., and Kapetanovic, I.M. 2012. Determination of resveratrol and its sulfate and glucuronide metabolites in plasma by LC-MS/MS and their pharmacokinetics in dogs. *J Pharm Biomed Anal* **59**: 201-208. doi: 10.1016/j.jpba.2011.10.023.
- Seeliger, J., Estel, K., Erwin, N., and Winter, R. 2013. Cosolvent effects on the fibrillation reaction of human IAPP. *Phys Chem Chem Phys* **15**(23): 8902-8907. doi: 10.1039/c3cp44412k.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J., and Westermark, P. 2014. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid* **21**(4): 221-224. doi: 10.3109/13506129.2014.964858.
- Westermark, P., Andersson, A., and Westermark, G.T. 2011. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev* **91**(3): 795-826. doi: 10.1152/physrev.00042.2009.
- Yang, K.Y., Lin, L.C., Tseng, T.Y., Wang, S.C., and Tsai, T.H. 2007. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **853**(1-2): 183-189. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.03.010.
- Zhang, X., Cheng, B., Gong, H., Li, C., Chen, H., Zheng, L., and Huang, K. 2011. Porcine islet amyloid polypeptide fragments are refractory to amyloid formation. *FEBS Lett* **585**(1): 71-77. doi: 10.1016/j.febslet.2010.11.050.

Chapitre VII

7. Discussion générale

La recherche dans le domaine de l'amyloïde est florissante et dans un état d'exaltation puisque nous commençons à comprendre à un niveau moléculaire l'origine des structures, le mécanisme de formation sous différentes conditions et les propriétés des états fonctionnels natifs, préfibrillaires et fibrillaires des protéines. L'augmentation des connaissances dans le domaine de l'amyloïdose procurera l'opportunité de perturber spécifiquement les effets des comportements aberrants des protéines afin de prévenir ou de traiter la maladie. Plusieurs développements sont en cours, incluant l'exploitation de nouvelles techniques *in vivo* afin de suivre le développement ou le démantèlement des agrégats de différents types par de nouvelles approches afin de perturber le processus de formation de l'amyloïde en utilisant diverses molécules. En terme d'impact médical, l'augmentation des connaissances sur la formation de l'amyloïde et l'introduction de nouvelles familles de molécules qui interagissent et perturbent le processus d'agrégation mèneront à l'introduction ou au développement de nouveaux outils diagnostiques qui sont cruciaux afin de détecter l'apparition et la progression de l'amyloïdose. Ces techniques diagnostiques permettront d'identifier d'autres cibles thérapeutiques pour le développement de nouvelles molécules anti-amyloïdogéniques et de suivre l'efficacité thérapeutique de ces molécules aux différents stades de la maladie.

Les séquences non-amyloïdogéniques obtenues du tamarin lion doré (*Leontopithecus rosalia*), du grand dauphin (*Tursiops truncatus*) et de l'alpaga (*Vicugna pacos*) n'ont pas été décrites dans la littérature. Des nouvelles familles de composés anti-amyloïdogéniques envers l'hIAPP ont été décrites dans le cadre de cette étude, soit les hypoglycémiants, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens et les aryles éthyles urées. Les variations critiques en acides aminés et les relations structure-activité requises pour l'inhibition de l'amyloïdose pancréatique ont été partiellement établies. Les éléments clefs émergeant de nos travaux sur l'agrégation fibrillaire de l'hIAPP sont résumés par le biais des 6 questions suivantes :

Quelles sont les variations importantes dans la séquence en acide aminés provenant des différentes espèces?

Dans le cadre du projet de recherche, l'étude d'une variété d'homologues de l'IAPP provenant de différentes espèces animales et leur propension à former des dépôts d'amyloïde a été effectuée. Le gène de l'IAPP a été isolé et séquencé en partie chez plusieurs espèces animales. Le segment 8-32 provenant de chaque espèce animale a été synthétisé. Les régions 1-7 et 33-37 ne sont pas dans la séquence puisque l'intérêt de l'étude porte sur les régions variables. De plus, une séquence plus courte a permis d'obtenir une librairie rapidement à moindre coût. L'évaluation du potentiel d'amyloïdogénicité des homologues a permis de trouver 4 séquences peptidiques non-amyloïdogéniques. Des sites de variation ayant un impact fonctionnel ont été identifiés via les séquences non-amyloïdogéniques dans le segment 8-20 (motif NFLVH) et au niveau des acides aminés en position 29, 14 et 18. Les homologues peptidiques de la catégorie des primates non humains tels que le peptide 8 (Colobe guérezza, *Colobus guereza*), le peptide 9 (Patatas, *Erythrocebus patas*), le peptide 11 (Mandrill, *Mandrillus sphinx*) et le peptide 12 (Macaque japonais, *Macaca fuscata*) sont hautement amyloïdogéniques et cytotoxiques. La variation H18R et le motif GTLS ont contribué à la formation de l'amyloïde puisque le paramètre du délai de la réaction d'agrégation ("*lag-time*") était plus court que celui de l'hIAPP. Il est important de mentionner que le peptide 8 (*Colobus guereza*) contient une proline en position 25 et celle-ci n'est pas suffisante pour abroger la formation d'amyloïde. Au contraire, une étude a démontré que la présence d'une proline en position 26 empêchait significativement l'agrégation fibrillaire (Khemtemourian et al., 2008). Nos travaux portant sur l'étude des variations critiques en acides aminés permettent de répondre partiellement à l'objectif 1 de cette thèse. Des études complémentaires seront nécessaires afin de trouver de nouvelles séquences amyloïdogéniques et non-amyloïdogéniques qui permettent d'identifier des acides aminés impliqués dans la formation de l'amyloïde pancréatique. En se basant sur l'identification des acides aminés critiques pour la formation de l'amyloïde, des inhibiteurs peptidiques contre l'agrégation fibrillaire de l'hIAPP pourront être synthétisés.

Quelles sont les relations structure-activité requises pour abroger l'agrégation de l'hIAPP?

L'identification de molécules qui peuvent se lier aux espèces dynamiques et fluctuantes présentes dans la cascade de l'amyloïdose est un grand défi. Les chimiothèques

virtuelles sont vastes (Dobson, 2004) et, de fait, il est très probable d'identifier quelques familles de molécules qui peuvent être synthétisées afin d'effectuer un criblage sur les agrégats fibrillaires de l'hIAPP. Un avantage d'avoir une large sélection de différentes molécules ayant la propriété de moduler l'agrégation fibrillaire est l'augmentation de la probabilité de trouver un composé s'avérant actif et prometteur. Le mécanisme d'action des composés actifs et des colorants utilisés dans les essais de criblage moléculaire (rouge Congo, thioflavine T) n'est pas encore complètement élucidé. Des données récentes suggèrent que la thioflavine T s'intercale entre les feuillets β à angle droit par rapport aux brins β (" β -strands") (Wolfe et al., 2010). Afin d'atteindre l'objectif d'abroger la formation de fibrilles d'amyloïde pancréatique humaine, des études extensives sur les relations structure-activité sont requises afin d'évaluer plusieurs groupements chimiques dans le but de fournir une plus grande avidité et spécificité.

Dans le cadre de ce projet de recherche, une étude sur les relations structure-activité de diverses classes pharmacologiques (hypoglycémisants, anti-inflammatoires non-stéroïdiens, aryles éthyles urées) a été conduite dans le but d'abroger la formation de l'amyloïde pancréatique *in vitro*. L'utilisation de composés chimiques contenant des groupements aromatiques, cycliques conjugués, polyphéols et urées a été étudiée. Les hypoglycémisants qui abrogent ou retardent l'agrégation fibrillaire de l'hIAPP sont le glyburide, le répaglinide et la troglitazone. Ces composés ont tous en commun 2 noyaux aromatiques (A et B) liés entre eux via 4 atomes. Des substituants donneurs d'électron (halogène, amine, alcool) sur le noyau aromatique B se retrouvent en position ortho et/ou para. Le noyau aromatique A présente des substituants nucléophiles, soit un groupement sulfonyle, thiazolidine-2,4-dione, et 2-ethoxybenzoïque. Le répaglinide abroge l'oligomérisation de l'hIAPP. Cette molécule porte des groupements aliphatiques (isobutyle et ethoxyle) qui permettent peut-être des interactions hydrophobes avec la protéine monomérique contribuant à contrecarrer la multimérisation.

Les anti-inflammatoires anti-amyloïdogéniques sont le diclofenac, le méloxicam, le phénylbutazone, le sulindac et le ténoxiam. Le diclofenac et le sulindac, de la famille des acides acétiques, sont des molécules particulièrement intéressantes puisqu'elles inhibent l'oligomérisation. Ces molécules portent un groupement acide acétique et des groupements cycliques conjugués. Concernant le criblage moléculaire réalisé avec les aryles éthyles urées,

ces travaux mettent en évidence l'importance de groupements donneurs d'électrons. En particulier, des hétérocycles, des éthers et des amines se retrouvent à la position 3 sur le noyau aromatique. Plusieurs molécules actives possèdent un cycle aromatique ou aliphatique en position 3. Les aryles éthyles urées les plus intéressantes par rapport à leur potentiel anti-amyloïdogénique étaient la EU-362 et la EU-418. L'éthyle urée EU-362 abroge l'oligomérisation et la formation d'agrégats fibrillaires (résultat confirmé en microscopie électronique à transmission).

La notion générale à retenir de cette étude réalisée sur les 3 classes pharmacologiques est que la présence de groupements donneurs d'électrons (alcool, amine, halogène) sur un noyau aromatique et la présence d'hétérocycle semblent importants pour l'obtention d'une activité anti-amyloïdogénique. Ces données préliminaires permettent de répondre, en partie, à l'objectif 2 de cette thèse et ouvrent la porte à d'éventuelles études *in vitro* sur les relations structure-activité dans le but d'augmenter l'efficacité des composés et *in vivo* sur les composés optimisés testés à partir de différents modèles animaux transgéniques.

Est-il important d'utiliser plusieurs méthodologies dans le domaine de l'amyloïdose?

Les conclusions obtenues des expériences réalisées sur le processus d'agrégation de l'hIAPP *in vitro* sont compliquées par le fait que la plupart des préparations synthétiques de l'IAPP contient des fibrilles avant la réalisation d'une expérience. L'hIAPP est très amyloïdogénique, ce qui entraîne la difficulté à définir l'état natif soluble de ce peptide. Les observations *in vitro* peuvent varier selon les méthodes de préparation (synthèse, purification) du peptide, le pH de la solution tampon utilisée, l'utilisation de solution mère concentrée pouvant contenir des fibrilles et les différents solvants utilisés pour solubiliser le peptide. L'utilisation de solvants organiques, comme le 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) ou le 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), favorisent la présence de la structure en hélice α (Hubbard et al., 1991; McLean et Balasubramaniam, 1992). En plus du DMSO, ces solvants sont utilisés de routine dans les différentes expériences physico-chimiques pour étudier la conformation du peptide, mais ceci ne permet pas l'extrapolation des conclusions obtenues de résultats *in vitro* aux conditions *in vivo*, dans lesquelles les structures tridimensionnelles peuvent être différentes (Barrow et al., 1992; Shen et Murphy, 1995). La conformation structurale de l'IAPP demeure inconnue dans une cellule β et dans la circulation sanguine.

Les analyses *in silico* réalisées avec le programme AGGRESKAN permettent de prédire la formation de l'amyloïde. Toutefois, les analyses *in silico* n'excluent pas la formation d'agrégats amorphes, et des expériences *in vitro* doivent être conduites afin d'éliminer les résultats faussement positifs. Les analyses *in silico* effectuées dans notre étude sur les séquences peptidiques ont permis de prédire correctement que les séquences provenant de l'alpaga (*Vicugna pacos*, peptide 15), du tamarin lion doré (*Leontopithecus rosalia*, peptide 10) et du rat (*Rattus norvegicus*, peptide 3) ne sont pas amyloïdogéniques. Les analyses *in silico* ont démontré incorrectement que le peptide provenant du grand dauphin (*Tursiops truncatus*, peptide 17) était amyloïdogénique. Tous les autres peptides étaient amyloïdogéniques *in vitro* et consistants avec les résultats *in silico*. Le programme AGGRESKAN est un outil très intéressant à exploiter pour prédire les séquences amyloïdogéniques et demeure complémentaire aux expériences *in vitro*.

Dans le cadre de notre étude sur l'analyse du potentiel d'amyloïdogénicité de différentes séquences, nous avons exploité différentes méthodologies afin de détecter la présence de fibrilles, voire même en infime quantité. L'importance de détecter une petite proportion des conformations en brins β ou des agrégats fibrillaires est d'autant plus supportée par la cinétique de l'agrégation fibrillaire, qui implique une nucléation et une phase d'élongation. La présence d'une infime quantité d'oligomères suffit pour enclencher le processus de fibrillation. Dans ce contexte, différentes conditions expérimentales (concentrations de peptides, temps d'incubation) et méthodologies ont été utilisées afin de confirmer la présence de fibrilles. Concernant les expériences de dichroïsme circulaire dans l'ultraviolet lointain (CD) et d'essai de liaison au rouge Congo, la concentration a été augmentée afin de permettre la détection de fibrilles. L'essai de liaison à la thioflavine T est très sensible, mais la présence de faux négatifs, soit un peptide non-amyloïdogénique à l'essai de liaison qui est en fait amyloïdogénique, est possible lorsque le temps d'incubation n'est pas assez long pour observer l'agrégation fibrillaire. Un facteur limitant la durée de l'expérimentation est l'évaporation du tampon, qui survient après 16 h à l'intérieur du lecteur de plaque, même si la température est contrôlée. L'observation des différents peptides en microscopie électronique après un temps d'incubation de 48 h a permis de valider les peptides non-amyloïdogéniques.

Il y a plusieurs contradictions entre l'essai de liaison à la thioflavine T et celui au rouge Congo. L'essai de liaison à la thioflavine T était positif pour le peptide 6 (raton laveur, *Procyon lotor*) et le peptide 13 (loutre à joues blanches, *Aonyx capensis*; loutre à cou tacheté, *Hydrictis maculicollis*; Martre d'Amérique, *Martes americana*), mais négatif pour l'essai de liaison au rouge Congo. L'essai de liaison au rouge Congo est utile pour distinguer les structures en brins β des agrégats irréguliers. Toutefois, les protéines qui présentent une faible proportion de structures secondaires repliées en feuillet β ne colorent pas au rouge Congo (Klunk et al., 1989). Les peptides 2 (chien domestique, *Canis lupus familiaris*; renard roux, *Vulpes vulpes*) et 7 (petit panda, *Ailurus fulgens*) ont en commun deux acide aminés, Arg18 et Tyr19, qui sont possiblement importants pour l'observation d'une boucle β (" β -turn"). Ce changement de conformation a été observé à 72 h dans les expériences de dichroïsme circulaire dans l'ultraviolet lointain (CD). La faible quantité présente à 24 h n'a pas été suffisante pour observer un résultat positif dans l'essai de liaison au rouge Congo.

Concernant le criblage moléculaire effectué sur l'hIAPP, l'essai de liaison à la thioflavine T est idéal afin de suivre rapidement l'agrégation fibrillaire. La liaison des fibrilles avec la thioflavine T entraîne une augmentation de l'émission de fluorescence (Naiki et al., 1990; Levine, 1999). Cette augmentation du signal suit une courbe sigmoïdale dans le temps qui permet d'obtenir les paramètres de la cinétique de l'agrégation fibrillaire aux étapes suivants : le temps requis afin d'observer l'agrégation fibrillaire ("*lag-time*"), la phase d'élongation et la phase stationnaire (plateau) (Naiki et al., 1990; Levine, 1999). Lorsqu'un criblage moléculaire est réalisé sur une protéine amyloïdogénique, les paramètres critiques sont le délai observé pour l'initiation de la réaction et le plateau. L'intensité de l'émission de la fluorescence ne peut pas être corrélée à la quantité d'agrégats fibrillaires (Levine, 1999). La thioflavine libre émet de la fluorescence à un niveau beaucoup plus faible par rapport à celle liée à l'amyloïde. Un résultat faux négatif peut être explicable par le fait qu'un composé déplace la thioflavine au lieu d'interagir directement avec l'amyloïde (Meng et al., 2008; Suzuki et al., 2012). De plus, différentes morphologies peuvent survenir et générer différentes intensités d'émission de la fluorescence (Pedersen et al., 2006). Les agrégats amorphes peuvent aussi se lier à la thioflavine, mais ils provoquent une faible augmentation d'émission de la fluorescence par rapport aux fibrilles matures (Otzen et al., 2002; Giehm et al., 2011).

Un changement dans le "*lag-time*" est souvent un bon indicateur d'une perturbation de la réaction de l'agrégation fibrillaire. L'obtention de ce paramètre requiert plusieurs points de mesures dans le temps et une cinétique de plus longue durée.

Le dichroïsme circulaire dans l'ultraviolet lointain (CD) procure des informations sur les proportions des protéines qui ont une structure secondaire spécifique telle que l'hélice α , le feuillet β , le tournant- β (" *β -turn*") ou en structures aléatoires ("*random coil*") (Provencher et al., 1981; Huang et al., 2000; Hong et al., 2011). Cette technique ne permet pas d'observer l'hétérogénéité des oligomères individuellement puisqu'elle mesure l'ensemble de plusieurs oligomères. L'essai de liaison croisée photo-induite ("*photo-induced cross-linking of unmodified proteins*", PICUP) est une technique qui a été employée dans notre étude impliquant le criblage moléculaire afin d'étudier les formes intermédiaires (monomères, oligomères); par contre, elle est laborieuse et difficile à réaliser. La combinaison de ces différentes techniques couplées à la microscopie électronique à transmission et la culture cellulaire permettent de valider adéquatement les composés qui sont anti-amyloïdogéniques *in vitro*.

Est-ce pertinent de cibler l'oligomérisation ou la formation des fibrilles?

L'amyloïdose pancréatique et l'hyperglycémie sont présents chez plus de 90 % des patients souffrant du diabète de type 2. Toutefois, la physiopathologie et la symptomatologie du diabète de type 2 est très variable d'un patient à un autre. L'amyloïde contribue probablement au stade final de la maladie, qui requiert l'utilisation de l'insulinothérapie. Il est alors nécessaire de développer des stratégies afin d'identifier les patients à risque d'être atteints sévèrement de l'amyloïdose pancréatique et d'instituer une thérapie ciblée contre une des étapes de l'agrégation fibrillaire. Depuis les dernières années, il y a un intérêt marqué pour les maladies dégénératives associées à l'agrégation des protéines. L'amyloïdose diffère des autres conditions médicales comme les maladies bactériennes, virales, cancéreuses ou cardiovasculaires. Elle est entraînée par l'échec du contrôle et de la régulation des processus qui empêchent les protéines de se retrouver dans un état mal replié ou anormal de façon persistante, pouvant perturber les fonctions cellulaires normales.

Les interventions pharmaceutiques requièrent différentes stratégies par rapport aux modèles classiques de la pharmacothérapie (ligand-récepteur, substrat-enzyme). Les avancées dans les connaissances sur la compréhension des mécanismes de l'agrégation offrent de nouvelles opportunités d'intervenir thérapeutiquement d'une manière rationnelle. Les différentes thérapies n'impliquent pas le besoin d'être sélectif dans certains processus analogues, comme par exemple les bactéries versus l'hôte, mais peut englober les différences sous-jacentes entre les protéines dans leur état fonctionnel et dans un état replié puisqu'elles possèdent des propriétés différentes. Afin de trouver des traitements ou de prévenir l'amyloïdose, il est possible d'imaginer qu'un chimiste médicinal développe et optimise des molécules ciblant les différentes étapes qui impliquent des changements de conformation (ou repliement anormal) et le processus d'agrégation.

Par ailleurs, une des stratégies devrait initialement prévenir le processus de l'agrégation fibrillaire puisqu'une fois que les étapes initiales d'agrégation ont pris place, la prolifération des agrégats devient efficace et incontrôlable. Un exemple de stratégie de prévention mis au point pour le traitement de l'amyloïde implique l'agrégation de la transthyrétine. Cette protéine a pour fonction de transporter une hormone thyroïdienne, soit la thyroxine. Elle est très riche en feuillet β et se retrouve à l'état natif sous la forme d'un homotétramère. Cependant, cette conformation est susceptible d'être déstabilisée par un grand nombre de mutations et les monomères associés sont hautement sujets à l'agrégation, engendrant une famille de maladies incluant une condition systémique et neurologique. Un substrat de cette protéine pouvant se lier et stabiliser l'état natif a été conceptualisé afin de réduire la probabilité de l'agrégation. Cette stratégie a permis de développer une petite molécule maintenant approuvée et utilisée en clinique, soit le tafamidis (Vyndaqel®). Le tafamidis se lie sélectivement aux deux sites de liaison de la thyroxine, normalement innocupé, de la structure homotétramérique, stabilisant cinétiquement la TTR. Les études de crystallographie effectuées sur la TTR lié au tafamidis suggèrent que la liaison stabilise l'interface dimère-dimère, prévenant ainsi la dissociation du tétramère, une étape limitant la vitesse de formation de l'amyloïde (Bulawa et al., 2012). Le tafamidis est indiqué, entre autre, en Europe pour le traitement de l'amyloïdose TTR chez les patients adultes avec une polyneuropathie symptomatique au stade précoce afin de retarder la détérioration neurologique

périphérique (Scott, 2014). Les études ont démontré qu'il y avait une stabilisation de la forme tétramérique chez les patients. Les effets bénéfiques démontrés sont la réduction d'une détérioration de la fonction neurologique et une maintenance de la qualité de vie à long terme, soit de 66 mois dans les études cliniques (Scott, 2014). Le tafamidis est généralement bien toléré par les patients.

La formation d'amyloïde suit une séquence de plusieurs étapes, débutant par un état natif allant à un état amyloïdogénique précurseur impliquant le noyau oligomérique, les protofilaments et les différents niveaux d'assemblage de fibrilles. Conséquemment, la formation d'amyloïde peut être inhibée en interférant avec l'une de ces étapes. Le fait d'intervenir au niveau de l'état natif peut impliquer une certaine spécificité par rapport à la protéine en question (ex : tafamidis), alors que les composés qui se lient aux oligomères et aux fibrilles tendent à lier différents types d'amyloïde. Un exemple pour illustrer le concept d'inhibiteur universel est le flavonoïde (polyphénol) épigallocatechine gallate (EGCG). L'EGCG est capable de moduler directement l'amyloïdogénèse de différentes protéines, entre autres l'huntingtine, la transthyrétine (TTR), l'hIAPP, l'amyloïde β et l' α -synucléine (Ehrnhoefer et al., 2006; Bieschke et al., 2010; Ferreira et al., 2011; Meng et al., 2011). L'EGCG semble agir comme une chaperonne capable de s'associer à plusieurs protéines et structures. Ceci suggère que l'EGCG ne se lie pas à une séquence spécifique d'acides aminés. Les données provenant d'études structurales indiquent que l'EGCG s'associe préférentiellement à des régions non structurées des protéines (Ehrnhoefer et al., 2008). Une étude a démontré que l'EGCG inhibe la formation d'amyloïde par l'IAPP lorsque ce composé est ajouté pendant la phase (lag phase), suggérant qu'il est possible que l'EGCG se lie à des formes intermédiaires, les monomères et les fibres matures (Ehrnhoefer et al., 2008; Hauber et al., 2009; Hudson et al., 2009; Liu et al., 2011). Les interactions entre les groupements aromatiques, ou le disulfure, ou les groupements aminés, ou la chaîne latérale possédant une tyrosine ne sont pas requis afin d'obtenir une inhibition efficace par l'EGCG (Ehrnhoefer et al., 2008; Hauber et al., 2009; Hudson et al., 2009; Liu et al., 2011). L'EGCG interagit avec le squelette de l'IAPP via des ponts hydrogène et des interactions hydrophobiques avec la chaîne latérale. Ces éléments sont consistants avec plusieurs études qui ont démontré que l'EGCG interagit avec un large éventail de chaîne latérale (Ehrnhoefer et al., 2008; Hauber et

al., 2009; Hudson et al., 2009; Liu et al., 2011). Ce type de liaison est non-spécifique et apporte une partie de l'explicite à inhiber un large éventail de polypeptides natifs, non repliés. Une autre étude a démontré que l'EGCG se lie directement aux agrégats riches en feuillet β et entraîne un changement de conformation sans provoquer le désassemblage en monomère ou oligomères (Bieschke et al., 2010). Les molécules EGCG oxydées réagissent aussi avec les amines libres des fibrilles, empêchant la dissociation et la toxicité (Palhamo et al., 2013). Des études supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer l'étape structurelle ou la combinaison des étapes où les entités anti-amyloïdogéniques (molécules, peptides, anticorps, nanoparticules) doivent intervenir afin de traiter l'amyloïdose.

Brièvement, quels sont quelques exemples possibles sur la portée des travaux effectués et la suite de ce projet?

Les travaux effectués ont permis d'identifier quelques séquences non-amyloïdogéniques et molécules intéressantes. Concernant le premier volet de l'étude, les séquences non-amyloïdogéniques pourront être mélangées avec l'hIAPP afin de confirmer si celles-ci sont capables d'inhiber la formation d'amyloïdes. Ceci permet de confirmer si les séquences identifiées ont réellement un potentiel anti-amyloïdogénique. Une perspective intéressante serait de séquencer la région non codante de l'IAPP chez plusieurs espèces animales. En effet, la plupart des études ont concentré leur effort sur la protéine elle-même et la région codante du gène IAPP (Poa et al., 2003; Shepherd et al., 2004). L'évaluation des régions non codantes ont fait l'objet de quelques études et les résultats préliminaires suggèrent que les régions régulatrices ont un rôle non négligeable dans l'expression du gène de l'IAPP (Poa et al., 2003; Shepherd et al., 2004). Une suite de ce projet pertinente est le séquençage des régions non codantes 3' et 5' chez différentes espèces animales afin de comparer ces régions entre les espèces qui peuvent acquérir l'amyloïdose pancréatique et celles qui ne développent pas de dépôts d'amyloïde. Des constructions de la séquence promotrice du gène de l'IAPP pourront être clonées en amont de la région promotrice du gène rapporteur de la luciférase. Cet essai fonctionnel, soit l'essai du gène rapporteur de la luciférase, pourra être effectué afin d'évaluer l'impact des différences présentes dans la séquence des régions promotrices. Tant qu'au deuxième volet de projet de doctorat, l'efficacité des molécules pourront être validées à l'aide de la microscopie électronique pour les composés

hypoglycémiantes et AINS. La portée des travaux consiste à utiliser d'autre système *in vitro*, comme les milieux membranaires, et les modèles animaux afin d'étudier l'efficacité des molécules à abroger la formation d'amyloïde. L'utilisation d'un radiotracer dans une étude *in vivo* permettra de suivre l'évolution de la maladie et d'évaluer l'efficacité des traitements.

Quelles sont les perspectives à venir dans le domaine de l'amyloïdose pancréatique?

Les mécanismes responsables de la formation de l'amyloïde chez les patients diabétiques de type 2 ne sont pas encore très bien compris. Plusieurs mécanismes ont été proposés et peuvent être impliqués dans l'initiation ou la progression de la cascade de l'amyloïdose comme, par exemple, une augmentation de la production et de la sécrétion de l'IAPP, une mutation génétique de l'IAPP, ou une mauvaise régulation post-translationnelle de la proIAPP (Marzban et Verchere, 2004). Malgré le fait que les variations dans la séquence peptidique jouent un rôle dans la conversion en état d'amyloïde entre les espèces animales, il n'y a pas d'évidence supportant une mutation de l'IAPP de haute prévalence chez les patients diabétiques (Nishi et al., 1990; Cook et al., 1991). Toutefois, ceci n'exclue pas la possibilité qu'une mutation au niveau des régions non codantes soit présente et impliquée dans le processus de l'amyloïdose pancréatique. L'origine de l'amyloïdose pancréatique est possiblement multifactorielle. Des études sont en cours afin d'apporter des clarifications sur les facteurs causaux majeurs pour l'apparition de l'amyloïdose pancréatique.

Il n'est pas possible de déterminer la progression longitudinale de l'amyloïdose pancréatique en médecine humaine et vétérinaire. Les dépôts d'amyloïde dans les îlots pancréatiques sont très hétérogènes. À l'examen post-mortem, le nombre d'îlots pancréatiques atteints varient de moins de 1 % et jusqu'à 80 % chez les patients souffrant du diabète de type II (Westermarck et Grimelius, 1973; Clark et al., 1984; Clark et al., 1988). La distribution des îlots affectés par l'amyloïde dans le pancréas n'est pas uniforme. Le degré d'amyloïdose au sein d'un îlot pancréatique peut-être moins de 0,5 % et plus de 90 % du volume de l'îlot (Westermarck et Grimelius, 1973; Clark et al., 1984; Clark et al., 1988). Présentement, la détection des formes amyloïdogéniques de l'hIAPP est réalisée de façon *post mortem*. Bien qu'il existe des techniques d'imagerie *in vivo* des autres formes d'amyloïdose, aucune méthode de radiomarquage non invasive et *ante mortem* n'a été développée et n'est disponible pour l'amyloïdose pancréatique dans les études expérimentales et cliniques. Un obstacle au

développement des inhibiteurs de l'amyloïdose pancréatique est l'absence de techniques d'imagerie permettant de visualiser la présence et l'évolution des dépôts d'amyloïde. Il est important de souligner l'importance d'avoir des radiotraceurs permettant la détection des espèces oligomériques ou intermédiaires plus petites qu'une fibrille. Ce radiomarquage complémentaire devra être développé afin de constater la détoxification du pancréas de ces structures délétères via l'utilisation d'entités anti-amyloïdogéniques. Le développement d'un radiotraceur permettra d'évaluer la progression du diabète de type 2, d'étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le diabète de type 2 et de valider l'efficacité des composés qui inhibent la formation de l'amyloïdose pancréatique *in vivo*.

L'amyloïdose pancréatique est très variable d'un patient à un autre. Toutefois, il y a une relation positive entre une atteinte extensive des îlots pancréatiques à l'examen *post-mortem*, une défaillance des cellules β pancréatiques et un stade avancé de la maladie nécessitant l'insulinothérapie (Schneider et al., 1980; Röcken et al., 1992; Westermark, 1994). Chez la plupart des animaux transgéniques surexprimant l'hIAPP, il y a une augmentation progressive de la formation de l'amyloïdose pancréatique avant l'apparition de l'hyperglycémie (O'Brien et al., 1986; de Koning et al., 1993a; Soeller et al., 1998; Höppener et al., 1999). Le degré d'amyloïdose est intimement relié à un état hyperglycémique dans ces modèles. Il est important de souligner que les dépôts d'amyloïde chez les souris transgéniques (âgées de moins de 1 an) sont plus prononcés chez les mâles (Janson et al., 1996; Verchere et al., 1996). Ils sont augmentés chez les femelles ayant subies une oophorectomie (Hull et al., 2001). Cette différence n'a pas été observée en médecine humaine. Il y a certes des différences notables entre l'amyloïdose pancréatique chez l'humain et les modèles murins transgéniques. Toutefois, ces modèles transgéniques sont des outils indispensables pour étudier la physiopathologie de l'amyloïdose pancréatique et le développement de nouvelles thérapies anti-amyloïdogéniques. Le développement de nouveaux modèles animaux transgéniques est aussi utile afin de refléter autant que possible la physiopathologie réelle de l'amyloïdose pancréatique et le phénomène du vieillissement. La grande variabilité dans l'atteinte pancréatique pose un problème dans le contexte de standardisation et de comparaison des différents groupes de traitement, un obstacle que le développement d'imagerie *in vivo*

permettrait sans doute de surmonter (Westermarck et Grimelius, 1973; Clark et al., 1984; Clark et al., 1988).

Chapitre VIII

8. Conclusion

Les travaux effectués ont permis d'identifier des sites de variation ayant un impact fonctionnel sur l'amyloïdogénicité de l'IAPP. Le potentiel d'amyloïdogénicité des peptides dérivant de nouveaux sites potentiels de mutation pourront être obtenus et analysés dans le cadre de nouvelles études. Également, le projet de recherche a permis de caractériser de nouvelles molécules qui empêchent la formation de dépôts d'amyloïde pancréatique *in vitro*. Ultiment, des expériences effectuées sur des modèles animaux diabétiques permettront de tester le potentiel thérapeutique de nouveaux agents stabilisateurs dans le diabète de type 2. Ces nouveaux composés pourront potentiellement empêcher la progression du diabète dans ces modèles *in vivo*. Également, nos travaux ouvrent nos horizons vers de nouvelles études de relation structure-activité en pharmacomodulant de nouveaux agents inhibiteurs qui découlent des hypoglycémians, des anti-inflammatoires non-stéroïdiens ou des aryles éthyles urées.

Les études futures offriront sans doute un développement dans la compréhension détaillée de la nature des états biologiques fonctionnels et dans la quête vers la prévention ou le traitement du nombre grandissant de personnes atteintes de maladies dégénératives dans lesquelles la formation d'amyloïde est impliquée. L'augmentation des données supportant la nature universelle de la substance amyloïde indique qu'il sera possible de générer une grande diversité de séquences chimiquement synthétisées pour adopter cet état et posséder une variété de propriétés et de fonctions. Cette nature générique permettra peut-être de développer des approches communes ou similaires afin de cibler un nombre croissant d'amyloïdoses. De plus, les modalités d'imagerie moléculaire sensibles et spécifiques à certains types d'amyloïde devront être bientôt mises au point afin de valider ces stratégies de traitement dans les études cliniques. Nous espérons que ce projet ouvrira ainsi la porte à de nouvelles stratégies de traitement du diabète de type 2.

Bibliographie

- Abedini, A., Raleigh, D.P. 2005. The role of His-18 in amyloid formation by human islet amyloid polypeptide. *Biochemistry* 44(49): 16284-16291.
- Adachi, N., Tomonaga, S., Tachibana, T., Denbow, D.M., Furuse, M. 2006. (-)-Epigallocatechin gallate attenuates acute stress responses through GABAergic system in the brain. *Eur J Pharmacol* 531(1-3): 171-175.
- Ahren, B., Oosterwijk, C., Lips, C.J., Hoppener, J.W. 1998. Transgenic overexpression of human islet amyloid polypeptide inhibits insulin secretion and glucose elimination after gastric glucose gavage in mice. *Diabetologia* 41(11): 1374-1380.
- Asuni, A.A., Boutajangout, A., Quartermain, D., Sigurdsson, E.M. 2007. Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J Neurosci* 27(34): 9115-9129.
- Badman, M.K., Shennan, K.I., Jermany, J.L., Docherty, K., Clark, A. 1996. Processing of pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) by the prohormone convertase PC2. *FEBS Lett* 378(3): 227-231.
- Bailey, R.J., Walker, C.S., Ferner, A.H., Loomes, K.M., Prijic, G., Halim, A., Whiting, L., Phillips, A.R., Hay, D.L. 2012. Pharmacological characterization of rat amylin receptors: implications for the identification of amylin receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 166(1): 151-167.
- Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., Kelly, J.W. 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319(5865): 916-919.

- Baldwin, A.J., Knowles, T.P., Tartaglia, G.G., Fitzpatrick, A.W., Devlin, G.L., Shammass, S.L., Waudby, C.A., Mossuto, M.F., Meehan, S., Gras, S.L., Christodoulou, J., Anthony-Cahill, S.J., Barker, P.D., Vendruscolo, M., Dobson, C.M. 2011. Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *J Am Chem Soc* 133(36): 14160-14163.
- Bard, F., Barbour, R., Cannon, C., Carretto, R., Fox, M., Games, D., Guido, T., Hoenow, K., Hu, K., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, C., Lee, M., Motter, R., Nguyen, M., Reed, A., Schenk, D., Tang, P., Vasquez, N., Seubert, P., Yednock, T. 2003. Epitope and isotype specificities of antibodies to beta -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4): 2023-2028.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D., Yednock, T. 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6(8): 916-919.
- Barnhart, M.M., Chapman, M.R. 2006. Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* 60: 131-147.
- Barrow, C.J., Yasuda, A., Kenny, P.T., Zagorski, M.G. 1992. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J Mol Biol* 225(4): 1075-1093.
- Benditt, E.P., Eriksen, N. 1972. Chemical similarity among amyloid substances associated with long standing inflammation. *Lab Invest* 26(6): 615-625.

- Bennhold, H. 1922. Eine spezifische amyloidfärbung mit kongorot. *Munch Med Wochenschr* 69: 1537-1538.
- Betsholtz, C., Christmansson, L., Engstrom, U., Rorsman, F., Svensson, V., Johnson, K.H., Westermark, P. 1989. Sequence divergence in a specific region of islet amyloid polypeptide (IAPP) explains differences in islet amyloid formation between species. *FEBS Lett* 251(1-2): 261-264.
- Bieler, S., Estrada, L., Lagos, R., Baeza, M., Castilla, J., Soto, C. 2005. Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein. *J Biol Chem* 280(29): 26880-26885.
- Bieschke, J., Russ, J., Friedrich, R.P., Ehrnhoefer, D.E., Wobst, H., Neugebauer, K., Wanker, E.E. 2010. EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(17): 7710-7715.
- Bodin, K., Ellmerich, S., Kahan, M.C., Tennent, G.A., Loesch, A., Gilbertson, J.A., Hutchinson, W.L., Mangione, P.P., Gallimore, J.R., Millar, D.J., Minogue, S., Dhillon, A.P., Taylor, G.W., Bradwell, A.R., Petrie, A., Gillmore, J.D., Bellotti, V., Botto, M., Hawkins, P.N., Pepys, M.B. 2010. Antibodies to human serum amyloid P component eliminate visceral amyloid deposits. *Nature* 468(7320): 93-97.
- Bodles, A.M., El-Agnaf, O.M., Greer, B., Guthrie, D.J., Irvine, G.B. 2004. Inhibition of fibril formation and toxicity of a fragment of alpha-synuclein by an N-methylated peptide analogue. *Neurosci Lett* 359(1-2): 89-93.
- Boimel, M., Grigoriadis, N., Lourdopoulos, A., Haber, E., Abramsky, O., Rosenmann, H. 2010. Efficacy and safety of immunization with phosphorylated tau against neurofibrillary tangles in mice. *Exp Neurol* 224(2): 472-485.

- Brender, J.R., Hartman, K., Reid, K.R., Kennedy, R.T., Ramamoorthy, A. 2008. A single mutation in the nonamyloidogenic region of islet amyloid polypeptide greatly reduces toxicity. *Biochemistry* 47(48): 12680-12688.
- Broome, B.M., Hecht, M.H. 2000. Nature disfavors sequences of alternating polar and non-polar amino acids: implications for amyloidogenesis. *J Mol Biol* 296(4): 961-968.
- Bucciantini, M., Calloni, G., Chiti, F., Formigli, L., Nosi, D., Dobson, C.M., Stefani, M. 2004. Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity. *J Biol Chem* 279(30): 31374-31382.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., Stefani, M. 2002. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416(6880): 507-511.
- Buckle, V.J., Marsland, A.M., Mosselman, S., Hoppener, J.W.M. 1989. Localization of the human islet amyloid polypeptide (iapp) gene to 12p11.2-p12.3. *Cytogenet Cell Genet* 51: 972.
- Bulawa, C.E., Connelly, S., Devit, M., Wang, L., Weigel, C., Fleming, J.A., Packman, J., Powers, E.T., Wiseman, R.L., Foss, T.R., Wilson, I.A., Kelly, J.W., Labaudiniere, R. 2012. Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(24): 9629-9634.
- Butler, P.C., Chou, J., Carter, W.B., Wang, Y.N., Bu, B.H., Chang, D., Chang, J.K., Rizza, R.A. 1990. Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans. *Diabetes* 39(6): 752-756.
- Buxbaum, J.N., Linke, R.P. 2012. A molecular history of the amyloidoses. *J Mol Biol* 421(2-3): 142-159.

- Cabaleiro-Lago, C., Lynch, I., Dawson, K.A., Linse, S. 2010. Inhibition of IAPP and IAPP(20-29) fibrillation by polymeric nanoparticles. *Langmuir* 26(5): 3453-3461.
- Cabaleiro-Lago, C., Szczepankiewicz, O., Linse, S. 2012. The effect of nanoparticles on amyloid aggregation depends on the protein stability and intrinsic aggregation rate. *Langmuir* 28(3): 1852-1857.
- Campioni, S., Mannini, B., Zampagni, M., Pensalfini, A., Parrini, C., Evangelisti, E., Relini, A., Stefani, M., Dobson, C.M., Cecchi, C., Chiti, F. 2010. A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nat Chem Biol* 6(2): 140-147.
- Cao, P., Marek, P., Noor, H., Patsalo, V., Tu, L.H., Wang, H., Abedini, A., Raleigh, D.P. 2013. Islet amyloid: from fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity. *FEBS Lett* 587(8): 1106-1118.
- Cao, P., Raleigh, D.P. 2012. Analysis of the inhibition and remodeling of islet amyloid polypeptide amyloid fibers by flavanols. *Biochem* 51(13): 2670-2683.
- Capetillo-Zarate, E., Staufienbiel, M., Abramowski, D., Haass, C., Escher, A., Stadelmann, C., Yamaguchi, H., Wiestler, O.D., Thal, D.R. 2006. Selective vulnerability of different types of commissural neurons for amyloid beta-protein-induced neurodegeneration in APP23 mice correlates with dendritic tree morphology. *Brain* 129(Pt 11): 2992-3005.
- Caruana, M., Hogen, T., Levin, J., Hillmer, A., Giese, A., Vassallo, N. 2011. Inhibition and disaggregation of alpha-synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Lett* 585(8): 1113-1120.
- Castillo, G.M., Cummings, J.A., Yang, W., Judge, M.E., Sheardown, M.J., Rimvall, K., Hansen, J.B., Snow, A.D. 1998. Sulfate content and specific glycosaminoglycan

backbone of perlecan are critical for perlecan's enhancement of islet amyloid polypeptide (amylin) fibril formation. *Diabetes* 47(4): 612-620.

Caughey, B., Lansbury, P.T. 2003. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26: 267-298.

Chabry, J., Caughey, B., Chesebro, B. 1998. Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. *J Biol Chem* 273(21): 13203-13207.

Chapman, M.R., Robinson, L.S., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., Hultgren, S.J. 2002. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295(5556): 851-855.

Charge, S.B., de Koning, E.J., Clark, A. 1995. Effect of pH and insulin on fibrillogenesis of islet amyloid polypeptide in vitro. *Biochemistry* 34(44): 14588-14593.

Charge, S.B., Esiri, M.M., Bethune, C.A., Hansen, B.C., Clark, A. 1996. Apolipoprotein E is associated with islet amyloid and other amyloidoses: implications for Alzheimer's disease. *J Pathol* 179(4): 443-447.

Cheng, B., Gong, H., Li, X., Sun, Y., Chen, H., Zhang, X., Wu, Q., Zheng, L., Huang, K. 2013b. Salvianolic acid B inhibits the amyloid formation of human islet amyloid polypeptide and protects pancreatic beta-cells against cytotoxicity. *Proteins* 81(4): 613-621.

Cheng, B., Gong, H., Li, X., Sun, Y., Zhang, X., Chen, H., Liu, X., Zheng, L., Huang, K. 2012. Silibinin inhibits the toxic aggregation of human islet amyloid polypeptide. *Biochem Biophys Res Commun* 419(3): 495-499.

- Cheng, B., Gong, H., Xiao, H., Petersen, R.B., Zheng, L., Huang, K. 2013a. Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: A therapeutic strategy for protein misfolding diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1830(10): 4860-4871.
- Cheng, B., Liu, X., Gong, H., Huang, L., Chen, H., Zhang, X., Li, C., Yang, M., Ma, B., Jiao, L., Zheng, L., Huang, K. 2011. Coffee components inhibit amyloid formation of human islet amyloid polypeptide in vitro: possible link between coffee consumption and diabetes mellitus. *J Agr Food Chem* 59(24): 13147-13155.
- Cheon, M., Chang, I., Mohanty, S., Luheshi, L.M., Dobson, C.M., Vendruscolo, M., Favrin, G. 2007. Structural reorganisation and potential toxicity of oligomeric species formed during the assembly of amyloid fibrils. *PLoS Comput Biol* 3(9): 1727-1738.
- Chiti, F., Dobson, C.M. 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 75: 333-366.
- Chow, H.H., Hakim, I.A., Vining, D.R., Crowell, J.A., Ranger-Moore, J., Chew, W.M., Celaya, C.A., Rodney, S.R., Hara, Y., Alberts, D.S. 2005. Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res* 11(12): 4627-4633.
- Christopoulos, G., Perry, K.J., Morfis, M., Tilakaratne, N., Gao, Y., Fraser, N.J., Main, M.J., Foord, S.M., Sexton, P.M. 1999. Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Mol Pharmacol* 56(1): 235-242.
- Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F.G., Dijkhuizen, L., Wosten, H.A. 2003. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev* 17(14): 1714-1726.

- Clark, A., Cooper, G.J., Lewis, C.E., Morris, J.F., Willis, A.C., Reid, K.B., Turner, R.C. 1987. Islet amyloid formed from diabetes-associated peptide may be pathogenic in type-2 diabetes. *Lancet* 2(8553): 231-234.
- Clark, A., Holman, R.R., Matthews, D.R., Hockaday, T.D., Turner, R.C. 1984. Non-uniform distribution of islet amyloid in the pancreas of 'maturity-onset' diabetic patients. *Diabetologia* 27(5): 527-528.
- Clark, A., Wells, C.A., Buley, I.D., Cruickshank, J.K., Vanhegan, R.I., Matthews, D.R., Cooper, G.J., Holman, R.R., Turner, R.C. 1988. Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9(4): 151-159.
- Cohen, A.S., Calkins, E. 1959. Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* 183(4669): 1202-1203.
- Cohen, S.I., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., Knowles, T.P. 2012. From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation. *J Mol Biol* 421(2-3): 160-171.
- Collins, S.R., Douglass, A., Vale, R.D., Weissman, J.S. 2004. Mechanism of prion propagation: amyloid growth occurs by monomer addition. *PLoS Biol* 2(10): e321.
- Cook, J.T., Patel, P.P., Clark, A., Hoppener, J.W., Lips, C.J., Mosselman, S., O'Rahilly, S., Page, R.C., Wainscoat, J.S., Turner, R.C. 1991. Non-linkage of the islet amyloid polypeptide gene with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 34(2): 103-108.
- Cornwell, G.G., 3rd, Murdoch, W.L., Kyle, R.A., Westermark, P., Pitkanen, P. 1983. Frequency and distribution of senile cardiovascular amyloid. A clinicopathologic correlation. *Am J Med* 75(4): 618-623.

- Couce, M., Kane, L.A., O'Brien, T.D., Charlesworth, J., Soeller, W., McNeish, J., Kreutter, D., Roche, P., Butler, P.C. 1996. Treatment with growth hormone and dexamethasone in mice transgenic for human islet amyloid polypeptide causes islet amyloidosis and beta-cell dysfunction. *Diabetes* 45(8): 1094-1101.
- Cremades, N., Cohen, S.I., Deas, E., Abramov, A.Y., Chen, A.Y., Orte, A., Sandal, M., Clarke, R.W., Dunne, P., Aprile, F.A., Bertocini, C.W., Wood, N.W., Knowles, T.P., Dobson, C.M., Klenerman, D. 2012. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alpha-synuclein. *Cell* 149(5): 1048-1059.
- D'Alessio, D.A., Verchere, C.B., Kahn, S.E., Hoagland, V., Baskin, D.G., Palmiter, R.D., Ensink, J.W. 1994. Pancreatic expression and secretion of human islet amyloid polypeptide in a transgenic mouse. *Diabetes* 43(12): 1457-1461.
- Daval, M., Bedrood, S., Gurlo, T., Huang, C.J., Costes, S., Butler, P.C., Langen, R. 2010. The effect of curcumin on human islet amyloid polypeptide misfolding and toxicity. *Amyloid* 17(3-4): 118-128.
- De Felice, F.G., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K., Fernandez, S.J., Ferreira, S.T., Klein, W.L. 2007. A beta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282(15): 11590-11601.
- de Koning, E.J., Bodkin, N.L., Hansen, B.C., Clark, A. 1993b. Diabetes mellitus in *Macaca mulatta* monkeys is characterised by islet amyloidosis and reduction in beta-cell population. *Diabetologia* 36(5): 378-384.
- de Koning, E.J., Hoppener, J.W., Oosterwijk, C., Verbeek, S.J., Visser, H.J., Jansz, H.S., Lips, C.J., Morris, J.F., Clark, A. 1993a. Localisation of islet amyloid polypeptide (IAPP) in

- pancreatic islets of transgenic mice expressing the human or rat IAPP gene. *Biochem Soc Trans* 21(1): 26S.
- de Koning, E.J., Morris, E.R., Hofhuis, F.M., Posthuma, G., Hopener, J.W., Morris, J.F., Capel, P.J., Clark, A., Verbeek, J.S. 1994. Intra- and extracellular amyloid fibrils are formed in cultured pancreatic islets of transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *91(18): 8467-8471.*
- de Lartigue, J. 2012. Tafamidis for transthyretin amyloidosis. *Drugs Today (Barc)* 48(5): 331-337.
- Dillin, A., Cohen, E. 2011. Ageing and protein aggregation-mediated disorders: from invertebrates to mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1561): 94-98.
- Divry, P., Florkin, M. 1927. Sur les propriétés optiques de l'amyloïde. *C R Soc Biol* 97: 1808-1810.
- Dobson, C.M. 1999. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci* 24(9): 329-332.
- Dobson, C.M. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature* 426(6968): 884-890.
- Dobson, C.M. 2004. Chemical space and biology. *Nature* 432(7019): 824-828.
- Dueholm, M.S., Petersen, S.V., Sonderkaer, M., Larsen, P., Christiansen, G., Hein, K.L., Enghild, J.J., Nielsen, J.L., Nielsen, K.L., Nielsen, P.H., Otzen, D.E. 2010. Functional amyloid in *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* 77(4): 1009-1020.
- Dupuis, N.F., Wu, C., Shea, J.E., Bowers, M.T. 2009. Human islet amyloid polypeptide monomers form ordered beta-hairpins: a possible direct amyloidogenic precursor. *J Am Chem Soc* 131(51): 18283-18292.

- Dupuis, N.F., Wu, C., Shea, J.E., Bowers, M.T. 2011. The amyloid formation mechanism in human IAPP: dimers have beta-strand monomer-monomer interfaces. *J Am Chem Soc* 133(19): 7240-7243.
- Eanes, E.D., Glenner, G.G. 1968. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem* 16(11): 673-677.
- Ehrnhoefer, D.E., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., Engemann, S., Pastore, A., Wanker, E.E. 2008. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 15(6): 558-566.
- Ehrnhoefer, D.E., Duennwald, M., Markovic, P., Wacker, J.L., Engemann, S., Roark, M., Legleiter, J., Marsh, J.L., Thompson, L.M., Lindquist, S., Muchowski, P.J., Wanker, E.E. 2006. Green tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models. *Hum Mol Genet* 15(18): 2743-2751.
- Ehse, J.A., Lacraz, G., Giroix, M.H., Schmidlin, F., Coulaud, J., Kassis, N., Irminger, J.C., Kergoat, M., Portha, B., Homo-Delarche, F., Donath, M.Y. 2009. IL-1 antagonism reduces hyperglycemia and tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(33): 13998-14003.
- Eichner, T., Radford, S.E. 2011. A diversity of assembly mechanisms of a generic amyloid fold. *Mol Cell* 43(1): 8-18.
- El-Agnaf, O.M., 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., Martin, F.L., Harriott, P., Cookson, M.R., Allsop, D. 2004. A strategy for designing inhibitors of alpha-synuclein aggregation and toxicity as a novel treatment for Parkinson's disease and related disorders. *FASEB J* 18(11): 1315-1317.

- Emadi, S., Barkhordarian, H., Wang, M.S., Schulz, P., Sierks, M.R. 2007. Isolation of a human single chain antibody fragment against oligomeric alpha-synuclein that inhibits aggregation and prevents alpha-synuclein-induced toxicity. *J Mol Biol* 368(4): 1132-1144.
- Englund, H., Sehlin, D., Johansson, A.S., Nilsson, L.N., Gellerfors, P., Paulie, S., Lannfelt, L., Pettersson, F.E. 2007. Sensitive ELISA detection of amyloid-beta protofibrils in biological samples. *J Neurochem* 103(1): 334-345.
- Enoki, S., Mitsukawa, T., Takemura, J., Nakazato, M., Aburaya, J., Toshimori, H., Matsukara, S. 1992. Plasma islet amyloid polypeptide levels in obesity, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 15(1): 97-102.
- Epstein, E.A., Chapman, M.R. 2008. Polymerizing the fibre between bacteria and host cells: the biogenesis of functional amyloid fibres. *Cell Microbiol* 10(7): 1413-1420.
- Fandrich, M., Dobson, C.M. 2002. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J* 21(21): 5682-5690.
- Fan, L., Westermark, G., Chan, S.J., Steiner, D.F. 1994. Altered gene structure and tissue expression of islet amyloid polypeptide in the chicken. *Mol Endocrinol* 8(6): 713-721.
- Feng, Y., Wang, X.P., Yang, S.G., Wang, Y.J., Zhang, X., Du, X.T., Sun, X.X., Zhao, M., Huang, L., Liu, R.T. 2009. Resveratrol inhibits beta-amyloid oligomeric cytotoxicity but does not prevent oligomer formation. *Neurotoxicology* 30(6): 986-995.
- Feraudet, C., Morel, N., Simon, S., Volland, H., Frobert, Y., Creminon, C., Vilette, D., Lehmann, S., Grassi, J. 2005. Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrPSc replication in infected cells. *J Biol Chem* 280(12): 11247-11258.

- Ferreira, N., Saraiva, M.J., Almeida, M.R. 2011. Natural polyphenols inhibit different steps of the process of transthyretin (TTR) amyloid fibril formation. *FEBS Lett* 585(15): 2424-2430.
- Ferreira, N., Saraiva, M.J., Almeida, M.R. 2012a. Epigallocatechin-3-gallate as a potential therapeutic drug for TTR-related amyloidosis: "in vivo" evidence from FAP mice models. *PLoS One* 7(1): e29933.
- Ferreira, N., Saraiva, M.J., Almeida, M.R. 2012b. Natural polyphenols as modulators of TTR amyloidogenesis: in vitro and in vivo evidences towards therapy. *Amyloid* 19 Suppl 1: 39-42.
- Ferrone, F. 1999. Analysis of protein aggregation kinetics. *Methods Enzymol* 309: 256-274.
- Fortin, J.S., Cote, M.F., Lacroix, J., Petitclerc, E., Gaudreault, C.R. 2008. Aromatic 2-chloroethyl urea derivatives and bioisosteres. Part 2: Cytocidal activity and effects on the nuclear translocation of thioredoxin-1, and the cell cycle progression. *Bioorg Med Chem* 16(15): 7477-7488.
- Fortin, J.S., Lacroix, J., Desjardins, M., Patenaude, A., Petitclerc, E., Gaudreault, C.R. 2007. Alkylation potency and protein specificity of aromatic urea derivatives and bioisosteres as potential irreversible antagonists of the colchicine-binding site. *Bioorg Med Chem* 15(13): 4456-4469.
- Fowler, D.M., Koulov, A.V., Balch, W.E., Kelly, J.W. 2007. Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 32(5): 217-224.
- Fox, N., Schrementi, J., Nishi, M., Ohagi, S., Chan, S.J., Heisserman, J.A., Westermark, G.T., Leckstrom, A., Westermark, P., Steiner, D.F. 1993. Human islet amyloid polypeptide

- transgenic mice as a model of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *FEBS Lett* 323(1-2): 40-44.
- Friedrich, N., Kekule, A. 1859. Zur amyloidfrage. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 16: 50-65.
- Frokjaer, S., Otzen, D.E. 2005. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov* 4(4): 298-306.
- Gasa, R., Gomis, R., Casamitjana, R., Novials, A. 1997. Signals related to glucose metabolism regulate islet amyloid polypeptide (IAPP) gene expression in human pancreatic islets. *Regul Pept* 68(2): 99-104.
- Gauci, A.J., Caruana, M., Giese, A., Scerri, C., Vassallo, N. 2011. Identification of polyphenolic compounds and black tea extract as potent inhibitors of lipid membrane destabilization by Abeta(4)(2) aggregates. *J Alzheimers Dis* 27(4): 767-779.
- Gazit, E. 2002a. Mechanistic studies of the process of amyloid fibrils formation by the use of peptide fragments and analogues: implications for the design of fibrillization inhibitors. *Curr Med Chem* 9(19): 1725-1735.
- Gazit, E. 2002b. A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB J* 16(1): 77-83.
- Gebre-Medhin, S., Mulder, H., Pekny, M., Westermark, G., Tornell, J., Westermark, P., Sundler, F., Ahren, B., Betsholtz, C. 1998. Increased insulin secretion and glucose tolerance in mice lacking islet amyloid polypeptide (amylin). *Biochem Biophys Res Commun* 250(2): 271-277.
- Geddes, A.J., Parker, K.D., Atkins, E.D., Beighton, E. 1968. "Cross-beta" conformation in proteins. *J Mol Biol* 32(2): 343-358.

- Gejyo, F., Yamada, T., Odani, S., Nakagawa, Y., Arakawa, M., Kunitomo, T., Kataoka, H., Suzuki, M., Hirasawa, Y., Shirahama, T., et al. 1985. A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as beta 2-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 129(3): 701-706.
- German, M.S., Moss, L.G., Wang, J., Rutter, W.J. 1992. The insulin and islet amyloid polypeptide genes contain similar cell-specific promoter elements that bind identical beta-cell nuclear complexes. *Mol Cell Biol* 12(4): 1777-1788.
- Gertz, M.A. 2004. The classification and typing of amyloid deposits. *Am J Clin Pathol* 121(6): 787-789.
- Geylis, V., Kourilov, V., Meiner, Z., Nennesmo, I., Bogdanovic, N., Steinitz, M. 2005. Human monoclonal antibodies against amyloid-beta from healthy adults. *Neurobiol Aging* 26(5): 597-606.
- Giacomeli, C.E., Norde, W. 2003. Influence of hydrophobic Teflon particles on the structure of amyloid beta-peptide. *Biomacromolecules* 4(6): 1719-1726.
- Giacomeli, C.E., Norde, W. 2005. Conformational changes of the amyloid beta-peptide (1-40) adsorbed on solid surfaces. *Macromol Biosci* 5(5): 401-407.
- Gibson, T.J., Murphy, R.M. 2006. Inhibition of insulin fibrillogenesis with targeted peptides. *Protein Sci* 15(5): 1133-1141.
- Giehm, L., Lorenzen, N., Otzen, D.E. 2011. Assays for alpha-synuclein aggregation. *Methods* 53(3): 295-305.

- Gilead, S., Wolfenson, H., Gazit, E. 2006. Molecular mapping of the recognition interface between the islet amyloid polypeptide and insulin. *Angew Chem Int Ed Engl* 45(39): 6476-6480.
- Gillmore, J.D., Tennent, G.A., Hutchinson, W.L., Gallimore, J.R., Lachmann, H.J., Goodman, H.J., Offer, M., Millar, D.J., Petrie, A., Hawkins, P.N., Pepys, M.B. 2010. Sustained pharmacological depletion of serum amyloid P component in patients with systemic amyloidosis. *Br J Haematol* 148(5): 760-767.
- Giurleo, J.T., He, X., Talaga, D.S. 2008. Beta-lactoglobulin assembles into amyloid through sequential aggregated intermediates. *J Mol Biol* 381(5): 1332-1348.
- Glenner, G.G. 1980a. Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses I. *N Engl J Med* 302(23): 1283-1292.
- Glenner, G.G. 1980b. Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses II. *N Engl J Med* 302(24): 1333-1343.
- Glenner, G.G., Cuatrecasas, P., Isersky, C., Bladen, H.A., Eanes, E.D. 1969. Physical and chemical properties of amyloid fibers: II. Isolation of a unique protein constituting the major component from human splenic amyloid fibril concentrates. *J Histochem Cytochem* 17(12): 769-780.
- Goldsbury, C., Frey, P., Olivieri, V., Aebi, U., Muller, S.A. 2005. Multiple assembly pathways underlie amyloid-beta fibril polymorphisms. *J Mol Biol* 352(2): 282-298.
- Goldschmidt, L., Teng, P.K., Riek, R., Eisenberg, D. 2010. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(8): 3487-3492.

- Gophna, U., Barlev, M., Seiffers, R., Oeschlager, T.A., Hacker, J., Ron, E.Z. 2001. Curli fibers mediate internalization of Escherichia coli by eukaryotic cells. *Infect Immun* 69(4): 2659-2665.
- Gordon, D.J., Tappe, R., Meredith, S.C. 2002. Design and characterization of a membrane permeable N-methyl amino acid-containing peptide that inhibits Abeta1-40 fibrillogenesis. *J Pept Res* 60(1): 37-55.
- Gorevic, P.D. 2013. Amyloid and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(41): 16291-16292.
- Guo, J., Li, J., Zhang, Y., Jin, X., Liu, H., Yao, X. 2013. Exploring the influence of carbon nanoparticles on the formation of beta-sheet-rich oligomers of IAPP(2)(2)(-)(2)(8) peptide by molecular dynamics simulation. *PloS One* 8(6): e65579.
- Haass, C., Selkoe, D.J. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2): 101-112.
- Hamaguchi, T., Ono, K., Murase, A., Yamada, M. 2009. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *Am J Pathol* 175(6): 2557-2565.
- Hammer, N.D., Wang, X., McGuffie, B.A., Chapman, M.R. 2008. Amyloids: friend or foe? *J Alzheimers Dis* 13(4): 407-419.
- Hard, T., Lendel C. 2012. Inhibition of amyloid formation. *J Mol Biol* 421(4-5): 441-465.
- Harris, C. 2012. Animal models in epigenetic research: institutional animal care and use committee considerations across the lifespan. *ILAR J* 53(3-4): 370-376.

- Hartl, F.U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475(7356): 324-332.
- Hauber, I., Hohenberg, H., Holstermann, B., Hunstein, W., Hauber, J. 2009. The main green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate counteracts semen-mediated enhancement of HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(22): 9033-9038.
- Hawkes, C.A., Deng, L.H., Shaw, J.E., Nitz, M., McLaurin, J. 2010. Small molecule beta-amyloid inhibitors that stabilize protofibrillar structures in vitro improve cognition and pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 31(2): 203-213.
- Hazenberg, B.P., Van Rijswijk, M.H. 1994. Clinical and therapeutic aspects of AA amyloidosis. *Bailleres Clin Rheumatol* 8(3): 661-690.
- Hebda, J.A., Miranker, A.D. 2009. The interplay of catalysis and toxicity by amyloid intermediates on lipid bilayers: insights from type II diabetes. *Annu Rev Biophys* 38: 125-152.
- Heppner, F.L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M.A., Rulicke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R.M., Kalinke, U., Aguzzi, A. 2001. Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* 294(5540): 178-182.
- Herlenius, G., Wilczek, H.E., Larsson, M., Ericzon, B.G. Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry. 2004. Ten years of international experience with liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: results from the Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry. *Transplantation* 77(1): 64-71.
- Higham, C.E., Hull, R.L., Lawrie, L., Shennan, K.I., Morris, J.F., Birch, N.P., Docherty, K., Clark, A. 2000a. Processing of synthetic pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP)

- 'amylin' by recombinant prohormone convertase enzymes, PC2 and PC3, in vitro. *Eur J Biochem* 267(16): 4998-5004.
- Higham, C.E., Jaikaran, E.T., Fraser, P.E., Gross, M., Clark, A. 2000b. Preparation of synthetic human islet amyloid polypeptide (IAPP) in a stable conformation to enable study of conversion to amyloid-like fibrils. *FEBS Lett* 470(1): 55-60.
- Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C.L., Beyreuther, K. 1992. Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides. *J Mol Biol* 228(2): 460-473.
- Hoenig, M., Hall, G., Ferguson, D., Jordan, K., Henson, M., Johnson, K., O'Brien, T. 2000. A feline model of experimentally induced islet amyloidosis. *Am J Pathol* 157(6): 2143-2150.
- Hong, D.P., Han, S., Fink, A.L., Uversky, V.N. 2011. Characterization of the non-fibrillar alpha-synuclein oligomers. *Protein Pept Lett* 18(3): 230-240.
- Hoppener, J.W., Ahren, B., Lips, C.J. 2000. Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 343(6): 411-419.
- Hoppener, J.W., Nieuwenhuis, M.G., Vroom, T.M., Ahren, B., Lips, C.J. 2002. Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus: consequence or cause? *Mol Cell Endocrinol* 197(1-2): 205-212.
- Hoppener, J.W., Oosterwijk, C., Nieuwenhuis, M.G., Posthuma, G., Thijssen, J.H., Vroom, T.M., Ahren, B., Lips, C.J. 1999. Extensive islet amyloid formation is induced by development of Type II diabetes mellitus and contributes to its progression: pathogenesis of diabetes in a mouse model. *Diabetologia* 42(4): 427-434.

- Hoppener, J.W.M., Verbeek, J.S., de Koning, E.J.P., Oosterwijk, C., van Hulst, K.L., Visser-Vernooy, H.J., Hofhuis, E.M.A., van Gaalen, S., Berends, M.J.H., Hackeng, W.H.L., Jansz, H.S., Morris, J.F., Clark, A., Capel, P.J.A., Lips, C.J.M. 1993. Chronic overproduction of islet amyloid polypeptide/amylin in transgenic mice: lysosomal localization of human islet amyloid polypeptide and lack of marked hyperglycaemia or hyperinsulinaemia. *Diabetologia* 36(12): 1258-1265.
- Hou, X., Parkington, H.C., Coleman, H.A., Mechler, A., Martin, L.L., Aguilar, M.I., Small, D.H. 2007. Transthyretin oligomers induce calcium influx via voltage-gated calcium channels. *J Neurochem* 100(2): 446-457.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., Malinow, R. 2006. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52(5): 831-843.
- Huang, T.H., Yang, D.S., Plaskos, N.P., Go, S., Yip, C.M., Fraser, P.E., Chakrabarty, A. 2000. Structural studies of soluble oligomers of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *J Mol Biol* 297(1): 73-87.
- Hubbard, J.A.M., Martin, S.R., Chaplin, L.C., Bose, C., Kelly, S.M., Price, N.C. 1991. Solution structures of calcitonin-gene-related-peptide analogs of calcitonin-gene-related peptide and amylin. *Biochem J* 275(Pt3): 785-788.
- Hudson, S.A., Ecroyd, H., Dehle, F.C., Musgrave, I.F., Carver, J.A. 2009. (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) maintains kappa-casein in its pre-fibrillar state without redirecting its aggregation pathway. *J Mol Biol* 392(3): 689-700.
- Hull, R.L., Verchere, C.B., Andrikopoulos, S., Wang, F., Vidal, J., Kahn, S.E. 2001. Oophorectomy promotes islet amyloid formation in human islet amyloid polypeptide transgenic mice. *Diabetes* 50 Suppl 1: S184-185.

- Hull, R.L., Westermark, G.T., Westermark, P., Kahn, S.E. 2004. Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89(8): 3629-3643.
- Hutton, J.C. 1982. The internal pH and membrane potential of the insulin-secretory granule. *Biochem J* 204(1): 171-178.
- Hutton, J.C. 1994. Insulin secretory granule biogenesis and the proinsulin-processing endopeptidases. *Diabetologia* 37 Suppl 2: S48-56.
- Iannuzzi, C., Irace, G., Sirangelo, I. 2015. The effect of glycosaminoglycans (GAGs) on amyloid aggregation and toxicity. *Molecules* 20(2): 2510-2528.
- Jahn, T.R., Radford, S.E. 2005. The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J* 272(23): 5962-5970.
- Jahn, T.R., Radford, S.E. 2008. Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways. *Arch Biochem Biophys* 469(1): 100-117.
- Jaikaran, E.T., Clark, A. 2001. Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 1537(3): 179-203.
- Jaikaran, E.T., Nilsson, M.R., Clark, A. 2004. Pancreatic beta-cell granule peptides form heteromolecular complexes which inhibit islet amyloid polypeptide fibril formation. *Biochem J* 377(Pt 3): 709-716.
- Janciauskiene, S., Ahren, B. 1998. Different sensitivity to the cytotoxic action of IAPP fibrils in two insulin-producing cell lines, HIT-T15 and RINm5F cells. *Biochem Biophys Res Commun* 251(3): 888-893.

- Janciauskiene, S., Eriksson, S., Carlemalm, E., Ahren, B. 1997. B cell granule peptides affect human islet amyloid polypeptide (IAPP) fibril formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 236(3): 580-585.
- Janson, J., Butler, P., Soeller, W. 1998. High islet amyloid polypeptide secretion results in transient hyperglycemia without beta-cell death. *Diabetes* 47(A30): 116.
- Janson, J., Soeller, W.C., Roche, P.C., Nelson, R.T., Torchia, A.J., Kreutter, D.K., Butler, P.C. 1996. Spontaneous diabetes mellitus in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(14): 7283-7288.
- Jayasinghe, S.A., Langen, R. 2004. Identifying structural features of fibrillary islet amyloid polypeptide using site-directed spin labeling. *J Biol Chem* 279(46): 48420-5.
- Jiang, P., Li, W., Shea, J.E., Mu, Y. 2011. Resveratrol inhibits the formation of multiple-layered beta-sheet oligomers of the human islet amyloid polypeptide segment 22-27. *Biophys J* 100(6): 1550-8.
- Jiao, L., Zhang, X., Huang, L., Gong, H., Cheng, B., Sun, Y., Li, Y., Liu, Q., Zheng, L., Huang, K. 2013. Proanthocyanidins are the major anti-diabetic components of cinnamon water extract. *Food Chem Toxicol* 56: 398-405.
- Jimenez, J.L., Nettleton, E.J., Bouchard, M., Robinson, C.V., Dobson, C.M., Saibil, H.R. 2002. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(14): 9196-9201.
- Jin, M., Shepardson, N., Yang, T., Chen, G., Walsh, D., Selkoe, D.J. 2011. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(14): 5819-5824.

- Johnson, K.H., Wernstedt, C., O'Brien, T.D., Westermark, P. 1991. Amyloid in the pancreatic islets of the cougar (*Felis concolor*) is derived from islet amyloid polypeptide (IAPP). *Comp Biochem Physiol B* 98(1): 115-9.
- Jordal, P.B., Dueholm, M.S., Larsen, P., Petersen, S.V., Enghild, J.J., Christiansen, G., Hojrup, P., Nielsen, P.H., Otzen, D.E. 2009. Widespread abundance of functional bacterial amyloid in mycolata and other gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 75(12): 4101-4110.
- Jordan, K., Murtaugh, M.P., O'Brien, T.D., Westermark, P., Betsholtz, C., Johnson, K.H. 1990. Canine IAPP cDNA sequence provides important clues regarding diabetogenesis and amyloidogenesis in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 169(2): 502-508.
- Jordan, K.C., O'Brien, T.D., Johnson, K.H. 1994. Sequence of raccoon IAPP supports importance of a specific structural motif in the development of pancreatic-islet amyloidosis. *Amyloid* 1(3): 160-164.
- Kahn, S.E., Andrikopoulos, S., Verchere, C.B. 1999. Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes* 48(2): 241-253.
- Kahn, S.E., Halban, P.A. 1997. Release of incompletely processed proinsulin is the cause of the disproportionate proinsulinemia of NIDDM. *Diabetes* 46(11): 1725-1732.
- Kahn, S.E., Verchere, C.B., Andrikopoulos, S., Asberry, P.J., Leonetti, D.L., Wahl, P.W., Boyko, E.J., Schwartz, R.S., Newell-Morris, L., Fujimoto, W.Y. 1998. Reduced amylin release is a characteristic of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in Japanese Americans. *Diabetes* 47(4): 640-645.
- Kajava, A.V., Aebi, U., Steven, A.C. 2005. The parallel superpleated β -structure as a model for amyloid fibrils of human amylin. *J Mol Biol* 348(2): 247-252.

- Kamata, K., Mizukami, H., Inaba, W., Tsuboi, K., Tateishi, Y., Yoshida, T., Yagihashi, S. 2014. Islet amyloid with macrophage migration correlates with augmented β -cell deficits in type 2 diabetic patients. *Amyloid* 21(3): 191-201.
- Kapurniotu, A., Schmauder, A., Tenidis, K. 2002. Structure-based design and study of non-amyloidogenic, double N-methylated IAPP amyloid core sequences as inhibitors of IAPP amyloid formation and cytotoxicity. *J Mol Biol* 315(3): 339-350.
- Kawahara, M. 2004. Disruption of calcium homeostasis in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other conformational diseases. *Curr Alzheimer Res* 1(2): 87-95.
- Kayed, R., Bernhagen, J., Greenfield, N., Sweimeh, K., Brunner, H., Voelter, W., Kapurniotu, A. 1999. Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro. *J Mol Biol* 287(4): 781-796.
- Kayed, R., Head, E., Sarsoza, F., Saing, T., Cotman, C.W., Neuclea, M., Margol, L., Wu, J., Breydo, L., Thompson, J.L., Rasool, S., Gurlo, T., Butler, P., Glabe, C.G. 2007. Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol Neurodegener* 2: 18.
- Khemtemourian, L., Killian, J.A., Hoppener, J.W., Engel, M.F. 2008. Recent insights in islet amyloid polypeptide-induced membrane disruption and its role in beta-cell death in type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res* 2008: 421287.
- Khoshnan, A., Ko, J., Patterson, P.H. 2002. Effects of intracellular expression of anti-huntingtin antibodies of various specificities on mutant huntingtin aggregation and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2): 1002-1007.

- Kim, D.Y., Taylor, H.W., Eades, S.C., Cho, D.Y. 2005. Systemic AL amyloidosis associated with multiple myeloma in a horse. *Vet Pathol* 42(1): 81-84.
- Kisilevsky, R., Fraser, P. 1996. Proteoglycans and amyloid fibrillogenesis. *Ciba Found Symp*, Vol. 199, Ciba, London, pp.58-67, 68-72, 90-103.
- Klunk, W.E., Pettegrew, J.W., Abraham, D.J. 1989. Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J Histochem Cytochem* 37(8): 1273-1281.
- Knight, J.D., Hebda, J.A., and Miranker, A.D. 2006. Conserved and cooperative assembly of membrane-bound alpha-helical states of islet amyloid polypeptide. *Biochemistry* 45(31): 9496-9508.
- Knowles, T.P., Buehler, M.J. 2011. Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials. *Nat Nanotechnol* 6(8): 469-479.
- Knowles, T.P., Fitzpatrick, A.W., Meehan, S., Mott, H.R., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., Welland, M.E. 2007. Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils. *Science* 318(5858): 1900-1903.
- Knowles, T.P., Waudby, C.A., Devlin, G.L., Cohen, S.I., Aguzzi, A., Vendruscolo, M., Terentjev, E.M., Welland, M.E., Dobson, C.M. 2009. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science* 326(5959): 1533-1537.
- Knowles, T.P., White, D.A., Abate, A.R., Agresti, J.J., Cohen, S.I., Sperling, R.A., De Genst, E.J., Dobson, C.M., Weitz, D.A. 2011. Observation of spatial propagation of amyloid assembly from single nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(36): 14746-14751.
- Kodali, R., Wetzel, R. 2007. Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Curr Opin Struct Biol* 17(1): 48-57.

- Kokkoni, N., Stott, K., Amijee, H., Mason, J.M., Doig, A.J. 2006. N-Methylated peptide inhibitors of beta-amyloid aggregation and toxicity. Optimization of the inhibitor structure. *Biochemistry* 45(32): 9906-9918.
- Kourie, J.I., Shorthouse, A.A. 2000. Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(6): C1063-1087.
- Krampert, M., Bernhagen, J., Schmucker, J., Horn, A., Schmauder, A., Brunner, H., Voelter, W., Kapurniotu, A. 2000. Amyloidogenicity of recombinant human pro-islet amyloid polypeptide (ProIAPP). *Chem Biol* 7(11): 855-871.
- Kuhlman, B., Dantas, G., Ireton, G.C., Varani, G., Stoddard, B.L., Baker, D. 2003. Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. *Science* 302(5649): 1364-1368.
- Kwan, A.H., Winefield, R.D., Sunde, M., Matthews, J.M., Haverkamp, R.G., Templeton, M.D., Mackay, J.P. 2006. Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10): 3621-3626.
- Ladiwala, A.R., Lin, J.C., Bale, S.S., Marcelino-Cruz, A.M., Bhattacharya, M., Dordick, J.S., Tessier, P.M. 2010. Resveratrol selectively remodels soluble oligomers and fibrils of amyloid A β into off-pathway conformers. *J Biol Chem* 285(31): 24228-24237.
- Larsen, P., Nielsen, J.L., Dueholm, M.S., Wetzel, R., Otzen, D., Nielsen, P.H. 2007. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environ Microbiol* 9(12): 3077-3090.
- Larsen, P., Nielsen, J.L., Otzen, D., Nielsen, P.H. 2008. Amyloid-like adhesins produced by floc-forming and filamentous bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 74(5): 1517-1526.

- Larson, J.L., Miranker, A.D. 2004. The mechanism of insulin action on islet amyloid polypeptide fiber formation. *J Mol Biol* 335(1): 221-231.
- Leaver-Fay, A., Tyka, M., Lewis, S.M., Lange, O.F., Thompson, J., Jacak, R., Kaufman, K., Renfrew, P.D., Smith, C.A., Sheffler, W., Davis, I.W., Cooper, S., Treuille, A., Mandell, D.J., Richter, F., Ban, Y.E., Fleishman, S.J., Corn, J.E., Kim, D.E., Lyskov, S., Berrondo, M., Mentzer, S., Popovic, Z., Havranek, J.J., Karanicolas, J., Das, R., Meiler, J., Kortemme, T., Gray, J.J., Kuhlman, B., Baker, D., Bradley, P. 2011. ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Methods Enzymol* 487: 545-574.
- Lecerf, J.M., Shirley, T.L., Zhu, Q., Kazantsev, A., Amersdorfer, P., Housman, D.E., Messer, A., Huston, J.S. 2001. Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ huntingtin aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8): 4764-4769.
- LeVine, H., 3rd. 1999. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol* 309: 274-284.
- Levy-Sakin, M., Shreberk, M., Daniel, Y., Gazit, E. 2009. Targeting insulin amyloid assembly by small aromatic molecules: toward rational design of aggregation inhibitors. *Islets* 1(3): 210-215.
- Lindhagen-Persson, M., Brannstrom, K., Vestling, M., Steinitz, M., Olofsson, A. 2010. Amyloid-beta oligomer specificity mediated by the IgM isotype--implications for a specific protective mechanism exerted by endogenous auto-antibodies. *PLoS One* 5(11): e13928.
- Liu, F.F., Dong, X.Y., He, L., Middelberg, A.P., Sun, Y. 2011. Molecular insight into conformational transition of amyloid beta-peptide 42 inhibited by (-)-epigallocatechin-3-gallate probed by molecular simulations. *J Phys Chem B* 115(41): 11879-11887.

- Livneh, A., Zemer, D., Langevitz, P., Shemer, J., Sohar, E., Pras, M. 1993. Colchicine in the treatment of AA and AL amyloidosis. *Semin Arthritis Rheum* 23(3): 206-214.
- Lorenzo, A., Razzaboni, B., Weir, G.C., Yankner, B.A. 1994. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* 368(6473): 756-760.
- Lu, J.H., Ardah, M.T., Durairajan, S.S., Liu, L.F., Xie, L.X., Fong, W.F., Hasan, M.Y., Huang, J.D., El-Agnaf, O.M., Li, M. 2011. Baicalein inhibits formation of alpha-synuclein oligomers within living cells and prevents Abeta peptide fibrillation and oligomerisation. *Chembiochem* 12(4): 615-624.
- Luca, S., Yau, W.M., Leapman, R., Tycko, R. 2007. Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: constraints from solid state NMR. *Biochemistry* 46(47): 13505-13522.
- Ludvik, B., Lell, B., Hartter, E., Schnack, C., Prager, R. 1991. Decrease of stimulated amylin release precedes impairment of insulin secretion in type II diabetes. *Diabetes* 40(12): 1615-1619.
- Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., Rogers, J. 1999. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155(3): 853-862.
- Luheshi, L.M., Crowther, D.C., Dobson, C.M. 2008. Protein misfolding and disease: from the test tube to the organism. *Curr Opin Chem Biol* 12(1): 25-31.
- Lutz, T.A. 2012. Control of energy homeostasis by amylin. *Cell Mol Life Sci* 69(12): 1947-1965.

- Lynch, S.M., Zhou, C., Messer, A. 2008. An scFv intrabody against the nonamyloid component of alpha-synuclein reduces intracellular aggregation and toxicity. *J Mol Biol* 377(1): 136-147.
- MacArthur, D.L., de Koning, E.J., Verbeek, J.S., Morris, J.F., Clark, A. 1999. Amyloid fibril formation is progressive and correlates with beta-cell secretion in transgenic mouse isolated islets. *Diabetologia* 42(10): 1219-1227.
- MacNamara, C.M., Barrow, B.A., Manley, S.E., Levy, J.C., Clark, A., Turner, R.C. 2000. Parallel changes of proinsulin and islet amyloid polypeptide in glucose intolerance. *Diabetes Res Clin Pract* 50(2): 117-126.
- Madine, J., Doig, A.J., Middleton, D.A. 2008. Design of an N-methylated peptide inhibitor of alpha-synuclein aggregation guided by solid-state NMR. *J Am Chem Soc* 130(25): 7873-7881.
- Mahmoudi, M., Lynch, I., Ejtehadi, M.R., Monopoli, M.P., Bombelli, F.B., Laurent, S. 2011. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem Rev* 111(9): 5610-5637.
- Maji, S.K., Perrin, M.H., Sawaya, M.R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R.A., Singru, P.S., Nilsson, K.P., Simon, R., Schubert, D., Eisenberg, D., Rivier, J., Sawchenko, P., Vale, W., Riek, R. 2009. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science* 325(5938): 328-332.
- Marzban, L., Trigo-Gonzalez, G., Verchere, C.B. 2005. Processing of pro-islet amyloid polypeptide in the constitutive and regulated secretory pathways of beta cells. *Mol Endocrinol* 19(8): 2154-2163.
- Marzban, L., Verchere, B. 2004. The role of islet amyloid polypeptide in type 2 diabetes. *Can J Diabetes* 28(4): 39-47.

- Masters, S.L., Dunne, A., Subramanian, S.L., Hull, R.L., Tannahill, G.M., Sharp, F.A., Becker, C., Franchi, L., Yoshihara, E., Chen, Z., Mullooly, N., Mielke, L.A., Harris, J., Coll, R.C., Mills, K.H., Mok, K.H., Newsholme, P., Nuñez, G., Yodoi, J., Kahn, S.E., Lavelle, E.C., O'Neill, L.A. 2010. Activation of the Nlrp3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nat Immunol* 11(10): 897-904.
- Masuda, Y., Fukuchi, M., Yatagawa, T., Tada, M., Takeda, K., Irie, K., Akagi, K., Monobe, Y., Imazawa, T., Takegoshi, K. 2011. Solid-state NMR analysis of interaction sites of curcumin and 42-residue amyloid beta-protein fibrils. *Bioorg Med Chem* 19(20): 5967-5974.
- Mattson, M.P. 1999. Impairment of membrane transport and signal transduction systems by amyloidogenic proteins. *Methods Enzymol* 309: 733-746.
- Matveyenko, A.V., Butler, P.C. 2006. Islet amyloid polypeptide (IAPP) transgenic rodents as models for type 2 diabetes. *ILAR J* 47(3): 225-233.
- McKoy, A.F., Chen, J., Schupbach, T., Hecht, M.H. 2012. A novel inhibitor of amyloid beta (A β) peptide aggregation: from high throughput screening to efficacy in an animal model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287(46): 38992-39000.
- McLatchie, L.M., Fraser, N.J., Main, M.J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M.G., Foord, S.M. 1998. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393(6683): 333-339.
- McLaurin, J., Golomb, R., Jurewicz, A., Antel, J.P., Fraser, P.E. 2000. Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid beta peptide and inhibit abeta - induced toxicity. *J Biol Chem* 275(24): 18495-18502.

- McLean, L.R., Balasubramaniam, A. 1992. Promotion of beta-structure by interaction of diabetes associated polypeptide (amylin) with phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1122(3): 317-320.
- Meng, F., Abedini, A., Plesner, A., Verchere, C.B., Raleigh, D.P. 2010. The flavanol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide, disaggregates amyloid fibrils, and protects cultured cells against IAPP-induced toxicity. *Biochemistry* 49(37): 8127-8133.
- Meng, F., Marek, P., Potter, K.J., Verchere, C.B., Raleigh, D.P. 2008. Rifampicin does not prevent amyloid fibril formation by human islet amyloid polypeptide but does inhibit fibril thioflavin-T interactions: implications for mechanistic studies of beta-cell death. *Biochemistry* 47(22): 6016-6024.
- Mishra, R., Geyer, M., Winter, R. 2009. NMR spectroscopic investigation of early events in IAPP amyloid fibril formation. *Chembiochem* 10(11): 1769-1772.
- Montane, J., Klimek-Abercrombie, A., Potter, K.J., Westwell-Roper, C., Bruce Verchere, C. 2012. Metabolic stress, IAPP and islet amyloid. *Diabetes Obes Metab* 14 Suppl 3: 68-77.
- Moriarty, D.F., Raleigh, D.P. 1999. Effects of sequential proline substitutions on amyloid formation by human amylin₂₀₋₂₉. *Biochemistry* 38(6): 1811-1818.
- Morimoto, R.I. 2008. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev* 22(11): 1427-1438.
- Morris, A.M., Watzky, M.A., Finke, R.G. 2009. Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature. *Biochim Biophys Acta* 1794(3): 375-397.

- Mosselman, S., Hoppener, J.W., de Wit, L., Soeller, W., Lips, C.J., Jansz, H.S. 1990. IAPP/amylin gene transcriptional control region: evidence for negative regulation. *FEBS Lett* **271**(1-2): 33-36.
- Muff, R., Buhlmann, N., Fischer, J.A., Born, W. 1999. An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3. *Endocrinology* **140**(6): 2924-2927.
- Munishkina, L.A., Fink, A.L., Uversky, V.N. 2004. Conformational prerequisites for formation of amyloid fibrils from histones. *J Mol Biol* **342**(4): 1305-1324.
- Murphy, R.C., Messer, A. 2004. A single-chain Fv intrabody provides functional protection against the effects of mutant protein in an organotypic slice culture model of Huntington's disease. *Brain Res Mol Brain Res* **121**(1-2): 141-145.
- Murphy, R.M. 2007. Kinetics of amyloid formation and membrane interaction with amyloidogenic proteins. *Biochim Biophys Acta* **1768**(8): 1923-1934.
- Muzzio, M., Huang, Z., Hu, S.C., Johnson, W.D., McCormick, D.L., Kapetanovic, I.M. 2012. Determination of resveratrol and its sulfate and glucuronide metabolites in plasma by LC-MS/MS and their pharmacokinetics in dogs. *J Pharm Biomed Anal* **59**: 201-208.
- Naiki, H., Higuchi, K., Matsushima, K., Shimada, A., Chen, W.H., Hosokawa, M., Takeda, T. 1990. Fluorometric examination of tissue amyloid fibrils in murine senile amyloidosis: use of the fluorescent indicator, thioflavine T. *Lab Invest* **62**(6): 768-773.
- Nakagami, Y., Nishimura, S., Murasugi, T., Kaneko, I., Meguro, M., Marumoto, S., Kogen, H., Koyama, K., Oda, T. 2002. A novel beta-sheet breaker, RS-0406, reverses amyloid beta-induced cytotoxicity and impairment of long-term potentiation in vitro. *Br J Pharmacol* **137**(5): 676-682.

- Nakagawa, K., Miyazawa, T. 1997. Absorption and distribution of tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 43(6): 679-684.
- Nanga, R.P., Brender, J.R., Vivekanandan, S., Ramamoorthy, A. 2011. Structure and membrane orientation of IAPP in its natively amidated form at physiological pH in a membrane environment. *Biochim Biophys Acta* 1808(10): 2337-2342.
- Nanga, R.P., Brender, J.R., Xu, J., Hartman, K., Subramanian, V., Ramamoorthy, A. 2009. Three-dimensional structure and orientation of rat islet amyloid polypeptide protein in a membrane environment by solution NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 131(23): 8252-8261.
- Nanga, R.P., Brender, J.R., Xu, J., Veglia, G., Ramamoorthy, A. 2008. Structures of rat and human islet amyloid polypeptide IAPP(1-19) in micelles by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 47(48): 12689-12697.
- Narayan, P., Orte, A., Clarke, R.W., Bolognesi, B., Hook, S., Ganzinger, K.A., Meehan, S., Wilson, M.R., Dobson, C.M., Klenerman, D. 2012. The extracellular chaperone clusterin sequesters oligomeric forms of the amyloid-beta(1-40) peptide. *Nat Struct Mol Biol* 19(1): 79-83.
- Neff, F., Wei, X., Nolker, C., Bacher, M., Du, Y., Dodel, R. 2008. Immunotherapy and naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative disorders. *Autoimmun Rev* 7(6): 501-507.
- Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.O., Riek, C., Grothe, R., Eisenberg, D. 2005. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435(7043): 773-778.

- Nishi, M., Bell, G.I., Steiner, D.F. 1990. Islet amyloid polypeptide (amylin): no evidence of an abnormal precursor sequence in 25 type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 33(10): 628-630.
- Nishi, M., Chan, S.J., Nagamatsu, S., Bell, G.I., Steiner, D.F. 1989a. Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(15): 5738-5742.
- Nishi, M., Sanke, T., Seino, S., Eddy, R.L., Fan, Y.S., Byers, M.G., Shows, T.B., Bell, G.I., Steiner, D.F. 1989b. Human islet amyloid polypeptide gene: complete nucleotide sequence, chromosomal localization, and evolutionary history. *Mol Endocrinol* 3(11): 1775-1781.
- Noor, H., Cao, P., Raleigh, D.P. 2012. Morin hydrate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide and disaggregates amyloid fibers. *Protein Sci* 21(3): 373-382.
- Novials, A., Sarri, Y., Casamitjana, R., Rivera, F., Gomis, R. 1993. Regulation of islet amyloid polypeptide in human pancreatic islets. *Diabetes* 42(10): 1514-1519.
- O'Brien, T.D., Butler, A.E., Roche, P.C., Johnson, K.H., Butler, P.C. 1994. Islet amyloid polypeptide in human insulinomas. Evidence for intracellular amyloidogenesis. *Diabetes* 43(2): 329-336.
- O'Brien, T.D., Butler, P.C., Westermark, P., Johnson, K.H. 1993. Islet amyloid polypeptide: a review of its biology and potential roles in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Vet Pathol* 30(4): 317-332.
- O'Brien, T.D., Hayden, D.W., Johnson, K.H., Fletcher, T.F. 1986. Immunohistochemical morphometry of pancreatic endocrine cells in diabetic, normoglycaemic glucose-intolerant and normal cats. *J Comp Pathol* 96(4): 357-369.

- O'Brien, T.D., Hayden, D.W., O'Leary, T.P., Caywood, D.D., Johnson, K.H. 1987. Canine pancreatic endocrine tumors: immunohistochemical analysis of hormone content and amyloid. *Vet Pathol* 24(4): 308-314.
- O'Brien, T.D., Westermark, P., Johnson, K.H. 1990. Islet amyloid polypeptide and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in amyloid and tumor cells of canine pancreatic endocrine tumors. *Vet Pathol* 27(3): 194-198.
- O'Nuallain, B., Acero, L., Williams, A.D., Koeppen, H.P., Weber, A., Schwarz, H.P., Wall, J.S., Weiss, D.T., Solomon, A. 2008. Human plasma contains cross-reactive Abeta conformer-specific IgG antibodies. *Biochemistry* 47(47): 12254-12256.
- O'Nuallain, B., Wetzel, R. 2002. Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3): 1485-1490.
- O'Nuallain, B., Williams, A.D., McWilliams-Koeppen, H.P., Acero, L., Weber, A., Ehrlich, H., Schwarz, H.P., Solomon, A. 2010. Anti-amyloidogenic activity of IgGs contained in normal plasma. *J Clin Immunol* 30 Suppl 1: S37-42.
- Oh, J., Kim, J.G., Jeon, E., Yoo, C.H., Moon, J.S., Rhee, S., Hwang, I. 2007. Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. *J Biol Chem* 282(18): 13601-13609.
- Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M. 2004. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J Neurosci Res* 75(6): 742-750.
- Ono, K., Li, L., Takamura, Y., Yoshiike, Y., Zhu, L., Han, F., Mao, X., Ikeda, T., Takasaki, J., Nishijo, H., Takashima, A., Teplow, D.B., Zagorski, M.G., Yamada, M. 2012. Phenolic compounds prevent amyloid beta-protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *J Biol Chem* 287(18): 14631-14643.

- Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M. 2003. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 87(1): 172-181.
- Opie, E.L. 1901. The Relation Of Diabetes Mellitus to Lesions of the Pancreas. Hyaline Degeneration of the Islands Of Langerhans. *J Exp Med* 5(5): 527-540.
- Oskarsson M.E., Paulsson, J.F., Schultz, S.W., Ingelsson, M., Westermark, P., Westermark, G.T. 2015. In vivo seeding and cross-seeding of localized amyloidosis: a molecular link between type 2 diabetes and Alzheimer disease. *Am J Pathol* 185(3): 834-846.
- Otzen, D. 2010. Functional amyloid: turning swords into plowshares. *Prion* 4(4): 256-264.
- Otzen, D.E., Knudsen, B.R., Aachmann, F., Larsen, K.L., Wimmer, R. 2002. Structural basis for cyclodextrins' suppression of human growth hormone aggregation. *Protein Sci* 11(7): 1779-1787.
- Otzen, D., Nielsen, P.H. 2008. We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. *Cell Mol Life Sci* 65(6): 910-927.
- Palhano, F.L., Lee, J., Grimster, N.P., Kelly, J.W. 2013. Toward the molecular mechanism(s) by which EGCG treatment remodels mature amyloid fibrils. *J Am Chem Soc* 135(20): 7503-7510.
- Palladini, G., Merlini, G. 2009. Current treatment of AL amyloidosis. *Haematologica* 94(8): 1044-1048.
- Pandey, N., Strider, J., Nolan, W.C., Yan, S.X., Galvin, J.E. 2008. Curcumin inhibits aggregation of alpha-synuclein. *Acta Neuropathol* 115(4): 479-489.

- Papachroni, K.K., Ninkina, N., Papapanagiotou, A., Hadjigeorgiou, G.M., Xiromerisiou, G., Papadimitriou, A., Kalofoutis, A., Buchman, V.L. 2007. Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. *J Neurochem* 101(3): 749-756.
- Park, K., Verchere, C.B. 2001. Identification of a heparin binding domain in the N-terminal cleavage site of pro-islet amyloid polypeptide. Implications for islet amyloid formation. *J Biol Chem* 276(20): 16611-16616.
- Partridge, L., Thornton, J., Bates, G. 2011. The new science of ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1561): 6-8.
- Paulsson, J.F., Andersson, A., Westermark, P., Westermark, G.T. 2006. Intracellular amyloid-like deposits contain unprocessed pro-islet amyloid polypeptide (proiapp) in beta cells of transgenic mice overexpressing the gene for human iapp and transplanted human islets. *Diabetologia* 49(6): 1237-1246.
- Paulsson, J.F., Benoit-Biancamano, M.O., Schaffer, L., Dahl, K. 2011. Ferret islet amyloid polypeptide (IAPP): characterization of in vitro and in vivo amyloidogenicity. *Amyloid* 18(4): 222-228.
- Pawar, A.P., Dubay, K.F., Zurdo, J., Chiti, F., Vendruscolo, M., Dobson, C.M. 2005. Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *J Mol Biol* 350(2): 379-392.
- Pedersen, J.S., Dikov, D., Flink, J.L., Hjuler, H.A., Christiansen, G., Otzen, D.E. 2006. The changing face of glucagon fibrillation: structural polymorphism and conformational imprinting. *J Mol Biol* 355(3): 501-523.
- Pedersen, J.S., Otzen, D.E. 2008. Amyloid-a state in many guises: survival of the fittest fibril fold. *Protein Sci* 17(1): 2-10.

- Pellistri, F., Bucciantini, M., Relini, A., Nosi, D., Gliozzi, A., Robello, M., Stefani, M. 2008. Nonspecific interaction of prefibrillar amyloid aggregates with glutamatergic receptors results in Ca²⁺ increase in primary neuronal cells. *J Biol Chem* 283(44): 29950-29960.
- Pepys, M.B. 2006. Amyloidosis. *Annu Rev Med* 57: 223-241.
- Pepys, M.B., Herbert, J., Hutchinson, W.L., Tennent, G.A., Lachmann, H.J., Gallimore, J.R., Lovat, L.B., Bartfai, T., Alanine, A., Hertel, C., Hoffmann, T., Jakob-Roetne, R., Norcross, R.D., Kemp, J.A., Yamamura, K., Suzuki, M., Taylor, G.W., Murray, S., Thompson, D., Purvis, A., Kolstoe, S., Wood, S.P., Hawkins, P.N. 2002. Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature* 417(6886): 254-259.
- Peretz, D., Williamson, R.A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I.R., Legname, G., Wormald, M.R., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Burton, D.R., Prusiner, S.B. 2001. Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* 412(6848): 739-743.
- Petkova, A.T., Ishii, Y., Balbach, J.J., Antzutkin, O.N., Leapman, R.D., Delaglio, F., Tycko, R. 2002. A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26): 16742-16747.
- Pike, C.J., Walencewicz-Wasserman, A.J., Kosmoski, J., Cribbs, D.H., Glabe, C.G., Cotman, C.W. 1995. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem* 64(1): 253-265.
- Plante-Bordeneuve, V., Said, G. 2011. Familial amyloid polyneuropathy. *Lancet Neurol* 10(12): 1086-1097.

- Poa, N.R., Cooper, G.J., Edgar, P.F. 2003. Amylin gene promoter mutations predispose to Type 2 diabetes in New Zealand Maori. *Diabetologia* 46(4): 574-578.
- Porat, Y., Abramowitz, A., Gazit, E. 2006. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des* 67(1): 27-37.
- Porat, Y., Mazor, Y., Efrat, S., Gazit, E. 2004. Inhibition of islet amyloid polypeptide fibril formation: a potential role for heteroaromatic interactions. *Biochemistry* 43(45): 14454-14462.
- Porte, D., Jr., Kahn, S.E. 1989. Hyperproinsulinemia and amyloid in NIDDM. Clues to etiology of islet beta-cell dysfunction? *Diabetes* 38(11): 1333-1336.
- Pras, M., Schubert, M., Zucker-Franklin, D., Rimon, A., Franklin, E.C. 1968. The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J. Clin. Invest.* 47: 924-933.
- Provencher, S.W., Glockner, J. 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20(1): 33-37.
- Reddy, A.S., Wang, L., Singh, S., Ling, Y.L., Buchanan, L., Zanni, M.T., Skinner, J.L., de Pablo, J.J. 2010. Stable and metastable states of human amylin in solution. *Biophys J* 99(7): 2208-2216.
- Rhoades, E., Agarwal, J., Gafni, A. 2000. Aggregation of an amyloidogenic fragment of human islet amyloid polypeptide. *Biochim Biophys Acta* 1476(2): 230-238.
- Rigacci, S., Guidotti, V., Bucciantini, M., Nichino, D., Relini, A., Berti, A., Stefani, M. 2011. Aβ(1-42) aggregates into non-toxic amyloid assemblies in the presence of the natural polyphenol oleuropein aglycon. *Curr Alzheimer Res* 8(8): 841-852.

- Rigacci, S., Guidotti, V., Bucciantini, M., Parri, M., Nediani, C., Cerbai, E., Stefani, M., Berti, A. 2010. Oleuropein aglycon prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin. *J Nutr Biochem* 21(8): 726-735.
- Rivera, J.F., Gurlo, T., Daval, M., Huang, C.J., Matveyenko, A.V., Butler, P.C., Costes, S. 2011. Human-IAPP disrupts the autophagy/lysosomal pathway in pancreatic β -cells: protective role of p62-positive cytoplasmic inclusions. *Cell Death Differ* 18(3): 415-426.
- Roberts, A.N., Leighton, B., Todd, J.A., Cockburn, D., Schofield, P.N., Sutton, R., Holt, S., Boyd, Y., Day, A.J., Foot, E.A., Willis, A.C, Reid, K.B.M., Cooper, G.J.S. 1989. Molecular and functional characterization of amylin, a peptide associated with type 2 diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(24): 9662-9666.
- Rocha, S., Thuneman, A.F., Pereira, M.D., Coelho, M., Mohwald, H., Brezesinski, G. 2008. Influence of fluorinated and hydrogenated nanoparticles on the structure and fibrillogenesis of amyloid beta-peptide. *Biophys Chem* 137(1); 35-42.
- Rocken, C., Linke, R.P., Saeger, W. 1992. Immunohistology of islet amyloid polypeptide in diabetes mellitus: semi-quantitative studies in a post-mortem series. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421(4): 339-344.
- Rosenmann, H., Meiner, Z., Geylis, V., Abramsky, O., Steinitz, M. 2006. Detection of circulating antibodies against tau protein in its unphosphorylated and in its neurofibrillary tangles-related phosphorylated state in Alzheimer's disease and healthy subjects. *Neurosci Lett* 410(2): 90-93.
- Rumora, L., Hadzija, M., Barisic, K., Maysinger, D., Grubiic, T.Z. 2002. Amylin-induced cytotoxicity is associated with activation of caspase-3 and MAP kinases. *Biol Chem* 383(11): 1751-1758.

- Sachse, C., Fandrich, M., Grigorieff, N. 2008. Paired beta-sheet structure of an Aβ(1-40) amyloid fibril revealed by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(21): 7462-7466.
- Said, G., Gripon, S., Kirkpatrick, P. 2012. Tafamidis. *Nat Rev Drug Discov* 11(3): 185-186.
- Sandberg, A., Luheshi, L.M., Sollvander, S., Pereira de Barros, T., Macao, B., Knowles, T.P., Biverstal, H., Lendel, C., Ekholm-Petterson, F., Dubnovitsky, A., Lannfelt, L., Dobson, C.M., Hard, T. 2010. Stabilization of neurotoxic Alzheimer amyloid-beta oligomers by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(35): 15595-15600.
- Sanke, T., Bell, G.I., Sample, C., Rubenstein, A.H., Steiner, D.F. 1988. An islet amyloid peptide is derived from an 89-amino acid precursor by proteolytic processing. *J Biol Chem* 263(33): 17243-17246.
- Sanke, T., Hanabusa, T., Nakano, Y., Oki, C., Okai, K., Nishimura, S., Kondo, M., Nanjo, K. 1991. Plasma islet amyloid polypeptide (Amylin) levels and their responses to oral glucose in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 34(2): 129-132.
- Sawyer, E.B., Claessen, D., Haas, M., Hurgobin, B., Gras, S.L. 2011. The assembly of individual chaplin peptides from *Streptomyces coelicolor* into functional amyloid fibrils. *PLoS One* 6(4): e18839.
- Scherzer-Attali, R., Farfara, D., Cooper, I., Levin, A., Ben-Romano, T., Trudler, D., Vientrov, M., Shaltiel-Karyo, R., Shalev, D.E., Segev-Amzaleg, N., Gazit, E., Segal, D., Frenkel, D. 2012b. Naphthoquinone-tyrptophan reduces neurotoxic Aβ*56 levels and improves cognition in Alzheimer's disease animal model. *Neurobiol Dis* 46(3): 663-672.

- Scherzer-Attali, R., Shaltiel-Karyo, R., Adalist, Y.H., Segal, D., Gazit, E. 2012a. Generic inhibition of amyloidogenic proteins by two naphthoquinone-tryptophan hybrid molecules. *Proteins* 80(8): 1962-1973.
- Schneider, S., Storkel, S., Will, W. 1980. Das amyloid der langerhansschen inseln und seine beziehung zum diabetes mellitus. *Dtsch Med Wochenschr* 105: 1143-47.
- Schubert, D., Behl, C., Lesley, R., Brack, A., Dargusch, R., Sagara, Y., Kimura, H. 1995. Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(6): 1989-1993.
- Schultz, S.W., Nilsson, K.P., Westermark, G.T. 2011. *Drosophila melanogaster* as a model system for studies of islet amyloid polypeptide aggregation. *PLoS One* 6(6): e20221.
- Sciarretta, K.L., Gordon, D.J., Meredith, S.C. 2006. Peptide-based inhibitors of amyloid assembly. *Methods Enzymol* 413: 273-312.
- Scott, L.J. 2014. Tafamidis: a review of its use in familial amyloid polyneuropathy. *Drugs* 74(12): 1371-1378.
- Sebastiani, G., Krzywkowski, P., Dudal, S., Yu, M., Paquette, J., Malo, D., Gervais, F., Tremblay, P. 2006. Mapping genetic modulators of amyloid plaque deposition in TgCRND8 transgenic mice. *Hum Mol Genet* 15(15): 2313-2323.
- Serio, T.R., Cashikar, A.G., Kowal, A.S., Sawicki, G.J., Moslehi, J.J., Serpell, L., Arnsdorf, M.F., Lindquist, S.L. 2000. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* 289(5483): 1317-1321.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., and Zimmet, P.Z. 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 87(1): 4-14.

- Shemetov, A.A., Nabiev, I., Sukhanova, A. 2012. Molecular interaction of proteins and peptides with nanoparticles. *ASC nano* 6(6): 4585-4602.
- Shen, C.L., Murphy, R.M. 1995. Solvent effects on self-assembly of beta-amyloid peptide. *Biophys J* 69(2): 640-651.
- Shepherd, L.M., Campbell, S.C., Macfarlane, W.M. 2004. Transcriptional regulation of the IAPP gene in pancreatic beta-cells. *Biochim Biophys Acta* 1681(1): 28-37.
- Shewmaker, F., McGlinchey, R.P., Thurber, K.R., McPhie, P., Dyda, F., Tycko, R., Wickner, R.B. 2009. The functional curli amyloid is not based on in-register parallel beta-sheet structure. *J Biol Chem* 284(37): 25065-25076.
- Sievers, S.A., Karanicolas, J., Chang, H.W., Zhao, A., Jiang, L., Zirafi, O., Stevens, J.T., Munch, J., Baker, D., Eisenberg, D. 2011. Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation. *Nature* 475(7354): 96-100.
- Sigurdsson, E.M. 2008. Immunotherapy targeting pathological tau protein in Alzheimer's disease and related tauopathies. *J Alzheimers Dis* 15(2): 157-168.
- Sindelar, C.V., Hendsch, Z.S., Tidor, B. 1998. Effects of salt bridges on protein structure and design. *Protein Sci* 7(9): 1898-1914.
- Sinha, S., Du, Z., Maiti, P., Klarnar, F.G., Schrader, T., Wang, C., Bitan, G. 2012a. Comparison of three amyloid assembly inhibitors: the sugar scyllo-inositol, the polyphenol epigallocatechin gallate, and the molecular tweezer CLR01. *ACS chem neurosci* 3(6): 451-458.
- Sinha, S., Lopes, D.H., Bitan, G. 2012b. A key role for lysine residues in amyloid beta-protein folding, assembly, and toxicity. *ACS Chem Neurosci* 3(6): 473-481.

- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J., Westermark, P. 2014. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid* 21(4):221-224.
- Snow, A.D., Willmer, J., Kisilevsky, R. 1987. Sulfated glycosaminoglycans: a common constituent of all amyloids? *Lab Invest* 56(1): 120-123.
- Snyder, P.W. 2007. Disease of immunity: amyloidosis. *Pathologic Basis of Veterinary Diseases*, M. D. McGavin and J. F. Zachary, Eds, pp. 246-251, Mosby Elsevier, St Louis, Mo, USA.
- Soeller, W.C., Janson, J., Hart, S.E., Parker, J.C., Carty, M.D., Stevenson, R.W., Kreutter, D.K., Butler, P.C. 1998. Islet amyloid-associated diabetes in obese A(vy)/a mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Diabetes* 47(5): 743-750.
- Soto, C., Sigurdsson, E.M., Morelli, L., Kumar, R.A., Castano, E.M., Frangione, B. 1998. Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med* 4(7): 822-826.
- Spector, R. 1988. Myo-inositol transport through the blood-brain barrier. *Neurochem Res* 13(8): 785-787.
- Squier, T.C. 2001. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol* 36(9): 1539-1550.
- Stefani, M. 2007. Generic cell dysfunction in neurodegenerative disorders: role of surfaces in early protein misfolding, aggregation, and aggregate cytotoxicity. *Neuroscientist* 13(5): 519-531.

- Stefani, M. 2012. Structural features and cytotoxicity of amyloid oligomers: implications in Alzheimer's disease and other diseases with amyloid deposits. *Prog Neurobiol* 99(3): 226-245.
- Stefani, M., Dobson, C.M. 2003. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med (Berl)* 81(11): 678-699.
- Sunde, M., Serpell, L.C., Bartlam, M., Fraser, P.E., Pepys, M.B., Blake, C.C. 1997. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* 273(3): 729-739.
- Suzuki, Y., Brender, J.R., Hartman, K., Ramamoorthy, A., Marsh, E.N. 2012. Alternative pathways of human islet amyloid polypeptide aggregation distinguished by (19)f nuclear magnetic resonance-detected kinetics of monomer consumption. *Biochemistry* 51(41): 8154-8162.
- Tang, M.K., Zhang, J.T. 2001. Salvianolic acid B inhibits fibril formation and neurotoxicity of amyloid beta-protein in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 22(4): 380-384.
- Tartaglia, G.G., Pechmann, S., Dobson, C.M., Vendruscolo, M. 2007. Life on the edge: a link between gene expression levels and aggregation rates of human proteins. *Trends Biochem Sci* 32(5): 204-206.
- Tatarek-Nossol, M., Yan, L.M., Schmauder, A., Tenidis, K., Westermark, G., Kapurniotu, A. 2005. Inhibition of hIAPP amyloid-fibril formation and apoptotic cell death by a designed hIAPP amyloid- core-containing hexapeptide. *Chem Biol* 12(7): 797-809.
- Taylor, J.D., Zhou, Y., Salgado, P.S., Patwardhan, A., McGuffie, M., Pape, T., Grabe, G., Ashman, E., Constable, S.C., Simpson, P.J., Lee, W.C., Cota, E., Chapman, M.R.,

- Matthews, S.J. 2011. Atomic resolution insights into curli fiber biogenesis. *Structure* 19(9): 1307-1316.
- Tennent, G.A., Lovat, L.B., Pepys, M.B. 1995. Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10): 4299-4303.
- Tjernberg, L.O., Naslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlstrom, A.R., Thyberg, J., Terenius, L., Nordstedt, C. 1996. Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J Biol Chem* 271(15): 8545-8548.
- Vaiana, S.M., Ghirlando, R., Yau, W.M., Eaton, W.A., Hofrichter, J. 2008. Sedimentation studies on human amylin fail to detect low-molecular-weight oligomers. *Biophys J* 94(7): L45-47.
- van Mansfeld, A.D., Mosselman, S., Hoppener, J.W., Zandberg, J., van Teeffelen, H.A., Baas, P.D., Lips, C.J., Jansz, H.S. 1990. Islet amyloid polypeptide: structure and upstream sequences of the IAPP gene in rat and man. *Biochim Biophys Acta* 1087(2): 235-240.
- Vendruscolo, M., Dobson, C.M. 2005. Towards complete descriptions of the free-energy landscapes of proteins. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 363(1827): 433-450; discussion 450-432.
- Verchere, C.B., D'Alessio, D.A., Palmiter, R.D., Weir, G.C., Bonner-Weir, S., Baskin, D.G., Kahn, S.E. 1996. Islet amyloid formation associated with hyperglycemia in transgenic mice with pancreatic beta cell expression of human islet amyloid polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8): 3492-3496.
- Verchere, C.B., D'Alessio, D.A., Wang, S., Andrikopoulos, S., Kahn, S.E. 1997. Transgenic overproduction of islet amyloid polypeptide (amylin) is not sufficient for islet amyloid formation. *Horm Metab Res* 29(6): 311-316.

- Virchow, R. 1851. Bau und zusammensetzung der corpora amylacea des menschen. *Verh Phys Med Ges Wurzburg* 2: 51-54.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416(6880): 535-539.
- Wang, J., Xu, J., Finnerty, J., Furuta, M., Steiner, D.F., Verchere, C.B. 2001. The prohormone convertase enzyme 2 (PC2) is essential for processing pro-islet amyloid polypeptide at the NH2-terminal cleavage site. *Diabetes* 50(3): 534-539.
- Wang, S.S., Liu, K.N., Lee, W.H. 2009. Effect of curcumin on the amyloid fibrillogenesis of hen egg-white lysozyme. *Biophys Chem* 144(1-2): 78-87.
- Wang, X., Zhou, Y., Ren, J.J., Hammer, N.D., Chapman, M.R. 2010. Gatekeeper residues in the major curlin subunit modulate bacterial amyloid fiber biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1): 163-168.
- Westermarck, P. 1994. Amyloid and polypeptide hormones: what is their interrelationship? *Amyloid* 1(1): 47-60.
- Westermarck, P., Andersson, A., Westermarck, G.T. 2011. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev* 91(3): 795-826.
- Westermarck, P., Engstrom, U., Johnson, K.H., Westermarck, G.T., Betsholtz, C. 1990b. Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(13): 5036-5040.

- Westermarck, P., Engstrom, U., Westermarck, G.T., Johnson, K.H., Permerth, J., Betsholtz, C. 1989. Islet amyloid polypeptide (IAPP) and pro-IAPP immunoreactivity in human islets of Langerhans. *Diabetes Res Clin Pract* 7(3): 219-226.
- Westermarck, P., Grimelius, L. 1973. The pancreatic islet cells in insular amyloidosis in human diabetic and non-diabetic adults. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 81(3): 291-300.
- Westermarck, P., Li, Z.C., Westermarck, G.T., Leckstrom, A., Steiner, D.F. 1996a. Effects of beta cell granule components on human islet amyloid polypeptide fibril formation. *FEBS Lett* 379(3): 203-206.
- Westermarck, P., Sletten, K., Johansson, B., Cornwell, G.G., 3rd. 1990a. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(7): 2843-2845.
- Westermarck, P., Sletten, K., Johnson, K.H. 1996b. Ageing and amyloid fibrillogenesis: lessons from apolipoprotein AI, transthyretin and islet amyloid polypeptide. *Ciba Found Symp*, Vol. 199, Ciba, London, pp. 205-218, 218-222.
- Westermarck, P., Wernstedt, C., Wilander, E., Hayden, D.W., O'Brien, T.D., and Johnson, K.H. 1987. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(11): 3881-3885.
- Westwell-Roper, C., Dai, D.L., Soukhatcheva, G., Potter, K.J., van Rooijen, N., Ehses, J.A., Verchere, C.B. 2011. IL-1 blockade attenuates islet amyloid polypeptide-induced proinflammatory cytokine release and pancreatic islet graft dysfunction. *J Immunol* 187(5): 2755-2765.

- White, A.R., Enever, P., Tayebi, M., Mushens, R., Linehan, J., Brandner, S., Anstee, D., Collinge, J., Hawke, S. 2003. Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* 422(6927): 80-83.
- WHO-IUIS. 1993. Nomenclature sub-committee, Nomenclature of amyloid and amyloidosis. *Bulletin of the World Health Organization* 71(1): 105-112.
- Williamson, J.A., Loria, J.P., and Miranker, A.D. 2009. Helix stabilization precedes aqueous and bilayer-catalyzed fiber formation in islet amyloid polypeptide. *J Mol Biol* 393(2): 383-396.
- Williamson, J.A., Miranker, A.D. 2007. Direct detection of transient alpha-helical states in islet amyloid polypeptide. *Protein Sci* 16(1): 110-117.
- Wilson, M.R., Easterbrook-Smith, S.B. 2000. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem Sci* 25(3): 95-98.
- Woldemeskel, M. 2012. A concise review of amyloidosis in animals. *Vet Med Int* 2012: 427296.
- Wolfe, L.S., Calabrese, M.F., Nath, A., Blaho, D.V., Miranker, A.D., and Xiong, Y. 2010. Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye thioflavin T. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(39): 16863-16868.
- Wolfgang, W.J., Miller, T.W., Webster, J.M., Huston, J.S., Thompson, L.M., Marsh, J.L., Messer, A. 2005. Suppression of Huntington's disease pathology in *Drosophila* by human single-chain Fv antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(32): 11563-11568.
- Wood, S.J., Wetzel, R., Martin, J.D., Hurle, M.R. 1995. Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide beta/A4. *Biochemistry* 34(3): 724-730.

- Wu, C., Lei, H., Wang, Z., Zhang, W., Duan, Y. 2006. Phenol red interacts with the protofibril-like oligomers of an amyloidogenic hexapeptide NFGAIL through both hydrophobic and aromatic contacts. *Biophys J* 91(10): 3664-3672.
- Yang, K.Y., Lin, L.C., Tseng, T.Y., Wang, S.C., Tsai, T.H. 2007. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 853(1-2): 183-189.
- Yan, L.M., Tatarek-Nossol, M., Velkova, A., Kazantzis, A., Kapurniotu, A. 2006. Design of a mimic of nonamyloidogenic and bioactive human islet amyloid polypeptide (IAPP) as nanomolar affinity inhibitor of IAPP cytotoxic fibrillogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7): 2046-2051.
- Yanamandra, K., Gruden, M.A., Casaite, V., Meskys, R., Forsgren, L., Morozova-Roche, L.A. 2011. alpha-synuclein reactive antibodies as diagnostic biomarkers in blood sera of Parkinson's disease patients. *PLoS One* 6(4): e18513.
- Yin, F., Liu, J., Ji, X., Wang, Y., Zidichouski, J., Zhang, J. 2011a. Baicalin prevents the production of hydrogen peroxide and oxidative stress induced by Abeta aggregation in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 492(2): 76-79.
- Yin, F., Liu, J., Ji, X., Wang, Y., Zidichouski, J., Zhang, J. 2011b. Silibinin: a novel inhibitor of Abeta aggregation. *Neurochem Int* 58(3): 399-403.
- Yoshikawa, K., Matsuura, S., Tsuchiya, T., Kadota, K. 1999. Pancreatic endocrine carcinoma with multiple hormone production in a raccoon (*Procyon lotor*). *J Comp Pathol* 120(3): 301-306.
- Zhang, X., Cheng, B., Gong, H., Li, C., Chen, H., Zheng, L., Huang, K. 2011. Porcine islet amyloid polypeptide fragments are refractory to amyloid formation. *FEBS Lett* 585(1): 71-77.

Zhang, X., Li, J.P. 2010. Heparan sulfate proteoglycans in amyloidosis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 93: 309-334.

Zhang, W., Liu, J., Dragunow, M., Cooper, G.J. 2003. Fibrillogenic amylin evokes islet beta-cell apoptosis through linked activation of a caspase cascade and JNK1. *J Biol Chem* 278(52): 52810-52819.

Annexe I

Article 5- Caractérisation d'une tumeur des îlots pancréatiques chez un ours polaire (*Ursus maritimus*)

Contribution

J'ai participé à l'obtention de tous les résultats présentés dans la publication. La nécropsie a été effectuée par Dr Pierre Hélie. J'ai contribué à la correction des diverses versions de l'article sous la supervision de la Dre Marie-Odile Benoit-Biancamano. Ce rapport de cas est publié dans le journal *Zoo Biology* (DOI :10.1002/zoo.21172).

Résumé

Ce bref rapport décrit le cas d'un ours polaire mâle âgé de 25 ans souffrant d'une tumeur des îlots de Langerhans du pancréas. L'objectif de ce rapport de cas est de décrire cette tumeur rare chez un ours polaire captif. L'implication des facteurs de risque potentiels, comme une diète riche en carbohydrates ou la présence de dépôts d'amyloïde a été évaluée. La nécropsie a révélé divers changements, incluant des nodules observés dans le foie, la rate, le pancréas, l'intestin et les glandes thyroïdes qui ont été soumis, par la suite, pour des analyses histopathologiques. Il est intéressant de noter que les multiples nodules néoplasiques étaient tous d'origine différente et comprenaient une tumeur des îlots pancréatiques. L'immunohistochimie du pancréas a confirmé la présence de l'insuline et du polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques (IAPP) dans les cellules des îlots de Langerhans du pancréas. Le gène de l'IAPP a été extrait des tissus hépatiques inclus dans la paraffine, puis séquencé. La séquence nucléotidique de l'IAPP provenant de l'ours polaire démontre quelques différences lorsqu'elle est comparée aux séquences publiées chez d'autres espèces animales. Les différents facteurs responsables des néoplasmes chez l'ours comme la diète, les agents infectieux et l'exposition aux agents chimiques industriels sont révisés. Ce rapport de cas

soulève plusieurs questions que certaines études futures pourraient étudier en évaluant la prévalence des cancers chez les animaux captifs ou sauvages.

Characterization of a pancreatic islet cell tumor in a polar bear (*Ursus maritimus*)

Jessica S. Fortin, Marie-Odile Benoit-Biancamano

Abstract

Herein, we report a 25-year-old male polar bear suffering from a pancreatic islet cell tumor. The aim of this report is to present a case of this rare tumor in a captive polar bear. The implication of potential risk factors such as high carbohydrate diet or the presence of amyloid fibril deposits was assessed. Necropsy examination revealed several other changes, including nodules observed in the liver, spleen, pancreas, intestine and thyroid glands that were submitted for histopathologic analysis. Interestingly, the multiple neoplastic nodules were unrelated and included a pancreatic islet cell tumor. Immunohistochemistry of the pancreas confirmed the presence of insulin and islet amyloid polypeptide (IAPP) within the pancreatic islet cells. The islet amyloid polypeptide (IAPP) gene was extracted from the paraffin-embedded liver tissue and sequenced. IAPP cDNA from the polar bear exhibits some differences as compared to the sequence published for several other species. Different factors responsible for neoplasms in bears such as diet, infectious agents and industrial chemical exposure are reviewed. This case report raised several issues that further studies may address by evaluating the prevalence of cancers in captive or wild animal.

Keywords: Arctic bear, insulinoma, islet amyloid polypeptide (IAPP).

Introduction

Pancreatic insulin-secreting tumors, also known as insulinomas, are fairly common in the ferret (Chen, 2008) and uncommon in domestic animals such as dog, cattle and guinea pig (Kelley et al., 1996; Madarame et al., 2009; Vannevel and Wilcock, 2005). They are rarely reported in captive or wild animals; nevertheless a β -cell insulin-secreting tumor was detected in a 15-year-old male raccoon (Yoshikawa et al., 1999). Those specific tumor cells may

contain functional β -cells releasing inappropriately high amounts of insulin (Chen, 2008; Madarame et al., 2009). Diagnosis of insulinoma is suspected on the basis of clinical signs and is strengthened by concurrent hypoglycemia and hyperinsulinemia (Caplan et al., 1996). However, definitive diagnosis requires histopathologic examination of the tumor (Caplan et al., 1996).

Amyloid can be detected in the islets of Langerhans in a majority of human and feline diabetes patients and it is also commonly seen in islet cell tumors in human and dog (Kelley et al., 1996; O'Brien et al., 1990; Paulsson et al., 2011). It is identified as densely packed protein deposits with a very characteristic fibrillar ultrastructure; these deposits origin from islet amyloid polypeptide (IAPP). Human IAPP is one of most amyloidogenic endogenous peptides known and islet amyloid deposits (AIAPP) have been associated with β -cell death, thereby furthering disease progression in diabetes patients. IAPP amyloidogenicity is quite variable among animal species, and studying this variability is likely further our understanding of the mechanisms involved in the aggregation process.

The aim of this report is to describe a case of this rare tumor and other noteworthy pathological findings in an older and captive polar bear. The presence of pancreatic amyloid and IAPP were characterized in this case and compared to other animal species.

Case history

A 25-year-old polar bear (*Ursus maritimus*) arrived in a zoo in a meager body condition. During its stay at the zoo, the animal gained weight and exhibited normal appetite and behavior. Two months later, the bear was unexpectedly found dead in the habitat.

Methods

Immunohistochemistry and special stains

Collected tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, trimmed and embedded in paraffin. The paraffin sections (4 μ m) were stained with haematoxylin-eosin-phloxine-saffron. Pancreatic sections were deparaffinised and washed with PBS (pH 7.4) for 20 min. They were next permeabilized and blocked with 0.1% saponin and 3% (w/v) BSA in PBS. The tissue sections were further incubated during 1h at 37 °C. Immunofluorescence was

performed with monoclonal antibodies against insulin, IAPP, glucagon and somatostatin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Each antibody was applied overnight at 4°C at a 1/50 (amylin and insulin) and 1/100 (glucagon and somatostatin) dilution with a solution containing 0.1% saponin and 3% (w/v) BSA. The pancreatic sections were washed 3 times with PBS containing 0.05% Tween 20TM and then incubated 1h at 37 °C in the blocking buffer containing a secondary antibody. Anti-rabbit Alexa 488 and anti-mouse Alexa 594 were used as secondary antibodies at 1/1000 dilutions (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Negative controls were performed using the serum corresponding to the type of the secondary antibody used (mouse or rabbit) and abolished the immunohistochemistry staining. After 3 washes, slides were mounted with antifade reagent (VectaMount AQ Aqueous Mounting Medium). The cellular distribution of each pancreatic hormone was assessed using a DMI 4000B reverse fluorescence microscope. Images were captured as 8-bit tagged image format files with a DFC 490 digital camera and the images were analyzed using the Leica Application Suite Software, version 2.4.0 (Leica Microsystems Inc., Richmond Hill, Canada). Immunohistological staining of normal pancreatic sections (designed as a normal case control) from a different polar bear case were assessed to compare the distribution of pancreatic hormones. Pancreatic sections were also stained with Congo red to reveal amyloid deposits.

Isolation and sequencing of IAPP cDNA

To sequence the IAPP gene, DNA was isolated from paraffin-embedded tissues for polar, black and Asiatic black bears using a DNeasy tissue kit (Qiagen). Blood mini kit (Qiagen) was used to isolate DNA from a spectacled bear blood sample. The Asiatic black bear paraffin block and spectacled bear blood sample were obtained from IDEXX and Granby Zoo, respectively. Fast-cycling PCR DNA synthesis was performed with a Techne TC-512 thermocycler. Each PCR reaction consisted of 500 nM of IAPP primers (forward and reverse), 300 ng of DNA and 10 µL of fast cycling taq DNA polymerase master mix (Qiagen). Forward and reverse primers and the PCR protocol were previously published (Yoshikawa et al., 1999). Sequencing was performed at the McGill gene sequencing platform.

***In silico* analysis of fibril formation**

The tendency for β -sheet aggregation of each amino acid sequence was calculated based on the Agg parameter, obtained using *in silico* analysis with the TANGO program (<http://tango.crg.es>). The amino-acid sequence of ferret (*Mustela putorius furo*) and the raccoon (*Procyon lotor*) IAPP previously published were selected to compare the Agg parameter (Paulsson et al., 2011; Yoshikawa et al., 1999). Human and feline IAPP amino-acid sequences were used as positive control and rodent IAPP was representative of a negative control. Control sequences were obtained from Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), with the following accession numbers: *Homo sapiens* (M26650.1), *Felis catus* (NM001043338.1), *Rattus norvegicus* (NM012586.2).

Results

Necropsy finding

At necropsy, the polar bear weighted 400 kg and was in good body and nutritional condition. Hemorrhage was noted in the epaxial muscle at the thoracolumbar junction. An abundant serous liquid (10 mL) was collected from the pericardial sac. Inside the heart, digitiform fibrous projection within atria and pale zones in the papillary muscle of the left ventricle were noticed. Pulmonary congestion and edema, mild and diffuse, were present without *Bacillariophyta* or any aquatic organism in the liquid. In the kidney, greyish-white lines were located in the cortex of many lobules and papillas were pale. On cross-section, nodules were observed in various organs: in both thyroid lobes (1 mm and 4 cm) and the left medial hepatic lobe (25 cm), as well as the spleen (1 mm), pancreas (1-4 mm) and musculosa/adventitia of the intestine (Fig. 1). The hepatic mass consisted of a well delimited, marble nodule. The nodules observed in the musculosa/adventitia of the intestine were firm. Macroscopically, on cut section of the pancreas, the nodules were multiple, greyish and firm. Microbiological analysis did not reveal a concurrent bacterial infection.

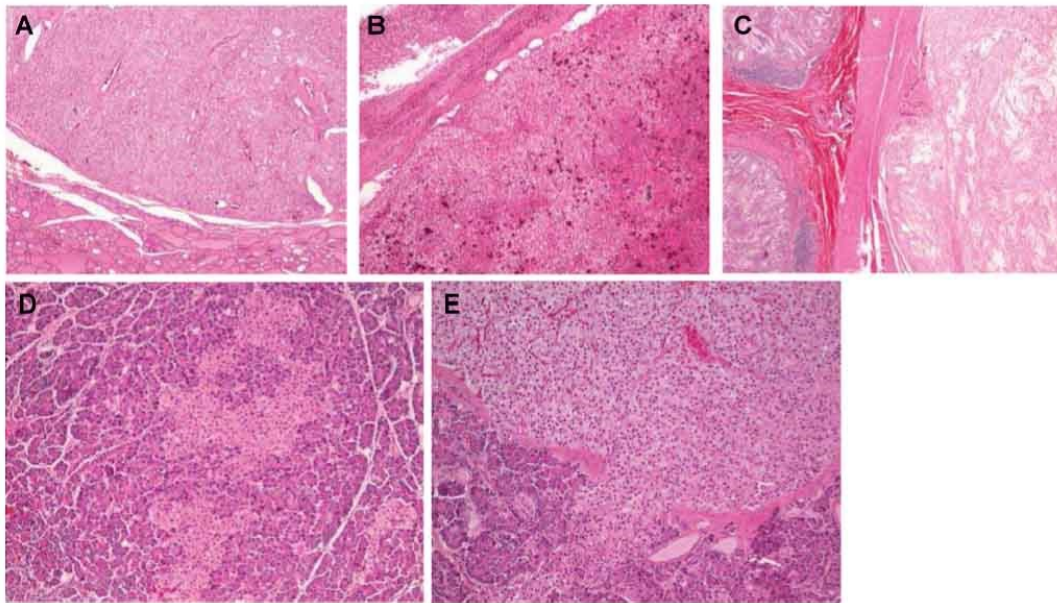
Microscopic examination

Histopathologic examination of the heart revealed light to moderate perivascular and interstitial fibrosis of the left ventricle (papillary muscle), septum and right atrium (including

atrioventricular node). Arterio- and arteriosclerosis were also present in multiple blood vessels. The atrium exhibited hypertrophic/hyperplastic mesothelial cells with formation of digitiform fibrous projections (atrial proliferative fibrosing epicarditis).

Microscopic analysis of the lungs showed a chronic endogenous lipid pneumonia with congestion, alveolar edema and focal catarrhal bronchiolitis. Both kidneys had degenerative lesions involving mesangial sclerosis and interstitial fibrosis of the medulla. Additional histopathological findings included also a pyogranulomas in the spleen and multifocal fibrosis in the glomerulosa of the adrenal cortex.

Figure 1. Proliferative changes included (A) follicular adenoma of the thyroid gland, (B) hepatoma in the medial left hepatic lobe (and extramedullary hematopoiesis), (C) intestinal leiomyoma and (D) multifocal pancreatic islet cell hyperplasia and (E) adenoma. HEPS (20X magnification).



Histologically, the thyroid nodules were well demarcated and encapsulated as shown at the right part of Fig. 1 A. The nodules were present in both thyroid lobes and contained abundant and homogenous intra-follicular eosinophilic colloid. Histopathologic examination revealed the presence of a capsule and, overall characteristics of a follicular adenoma.

The well-circumscribed mass in the medial left hepatic lobe is illustrated at the upper part of Fig. 1B. The mass consisted of the proliferation of hepatocellular neoplastic cells. It

contained small areas of hemorrhage and necrosis. Histologic examination indicated that the cells resembled normal liver cells. The hepatic nodule was diagnosed as a hepatoma.

The intestine mass was well circumscribed by connective tissues as depicted at the bottom part of Fig. 1C. Bundles of elongated muscle cells with eosinophilic cytoplasm and blunt edged nuclei were noticed on histopathologic examination, consistent with a leiomyoma.

Microscopic examination of the pancreatic tissues revealed several non-encapsulated areas containing pancreatic islet cell hyperplasia mingled with surrounding exocrine tissue (Fig. 1D). The cells were the same size as in normal islets. Pancreatic nodules were encapsulated by connective tissue. They were composed of closely packed, variably sized neoplastic cells (Fig. 1E). The neoplastic cells were cuboidal or polyhedral and generally larger than normal pancreatic islet cells. The cytoplasm was eosinophilic and abundant. There were no mitotic figures. Tumor invasion was noticed locally into adjacent parenchyma (Fig. 1E). Based on histological and immunohistochemical examinations, multifocal hyperplasia of β -cell islets and an encapsulated adenoma were diagnosed.

Interestingly, a blood sample collected two months before death showed that the thyroid function (T_4 : 0.8 ± 0.3 $\mu\text{g/dl}$, T_3 : 75.2 ± 27.2 ng/dl) and the fasting blood sugar were within normal range (114 ± 32 mg/dl). Results indicated normal values of aspartate aminotransferase (AST; $79 \pm \text{U/L}$), alkaline phosphatase (53 ± 42 U/L) and total bilirubin (0.2 ± 0.2 mg/dl).

Immunohistochemistry and special stain

Pancreas sections of the polar bear were stained with Congo red and did not show amyloid deposition (Fig. 2). They were also incubated with monoclonal antibodies against insulin, glucagon and somatostatin. Immunohistochemistry staining of the adenoma was positive for insulin (Fig. 3). Co-expression of IAPP and insulin was corroborated in the islets of langerhans and exhibited a β -cell labeling motif (Fig. 4). Autofluorescence of red blood cells was noted upon immunohistochemistry staining.

Figure 2. Congo red staining (A) of the encapsulated islet cell adenoma and (B) Congo red positive control (bovine kidney) (20X magnification).

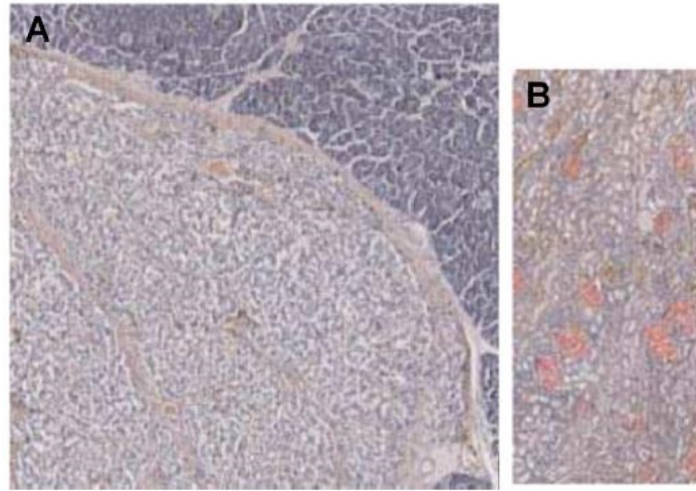


Figure 3. Immunohistochemical evaluation of normal and tumoral pancreatic sections (10X magnification) from the current case and comparison with another polar bear (20X magnification). Normal section: (A) insulin, (B) glucagon, (C) somatostatin antibodies and (D) negative control. Insulinoma: (E) insulin, (F) glucagon and (G) somatostatin antibodies. Normal pancreatic section from another polar bear: (H) insulin, (I) glucagon and (J) somatostatin antibodies.

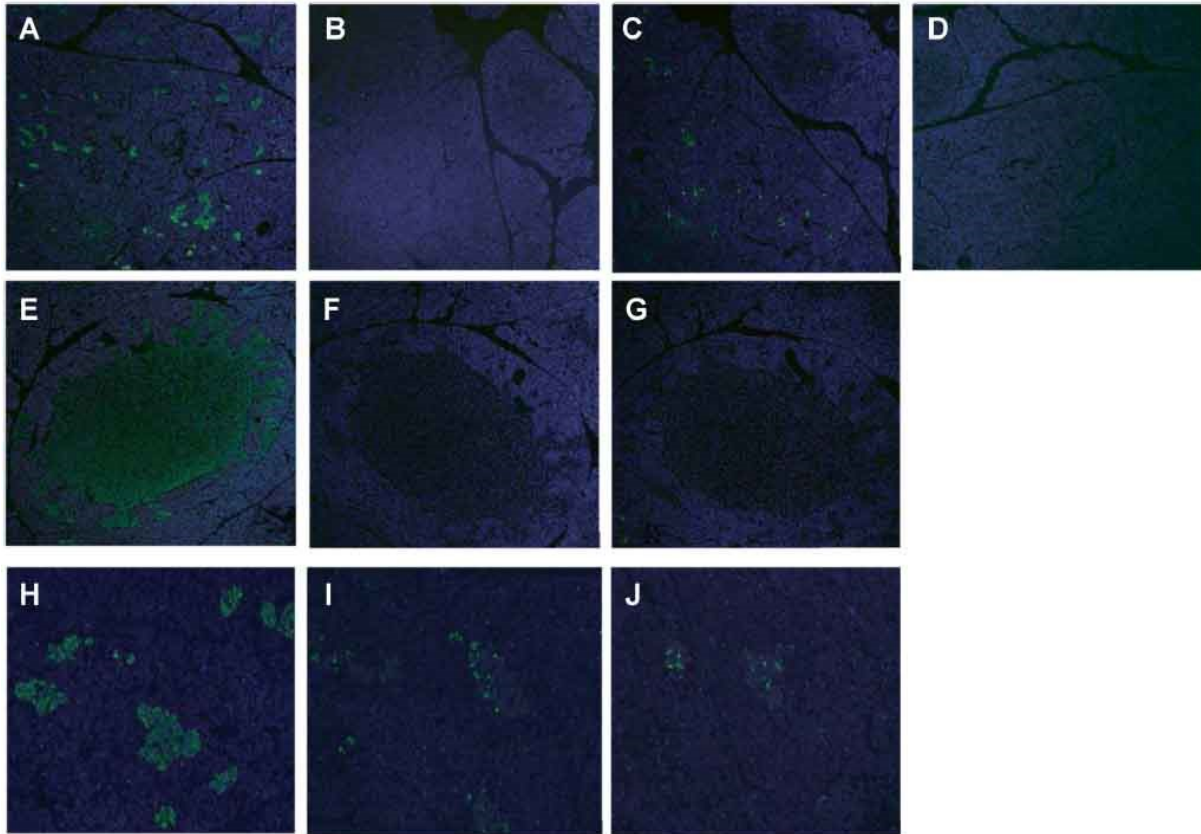
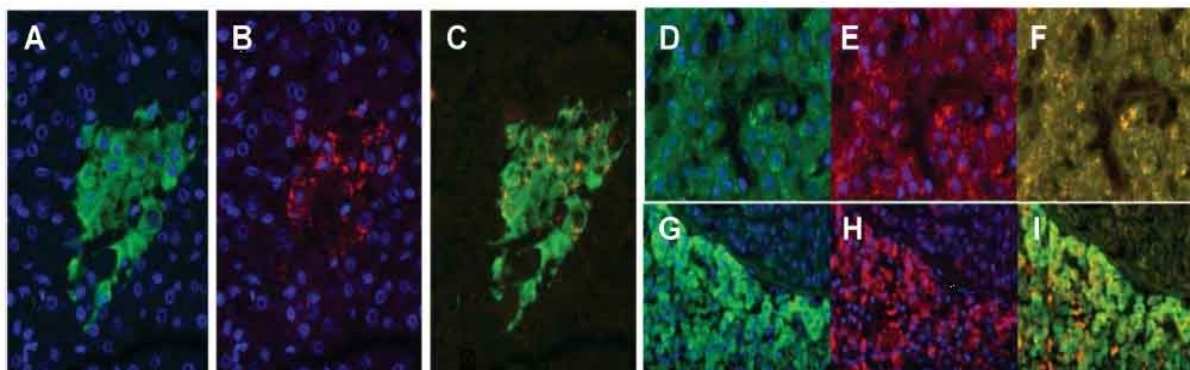


Figure 4. Immunohistochemical staining for insulin and IAPP of the current polar bear case. Normal islet (64X magnification): (A) insulin, (B) IAPP, (C) merge. Hyperplasia (64X magnification): (D) insulin, (E) IAPP, (F) merge. Insulinoma (40X magnification): (G) insulin, (H) IAPP, (I) merge.



IAPP Sequencing

We isolated DNA of polar (*Ursus maritimus*), black (*Ursus americanus*), Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) and spectacled bears (*Tremarctos ornatus*) to amplify the IAPP gene and compare it to other species. The nucleic acid sequences were identical for all bears with the exception of the spectacled bear (Table 1). The amino acid sequences for region 23-29 are identical for the bears, cat, and raccoon. The region 15-18 is also found identical in bear, ferret and rat. We compared the *in silico* potential of IAPP to form β -sheet precipitates, as expressed by the Agg parameter. The human IAPP amyloidogenic sequence exhibits the highest Agg parameter, in contrast to the rat non-amyloidogenic IAPP sequence, which is the lowest. Following the *in silico* analysis, we noticed that the cat, ferret and bear presented a similar Agg parameter.

Table 1. Identification of the 37 amino acids of IAPP using PCR and sequencing experiments. Amino acid sequences of polar, black, Asiatic black and spectacled bear, and comparison with the amyloidogenic (human, cat, ferret and raccoon) or non-amyloidogenic (rat) sequences in other species. The dark amino acids represent the typically recognized amyloidogenic regions. The Agg parameter was obtained using the Tango algorithm. Boxes represent amino acid variations between species.

	1	10	20	30	Agg																																	
Human	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	H	S	S	N	N	F	G	A	I	L	S	S	T	N	V	G	S	N	T	Y	45
Bears	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	R	S	G	N	N	L	G	A	I	L	S	P	T	N	V	G	S	N	T	Y	16
Spectacled bear	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	R	S	S	N	N	L	G	A	I	L	S	P	T	N	V	G	S	N	T	Y	16
Ferret	K	C	N	T	A	T	C	V	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	R	S	S	N	N	L	G	A	I	L	L	P	T	D	V	G	S	N	T	Y	16
Cat	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	L	R	S	S	N	N	L	G	A	I	L	S	P	T	N	V	G	S	N	T	Y	15
Raccoon	K	C	N	T	A	T	C	V	T	Q	R	L	A	N	F	L	L	R	S	S	N	N	L	G	A	I	L	S	P	T	N	V	G	S	N	T	Y	11
Rat	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	R	S	S	N	N	L	G	P	I	L	P	P	T	N	V	G	S	N	T	Y	7

Discussion

There is limited information available on neoplasia in polar bears. A literature review supports that neoplasms are important entities in ageing tropic bears, such as Malayan sun bears (*Helarctos malayanus*) and Sloth bears (*Melursus ursinus*) (Hellmann et al., 1991). Interestingly, most of the tumors observed in these species originated from the hepatic and biliary tract (Gosselin and Kramer, 1984; Hellmann et al., 1991; Matsuda et al., 2010). A gallbladder carcinoma and primary liver cell carcinoma have also been reported in polar bears (Hellmann et al., 1991; Miller et al., 1985). In the current case report, a hepatoma, a benign liver tumor, was observed. Neoplasms of the thyroid gland are not uncommon in Malayan sun bears (Hellmann et al., 1991). Herein, the polar bear presented follicular adenomas; a condition which has also been reported in an American black bear (*Ursus americanus*) (Storms et al., 2004). The American bear suffered from hypothyroidy, which was attributed to a colloid goiter and a follicular cystadenoma (Storms et al., 2004). In the current polar bear case, thyroid function was normal.

The multiple pancreatic nodules observed macroscopically in this case were characterized as adenomas. The positive immunofluorescence staining for insulin was indicative of an insulinoma. Laboratory data obtained two months before death showed a

normal fasting blood glucose level. Insulin and proinsuline levels were not assessed. Hence, the functional role of the tumor was not excluded. Multiple adenomas and carcinomas of pancreatic islet beta-cells were previously reported in a polar bear. In the latter animal, the diet had been supplemented during the visiting season with approximately 6000 marshmallows per day, over the course of 19 years (Alroy et al., 1980). The prolonged excessive carbohydrate consumption was pointed out by the authors as a potential contributing factor in the development of the multiple beta-cell neoplasms observed in this animal (Alroy et al., 1980). White nodules in the pancreas corresponding to nodular hyperplasia have also been described in a Hokkaido brown bear (Matsuda et al., 2010). The incidence of pancreatic islet cell tumors in polar bears is unknown. In other species, functional adenomas and adenocarcinomas are described and the prognosis is generally poor, depending on the tumor stage (Chen, 2008; Caplan et al. 1996).

Amyloid deposits have been commonly described in islet cell tumors in other animal species, (Jordan et al., 1994; Paulsson et al., 2011) however, the pancreatic tissue in the current case was devoid of amyloid (AIAPP), despite IAPP expression by the tumor cells. IAPP was sequenced and, interestingly, the amino acid sequence was similar to the amyloidogenic sequences published in the literature (cat, raccoon, human) (Jordan et al., 1994). We performed an *in silico* analysis using the TANGO program and observed that the bear Agg parameter is similar to the cat and ferret, which have been described to be amyloidogenic (Paulsson et al., 2011). However, further research is needed to improve our understanding of key events promoting *in vivo* amyloidogenicity.

Age-related diseases have been reported in bear. Senile changes in the brain of an American black bear, such as senile plaques and cerebral amyloid angiopathy, have been reported (Uchida et al., 1995). Interestingly, these changes were also observed in elderly human and Alzheimer's disease (Uchida et al., 1995). The average life span of polar bear is approximately 23 years in the Arctic (Sonne, 2010) and up to 30 years in captivity (Lin et al., 2005). Our findings indicate that the 25-year-old polar bear suffered from age-related degenerative conditions including neoplasia, cardiac fibrosis and renal sclerosis. It would be relevant to evaluate the occurrence of cancer in captive animals to validate the possibility of a

higher prevalence of certain types of tumors. This phenomenon could have been explained by a different lifestyle in captivity *versus* wildlife or a gain in life expectancy. Further research is needed to improve husbandry and preventive/therapeutic care with the objective of delaying the negative impact of age-related degenerative pathologies. Also, our report emphasizes that it is important to consider neoplastic diseases in the differential diagnosis of aged bears with weakness or illness. In the current case report, death was considered unrelated to the islet cell tumor and was attributed to the observed cardiac fibrosis, likely secondary to chronic ischemia based on the concurrent arterial and arteriolar changes.

Acknowledgements

Jessica S. Fortin was recipient of a studentship from Diabète Québec. We would like to thank Dr. Pierre Hélie for his scientific input. We wish to thank IDEXX (Dr. David W. Gardiner) and Granby Zoo (Dr. Marie-Josée Limoges) for sharing the Asiatic black and spectacled bear samples, respectively.

References

- Alroy J, Baldwin D, Maschgan ER. 1980. Multiple beta-cell neoplasms in a polar bear - an immunohistochemical Study. *Vet Pathol* 17(3):331-337.
- Caplan RE, Peterson EM, Mullen SH, Quensenberry EK, Rosenthal LK, Hoefler LH, Moroff DS. 1996. Diagnosis and Treatment of Insulin-Secreting Pancreatic Islet Cell Tumors in Ferrets: 57 Cases (1986-1994). *J Am Vet Med Assoc* 209(10):1741-1745.
- Chen S. 2008. Pancreatic endocrinopathies in ferrets. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 11(1):107-123, vii.
- Gosselin SJ, Kramer LW. 1984. Extrahepatic biliary carcinoma in sloth bears. *J Am Vet Med Assoc* 185(11):1314-1316.
- Hellmann J, Hofmeister R, Goltenboth R. 1991. The occurrence of tumors in large bears (Ursidae)--a literature review and six case descriptions. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 104(8):262-268.

- Jordan KC, O'Brien TD, Johnson KH. 1994. Sequence of raccoon IAPP supports importance of a specific structural motif in the development of pancreatic-islet amyloidosis. *Amyloid-International Journal of Experimental and Clinical Investigation* 1(3):160-164.
- Kelley LC, Harmon BG, McCaskey PC. 1996. A retrospective study of pancreatic tumors in slaughter cattle. *Vet Pathol* 33(4):398-406.
- Lin RC, Engeli E, Prowten AW, Erb HN, Ducharme NG, Goodrich LR. 2005. Antebrachial fractures in four captive polar bears (*Ursus maritimus*). *Vet Surg* 34: 358-365.
- Madarame H, Kayanuma H, Shida T, Tsuchiya R. 2009. Retrospective study of canine insulinomas: eight cases (2005-2008). *J Vet Med Sci* 71(7):905-911.
- Matsuda K, Qiu Y, Kawamura Y, Suzuki H, Takita Y, Sakamoto H, et al. 2010. Hepatocellular carcinoma in a Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*). *J Vet Med Sci* 72(9):1213-1216.
- Miller RE, Boever WJ, Thornburg LP, Curtis-Velasco M. 1985. Hepatic neoplasia in two polar bears. *J Am Vet Med Assoc* 187(11):1256-1258.
- O'Brien TD, Westermark P, Johnson KH. 1990. Islet amyloid polypeptide and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in amyloid and tumor cells of canine pancreatic endocrine tumors. *Vet Pathol* 27(3):194-198.
- Paulsson JF, Benoit-Biancamano MO, Schaffer L, Dahl K. 2011. Ferret islet amyloid polypeptide (IAPP): characterization of in vitro and in vivo amyloidogenicity. *Amyloid* 18(4):222-228.
- Sonne C. 2010. Health effects from long-range transported contaminants in Arctic top predators: An integrated review based on studies of polar bears and relevant model species. *Environment International* 36: 461-491.
- Storms NT, Beazley LS, Schumacher J, Ramsay CE. 2004. Thyroid cystadenoma, colloid goiter, and hyperthyroidism in an American black bear (*Ursus americanus*) *American Association of Zoo Veterinarians* 35(1):82-87.

- Uchida K, Yoshino T, Yamaguchi R, Tateyama S, Kimoto Y, Nakayama H, Goto N. 1995. Senile plaques and other senile changes in the brain of an aged American black bear. *Vet Pathol* 32: 412-414.
- Vannevel JY, Wilcock B. 2005. Insulinoma in 2 guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne* 46(4):339-341.
- Yoshikawa K, Matsuura S, Tsuchiya T, Kadota K. 1999. Pancreatic endocrine carcinoma with multiple hormone production in a raccoon (*Procyon lotor*). *Journal of Comparative Pathology* 120(3):301-306.

Annexe II

Article 6- Caractérisation anatomique et moléculaire du pancréas endocrin d'un poisson téléostéen : le loup de l'Atlantique (*Anarhichas lupus*)

Contribution

J'ai participé à l'obtention des résultats (séquençage, analyse in silico, immunofluorescence) et à la rédaction. Dr Stéphane Lair, Dr André Dallaire et Dre Ariane Santamaria-Bouvier ont effectué les nécropsies et isolé les pancréas. La correction des diverses versions de l'article a été effectuée sous la supervision des Dre Stéphane Lair et Dre Marie-Odile Benoit-Biancamano. Ce manuscrit est publié dans le journal *Zoological Studies* (DOI : 10.1186/s40555-014-0093-4).

Résumé

Introduction : Les attributs biologiques du pancréas endocrine et l'endocrinologie comparative du polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques (IAPP) des poissons ne sont pas extensivement décrits dans la littérature. Cette étude décrit le pancréas endocrin d'un poisson téléostéen. Dix loups de l'Atlantique (*Anarhichas lupus*) provenant du Biodôme de Montréal ont été soumis pour nécropsie et leur pancréas a été prélevé. **Résultats :** À l'examen macroscopique, les pancréas examinés contenaient 1 à 3 nodules de diamètres variables (1 à 8 mm). Macroscopiquement, les nodules étaient uniformes, très cellulaires, et composés de cellules polygonales à allongées. L'immunofluorescence contre diverses hormones pancréatiques a été effectuée. Les nodules étaient immunoréactifs pour l'insuline au centre des nodules, mais l'immunofluorescence pour l'IAPP et le glucagon étaient plutôt positives à la périphérie. Le pancréas exocrin était positif pour la chromogranine A et composé d'unités séparées du pancréas endocrin. L'immunoréactivité de l'IAPP survenant dans les cellules α contenant le glucagon est une localisation non rapportée précédemment. L'IAPP n'était pas

co-localisée avec l'insuline dans les cellules β . Le séquençage du gène de l'IAPP a été réalisé afin de comparer la séquence parmi les poissons téléostéens et leur potentiel respectif à former des fibrilles. L'analyse *in silico* de la séquence en acides aminés 19-34 révélait qu'elle n'était pas amyloïdogène chez le loup de l'Atlantique. **Conclusion** : Le développement spontané d'amyloïdose des îlots pancréatiques est improbable chez le loup de l'Atlantique. Notre étude souligne que ce type de poisson téléostéen est un candidat potentiel pour la recherche et le développement de xénogreffes des îlots pancréatiques.

Anatomic and molecular characterization of the endocrine pancreas of a teleostean fish: Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*)

Jessica S. Fortin, Ariane Santamaria-Bouvier, Stéphane Lair, André D. Dallaire, Marie-Odile Benoit-Biancamano

Abstract

Background: The biologic attributes of the endocrine pancreas and the comparative endocrinology of islet amyloid polypeptide (IAPP) of fish are not well described in the literature. This study describes the endocrine pancreas of one teleostean fish. Ten captive Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) from the Montreal Biodome were submitted for necropsy and their pancreata were collected. **Results:** Grossly, all the fish pancreata examined contained 1-3 nodules of variable diameter (1-8 mm). Microscopically, the nodules were uniform, highly cellular, and composed of polygonal to elongated cells. Immunofluorescence for pancreatic hormones was performed. The nodules were immunoreactive for insulin most prominent centrally, but with IAPP and glucagon only in the periphery of the nodules. Exocrine pancreas was positive for chromogranin A. Not previously recognized in fish, IAPP immunoreactivity occurred in α , glucagon-containing, cells and did not co-localize with insulin in β cells. The islet tissues were devoid of amyloid deposits. IAPP DNA sequencing was performed to compare the sequence among teleost fish and the potency to form amyloid fibrils. *In silico* analysis of the amino-acid sequences 19-34 revealed that it was not amyloidogenic. **Conclusions:** Amyloidosis of pancreatic islets would not be expected as a

spontaneous disease in the Atlantic wolffish. Our study underlines that this teleost fish is a potential candidate for pancreatic xenograft research.

Keywords: Beta cells, endocrine pancreas, glucagon, insulin, islet amyloid polypeptide (IAPP), teleost fish.

Introduction

The pancreas is an endodermal organ found in all vertebrates with two different functional components that are essential for the homeostatic regulation of glucose and food digestion. The exocrine pancreas is composed of acinar and duct cells involved in the production and transport of digestive enzymes into the gut, whereas the endocrine compartment regulates the production and secretion of peptide hormones into the bloodstream. In higher vertebrates, there are five endocrine cells type that cluster as the islets of Langerhan. The hormonal expression is specific to each cell type: glucagon (α cells), insulin (β cells), somatostatin (δ cells), ghrelin (ϵ cells) and pancreatic polypeptide (PP cells) [1].

The pancreatic tissues of several species of teleost fish have been described and a complete separation of exocrine and endocrine parenchyma occurs [1,2]. The islet tissues of some teleost fish are concentrated in two principal islets (Brockmann bodies): one is found near the spleen and the other is located inside the wall of the duodenum, at the pyloric junction [3]. These islets contain insulin, glucagon and somatostatin but only the pyloric Brockmann bodies secrete pancreatic polypeptide [4]. The isolation and characterization of glucagon, insulin, somatostatin and pancreatic polypeptide from islet tissues of several teleost fish were previously described [3, 5-9]. The amino acid sequence and primary structure of teleost islet hormones slightly differs from their higher vertebrate counterparts [2-4, 5-9]. Islet amyloid polypeptide (IAPP) is a hormone of 37 amino acids that is co-secreted with insulin by the β cells of mammals [10]. This protein, namely amylin, can generate amyloid fibril deposits found naturally in the human and cats, but pancreatic islet amyloid fibrils, in contrast to serum amyloid fibrils, are not found in rat and mouse [10]. Amyloid fibril formation contributes to the pathogenesis of diabetes mellitus in humans and cats [10]. IAPP has been described in pancreatic islet parenchyma of daddy sculpin (*Myoxocephalus cottus scorpus*) [11], however

the comparative endocrinology of IAPP and the propensity to form amyloid deposits remain to be elucidated in lower vertebrates.

Since the last decade, teleost species have become important as model systems in different areas of hormonal, metabolic and immunologic research [12,13]. One advantage of using teleost fish in studies of diabetes mellitus is that the pancreatic endocrine cells are separated from the pancreatic exocrine tissue and can be easily isolated and harvested. Therefore, the Brockmann body of teleost fish, particularly the tilapia (*Oreochromis nilotica*), has been investigated as a potential xenograft tissue for patients with type 1 diabetes [2]. The transplantation of tilapia Brockmann bodies into a diabetic nude mice model has been shown to promote long-term normoglycemia responsive to intraperitoneal glucose administration [14,15]. However, islet amyloid formation is a major hindrance to pancreatic transplant resulting in nonimmunologic transplanted islet graft loss in a primate transplant model [16]. It is important for the xenograft success of microencapsulated pancreatic endocrine cells to identify which species of teleost fish could be used without the amyloidosis risk. To promote comparative understandings in endocrine pathophysiology, the pancreatic hormonal expression and localization in lower vertebrates should be further clarified.

In this study, we describe the principal islets (Brockmann bodies) of a different teleost species, the Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) using immunohistochemical and immunofluorescence techniques in an attempt to better understand the physiological regulation of glucose and the potential usefulness of this teleost fish in endocrinological studies. These endocrine pancreas bodies of fish have occasionally been mistaken for endocrine tumors by pathologists, thus we also clarify endocrine pancreas structure and function for comparative pathologists. The comparative pancreatic endocrinology of IAPP is poorly described in fish, we therefore focused our study on the isolation of the IAPP gene from the Atlantic wolffish pancreatic tissues. The amino acid sequences of the IAPP were determined and the *in silico* analysis was performed to compare the amyloidogenicity of *Anarhichas* IAPP to other vertebrate species.

Methods

Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*)

All fish were obtained from the Montreal Biodome that maintained aquariums. Atlantic wolffish were approximately nine to ten years old and submitted dead on ice at the necropsy services for diagnostic purpose. Necropsy was done approximately one hour after death, and all were well preserved. Pancreata were collected and fixed in 10% neutral buffered formalin, trimmed and embedded in paraffin.

Routine staining, special stains and immunohistochemistry

The paraffin sections (4 μm) were stained with haematoxylin-eosin-phloxine-saffron (HEPS) for the histologic analysis of all organs. Pancreatic sections were stained with Congo red to reveal amyloid deposits and Grimelius to identify neuroendocrine cells.

For immunohistochemistry procedure, pancreatic sections were deparaffinised and washed with PBS (pH 7.4) for 20 min. They were next permeabilized and blocked with 0.1% saponin and 3% (w/v) BSA in PBS. The tissue sections were further incubated during 1h at 37 °C. Immunofluorescence was performed with monoclonal antibodies against insulin, IAPP, glucagon and somatostatin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). All were rabbit monoclonal antibody except for IAPP, which was a mouse monoclonal antibody. Rabbit anti-chromogranin A, anti-pancreatic polypeptide and anti-synaptophysin antibodies were purchased from Thermo Scientific. Each antibody was applied overnight at 4°C at a 1/50 dilution with a solution containing 0.1% saponin and 3% (w/v) BSA. The pancreatic sections were washed 3 times with PBS containing 0.05% Tween 20TM and then incubated 1h at 37 °C in the blocking buffer containing a secondary antibody. Anti-rabbit Alexa 488 and anti-mouse Alexa 594 were used as secondary antibodies at 1/1000 dilutions (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Negative controls were performed using the serum corresponding to the type of the secondary antibody used (mouse or rabbit). After 3 washes, slides were mounted with anti-fade reagent (DakoCytomation, Carpinteria, CA). The cellular distribution of each pancreatic hormone was assessed using a DMI 4000B reverse fluorescence microscope. Images were captured as 8-bit tagged image format files with a DFC 490 digital camera and the images were analyzed using the Leica Application Suite Software, version 2.4.0 (Leica Microsystems

Inc., Richmond Hill, Canada). Data are representative of all specimens collected.

Isolation and sequencing of *Anarhichas* IAPP DNA

To sequence the IAPP gene, DNA was isolated from paraffin-embedded pancreatic tissues using a DNeasy tissue kit (Qiagen). Fast-cycling PCR DNA synthesis was performed with a Techne TC-512 thermocycler with the following PCR protocol: 5 min at 96 °C; 45 cycles of 5 s at 96 °C, 5 s at 53 °C and 5 sec at 68 °C; and a final extension of 1 min at 72 °C. Each PCR reaction consisted of 500 nM of IAPP primers (forward and reverse), 300 ng of DNA and 10 µL of fast cycling taq DNA polymerase master mix (Qiagen). Degenerate IAPP Forward (5' - AAGTGCAACACAGCCACCTG - 3') and reverse (5' - CGTTTKCCGTAGGTRTTDCGA -3') primers were used and covered the 7 first and 3 last amino acids of the IAPP peptide [11]. PCR products were visualized in a 2% (m/v) agarose gel with ethidium bromide and bands of the expected size were extracted (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, Cedarlane Labs, Burlington, ON, Canada). A second PCR was performed using the same primers with the following PCR protocol: 5 min at 96 °C; 45 cycles of 5 sec at 96 °C, 5 sec at 54 °C and 5 sec at 68 °C; and a final extension of 1 min at 72 °C. Sequencing was performed using the McGill gene sequencing platform. The amino acid sequence of *Anarhichas* IAPP was deduced based on DNA sequence (<http://didac.free.fr/seq/dna2pro.htm>).

In silico analysis of fibril formation

The tendency for β -sheet aggregation of each amino acid sequence was calculated based on the Agg parameter, obtained using *in silico* analysis with the TANGO program (<http://tango.crg.es>), which predicts protein aggregation. A higher Agg score is indicative of a peptide that can form potentially toxic aggregates. The amino-acid sequence in the 19-34 segment of Atlantic salmon (*Salmo salar*), daddy sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) and zebrafish (*Danio rerio*) IAPP previously published were selected to compare the Agg parameter [11]. Human and feline IAPP amino-acid sequences were used as positive controls and rodent IAPP was representative of a negative control. Control sequences were obtained from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), with the following accession numbers:

Homo sapiens [GenBank : M26650.1], *Felis catus* [GenBank : NM001043338.1], *Rattus norvegicus* [GenBank : NM012586.2].

Results

Macroscopic and microscopic examination

At necropsy, the pancreas was surrounded by adipose tissue. Figure 1A shows the gross appearance of the pancreas from an Atlantic wolffish, the arrows indicate the pancreatic tissue surrounded by adipose tissue. All the fish pancreata examined contained one to three nodules (Figure 1B) of variable diameter (1-8 mm) within the pancreas. Nodules were further isolated for histopathological examination (Figure 2A) revealing pancreatic islet cells in nodules sometimes surrounded by exocrine pancreatic tissue, though the specific subtopographical location of each nodule was not recorded at necropsy. The nodules consisted of uniform polygonal to elliptical cells and were surrounded by a delicate connective tissue capsule. Smaller nodules were completely embedded in exocrine tissue (Figure 2B) whereas larger nodules were not consistently completely encased in exocrine pancreas. Discrete nodules consisting of exocrine pancreatic tissue were also observed (Figure 2C).

Figure 1 Brockmann bodies isolated from an Atlantic wolffish. A. Pancreatic tissues are scattered in the mesentery (black arrows). **B.** The Brockmann body is indicated with an arrow.

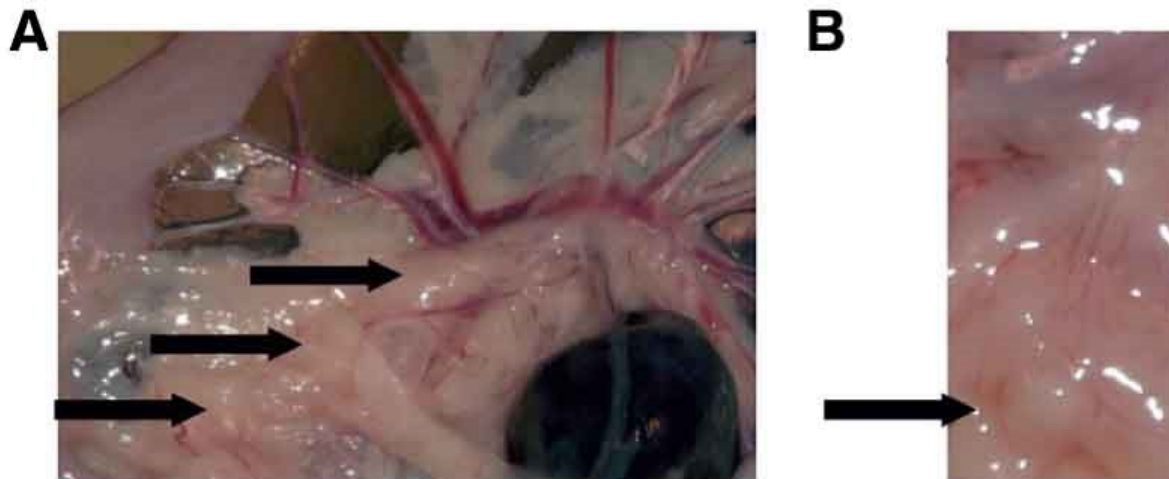
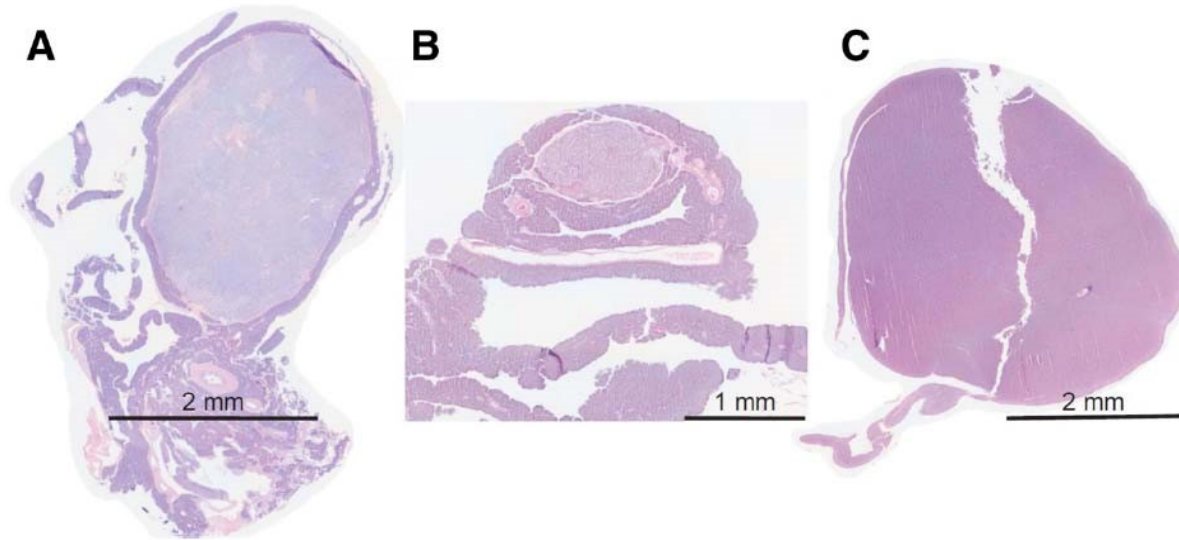


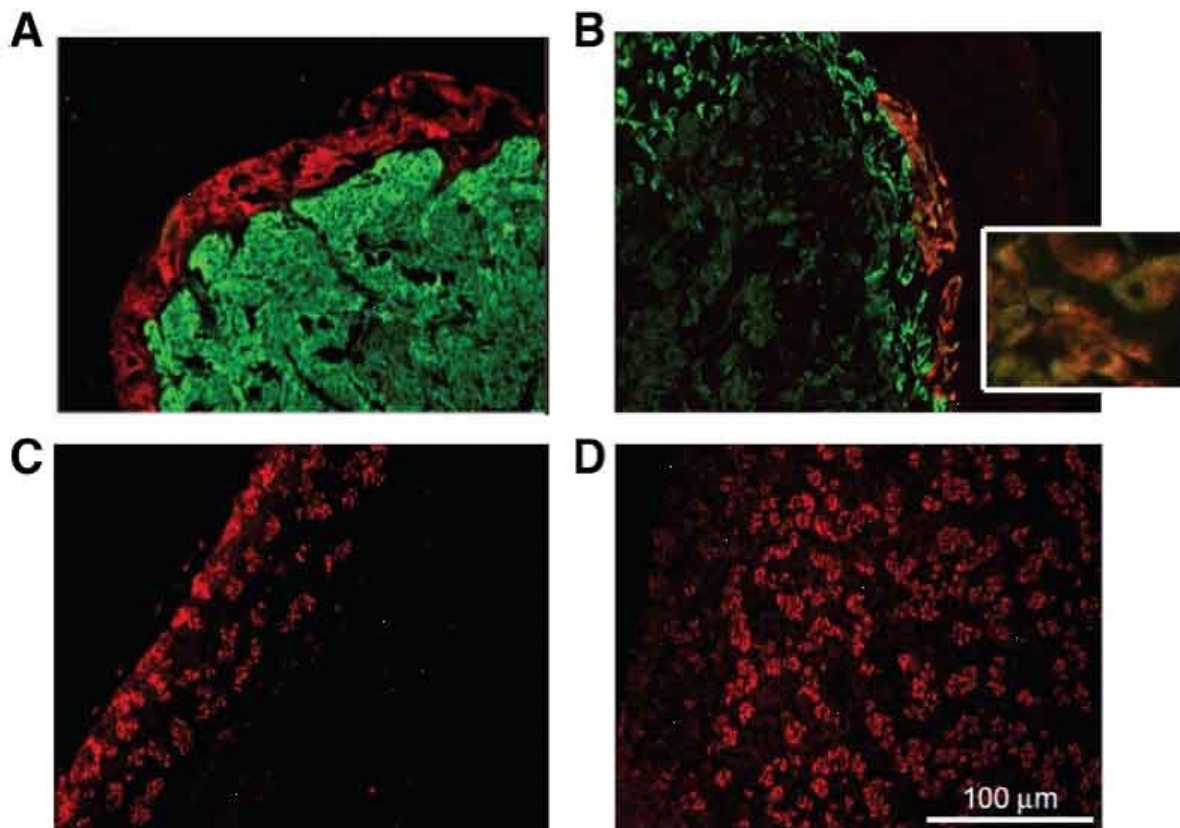
Figure 2 Microscopic features of excised nodules from the pancreas (HEPS stain). **A.** Principal islet. **B.** Smaller islets embedded in exocrine tissues. **C.** Exocrine nodule from an Atlantic wolffish.



Immunohistochemistry and special stains

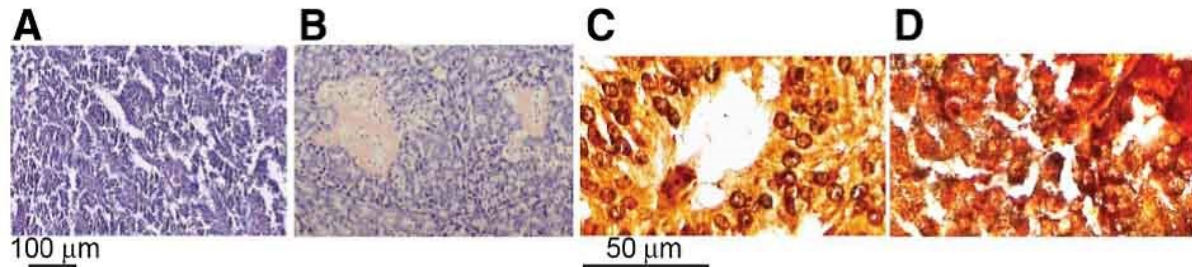
Using immunofluorescence with an antibody against insulin, (Figure 3A) a large number of β cells were observed. The elliptical β cells were found in most parts of the nodular islet not just on the periphery of the nodule. Other islet cells stained immunocytochemically positive for glucagon (Figure 3B). The α cells (glucagon containing) were confined to the periphery of the nodular islet encircling the β cells located in the center. Infrequently, glucagon-containing cells were noticed in the center of the nodule. Interestingly, IAPP was found at the periphery of the islet tissue and did not co-localize with insulin (Figure 3A). Instead, IAPP co-localized in α cells containing glucagon (Figure 3B).

Figure 3 Histological sections of the pancreatic nodules with immunoreactivity to the pancreatic hormones of Atlantic wolffish. **A.** Insulin (green) and IAPP (red) in the endocrine tissue. **B.** Glucagon (green) and IAPP (red) in the endocrine tissue. **C.** Chromogranin A surrounding the endocrine nodules. **D.** The exocrine nodule with immunoreactivity to chromogranin A was isolated from an Atlantic wolffish.



Several islet nodules were surrounded by exocrine tissue. The exocrine cells were immunoreactive with chromogranin A (Figure 3C). One nodule of exocrine tissue occurred and immunoreacted positively with the antibody targeting chromogranin A (Figure 3D). None of the antibodies against somatostatin, pancreatic polypeptide or synaptophysin reacted with islet tissue. When standard controls were carried out, negative immunofluorescence occurred consistently in all experiments. Noteworthy, Congo red and Gimelius staining of the islet cells from Atlantic wolffish were negative (Figure 4) for amyloid or neuroendocrine cells respectively.

Figure 4 Congo red and Grimelius staining of the islet cells from an Atlantic wolffish. Congo red: **A.** Atlantic wolffish. **B.** Positive control from a feline pancreatic tissue with islet amyloidosis. Grimelius: **C.** Atlantic wolffish. **D.** Positive control from a canine adrenal tumor.



DNA sequence of *Anarhichas* IAPP and in silico analysis

We isolated DNA of teleost fish to amplify and sequence the IAPP gene, and compared it to other species. PCR of DNA from the Atlantic wolffish resulted in a band of 120 base pairs. The amino acid sequence translated after the sequencing reaction is shown in Table 1. *Anarhichas* IAPP DNA is very different among the mammals and other teleost fish. The amino acid at position 19, 20 and 33 are highly conserved among the teleost fish. The IAPP amino acid sequences from all teleost fish are devoid of the GAILS region (amino acid positions 24-28) found in mammals IAPP amino acid sequences. The amino acid sequence GAILS contributes in part to the fibrillization process of IAPP. Two proline residues were found in the IAPP amino acid sequences of the Atlantic wolffish and the zebrafish, but not in Atlantic salmon or daddy sculpin.

Table 1 Identification of the 37 amino acids of IAPP using PCR and sequencing. The amino acid sequences of teleost fish are compared to the amyloidogenic (human, cat) or non-amyloidogenic (rat) sequences. Sequences from species written in italics were obtained from published work (Westermarck et al. 2002). The Agg parameters were obtained using the Tango algorithm. The dark amino acids represent amino acid variations between species.

	1	10	20	30	Agg Segment 19-34
Human	K C N T A T C A T Q R L A N F L V H S S N N F G A I L S S T N V G S N T Y				23
Cat	K C N T A T C A T Q R L A N F L I R S S N N L G A I L S P T N V G S N T Y				9
Rat	K C N T A T C A T Q R L A N F L V R S S N N L G P I L P P T N V G S N T Y				0
<i>Atlantic wolffish</i>			S S P S R S G I S P R N T Y G K		0
<i>Atlantic salmon</i>		T Q R L A D F L T R S S N T I G T V Y A P T N V G S			17
<i>Daddy sculpin</i>			S N S T I G T V N A P T N V G S		2
<i>Zebrafish</i>			T R S S S P I G T V N A P T N V G S		0

We compared the *in silico* potential of IAPP to form β -sheet precipitates, as expressed by the Agg parameter. The human IAPP amyloidogenic sequence has the highest Agg parameter. Among the mammals, the rat non-amyloidogenic IAPP sequence shows the lowest Agg parameter. Interestingly, the Atlantic wolffish and the zebrafish exhibit a null Agg parameter, and the daddy sculpin Agg parameter is lower than the rat. In contrast, the Atlantic salmon IAPP sequence reveals Agg parameter higher than the cat, though spontaneous islet amyloidosis has not yet been reported.

Discussion

The pancreatic islets in the Atlantic wolffish appear as a few grossly evident nodules embedded in pancreatic parenchyma, designated Brockmann bodies in other teleost species. These are the homologs of the islets of Langerhan as has been previously described in other teleost species [17]. According to the Grimelius staining, the pancreatic tissues did not contain neuroendocrine cells which precludes the islet nodule as the occurrence of a neuroendocrine tumor.

Demonstrated via immunofluorescence, the α cells (glucagon) occur at the periphery of the islet, and the β cells are distributed throughout the entire nodule. This distribution of islet cells is similar for other teleost species such as the daddy sculpin (*Cottus scorpius*) [4,18], gilthead sea bream (*Sparus auratus* L.) [19], swordtail (*Xiphophorus helleri* H.) [20] and rosy barb (*Barbus conchoni*) [21].

Antibodies against somatostatin, pancreatic polypeptide or synaptophysin did not react with nodular islet tissue, perhaps because the specific epitope does not occur in the Atlantic wolffish. Further research will be necessary to evaluate specific antibodies against teleostean proteins or clarify the affinity of current antibodies to each protein in teleostean fish. However, δ cells, which secrete somatostatin, are reported to be located near the β cells [18,19,22] and pancreatic polypeptide is found in the Brockmann bodies near the pylorus in other teleostean fish [18,21].

Chromogranin A was found in the exocrine pancreas and lining the connective tissue capsule of the pancreatic islet as previously reported with other teleostean fish [4,18-21]. Nodules or discrete areas consisting of a dense and compact mass of acinar cells were observed and was chromogranin-immunofluorescent, confirming an exocrine origin.

IAPP or amylin (the precursor to amyloid) was identified at the peripheral region of the islets for the Atlantic wolffish, co-localizing with glucagon. In contrast to these results in the Atlantic Wolffish, IAPP has been localized in endocrine pancreas of mammals, co-localizing with insulin within the β cells and centrally, but not peripherally in the islets of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) [11]. Amyloid was not found in the pancreatic tissues from the ten Atlantic wolffish.

IAPP has been previously isolated and characterized in three species of teleosts: zebrafish (*Danio rerio*), Atlantic salmon (*Salmo salar*) and daddy sculpin (*Myoxocephalus cottus scorpius*) [11,23]. The amino acid sequences are different for the daddy sculpin, Atlantic salmon, zebrafish and Atlantic wolffish (Table 1). Compared to mammals, the teleosts herein do not present the GAILS region (segment 24-28), which contributes to the amyloid formation in human and cats. The Atlantic salmon IAPP was shown to be amyloidogenic *in vitro* [11]. Interestingly, the Atlantic salmon Agg parameter was higher than

the cat IAPP segment 19-34, which is known to be amyloidogenic *in vivo*. The *in silico* analysis performed with the Tango algorithm revealed that the *Anarhichas* IAPP segment 19-34 was not prone to form amyloid fibrils. The Atlantic wolffish and the zebrafish have two proline residues in contrast to the other teleost fish which have only one residue. Proline residues are known to protect against fibril formation [10], thus their presence possibly explains the lowest Agg parameter obtained from the Tango algorithm in the Atlantic wolffish and the zebrafish. However, further research is needed to evaluate the potential of fish full-length IAPP to form amyloid deposits.

We confirmed the species-specific differences in the hormonal tissue distribution in teleost fish and demonstrated a unique distribution of IAPP in the Atlantic Wolffish. The presence of this difference in the population of cells secreting IAPP deserves further investigation. Previous phylogenetic analyses have shown that pancreatic peptides are relatively well conserved among vertebrates. However, the IAPP amino acid sequence differs among teleost fish. Our study shows that the Atlantic wolffish is devoid of amyloid *in vivo* and the segment 19-34 is non-amyloidogenic, according to the *in silico* secondary structure analysis. Amyloidosis of pancreatic islets would not be expected as a spontaneous disease in the Atlantic wolffish. The Atlantic wolffish thus could be a potential candidate to isolate the endocrine tissues for pancreatic xenografts. This study adds new insight in the characterization of fish pancreatic peptides whose physiological functions remain to be elucidated.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Diabète Québec foundation. Jessica S. Fortin was also recipient of a studentship from IRSC. We would like to thank Dr. Wong's collaboration (Biodome) for this study, and also Dr. Carl Gagnon and Dr. Josée Harel for access to their apparatus.

References

1. Ali S: Microvasculature of the Principal Islets in the Scorpion Fish, *Myoxocephalus Scorpius*. *Archivum Histologicum Japonicum* 1985, 48:363-371.

2. Nguyen TM, Wright JR Jr, Nielsen PF, Conlon JM: Characterization of the pancreatic hormones from the Brockmann body of the tilapia: implications for islet xenograft studies. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1995, 111:33-44.
3. Cutfield JF, Cutfield SM, Carne A, Emdin SO, Falkmer S: The isolation, purification and amino-acid sequence of insulin from the teleost fish *Cottus scorpius* (daddy sculpin). *Eur J Biochem* 1986, 158:117-123.
4. Falkmer S, Olsson R: Ultrastructure of the pancreatic islet tissue of normal and alloxan-treated *Cottus scorpius*. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1962, 39:32-46.
5. Conlon JM, Davis MS, Falkmer S, Thim L: Structural characterization of peptides derived from prosomatostatins I and II isolated from the pancreatic islets of two species of teleostean fish: the daddy sculpin and the flounder. *Eur J Biochem* 1987, 168:647-652.
6. Conlon JM, Falkmer S, Thim L: Primary structures of three fragments of proglucagon from the pancreatic islets of the daddy Sculpin (*Cottus scorpius*). *Eur J Biochem* 1987, 164:117-122.
7. Conlon JM, Schmidt WE, Gallwitz B, Falkmer S, Thim L: Characterization of an amidated form of pancreatic polypeptide from the daddy sculpin (*Cottus scorpius*). *Regul Pept* 1986, 16:261-268.
8. Cutfield SM, Carne A, Cutfield JF: The amino-acid sequences of sculpin islet somatostatin-28 and peptide YY. *FEBS Lett* 1987, 214:57-61.
9. Cutfield SM, Cutfield JF: A second glucagon in the pancreatic islets of the daddy sculpin *Cottus scorpius*. *Gen Comp Endocrinol* 1993, 91:281-286.
10. Westermark P, Andersson A, Westermark GT: Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiological reviews* 2011, 91:795-826.
11. Westermark GT, Falkmer S, Steiner DF, Chan SJ, Engstrom U, Westermark P: Islet amyloid polypeptide is expressed in the pancreatic islet parenchyma of the teleostean fish, *Myoxocephalus (cottus) scorpius*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2002, 133:119-125.

12. Intine RV, Olsen AS, Sarras MP Jr: A zebrafish model of diabetes mellitus and metabolic memory. *J Vis Exp* 2013, 72: e50232.
13. McGonnell IM, Fowkes RC: Fishing for gene function--endocrine modelling in the zebrafish. *J Endocrinol* 2006, 189:425-439.
14. Wright JR Jr, Pohajdak B, Xu BY, Leventhal JR: Piscine islet xenotransplantation. *ILARJ* 2004, 45:314-323.
15. Yang H, Dickson BC, O'Hali W, Kearns H, Wright JR Jr: Functional comparison of mouse, rat, and fish islet grafts transplanted into diabetic nude mice. *Gen Comp Endocrinol* 1997, 106:384-388.
16. Liu C, Koeberlein B, Feldman MD, Mueller R, Wang Z, Li Y, Lane K, Hoyt CC, Tomaszewski JE, Naji A et al: Accumulation of intrahepatic islet amyloid in a nonhuman primate transplant model. *Endocrinology* 2012, 153:1673-1683.
17. Falkmer S: Experimental diabetes research in fish. *Acta endocrinologica* 1961, Supplementum 37(Suppl 59):1-122.
18. Stefan Y, Falkmer S: Identification of four endocrine cell types in the pancreas of *Cottus scorpius* (Teleostei) by immunofluorescence and electron microscopy. *Gen Comp Endocrinol* 1980, 42:171-178.
19. Abad ME, Agulleiro B, Rombout JH: An immunocytochemical and ultrastructural study of the endocrine pancreas of *Sparus auratus L.* (Teleostei). *Gen Comp Endocrinol* 1986, 64:1-12.
20. Klein C, Lang RH: Principal cell types in the pancreatic islet of a teleost fish, *Xiphophorus helleri H.* *Cell Tissue Res* 1977, 176:529-551.
21. Rombout JH, Taverne-Thiele JJ: An immunocytochemical and electron-microscopical study of endocrine cells in the gut and pancreas of a stomachless teleost fish, *Barbus conchonioides (Cyprinidae)*. *Cell Tissue Res* 1982, 227:577-593.
22. Klein C, Van NS : Use of immunocytochemical staining of somatostatin for correlative light and electron microscopic investigation of D cells in the pancreatic islet of *Xiphophorus helleri H.* (Teleostei). *Cell Tissue Res* 1978, 194:399-404.

23. Martinez-Alvarez RM, Volkoff H, Cueto JA, Delgado MJ: Molecular characterization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) related peptides (CGRP, amylin, adrenomedullin and adrenomedullin-2/intermedin) in goldfish (*Carassius auratus*): cloning and distribution. *Peptides* 2008, 29:1534-1543.

