

Université de Montréal

Département de Chimie - Faculté des Arts et des Sciences

---

**Vers une compréhension des modes d'action des peptides  
impliqués dans la maladie d'Alzheimer sur des membranes  
modèles**

par

Mehdi Azouz

Thèse en cotutelle présentée à la

Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de

*Philosophiæ Doctor* (Ph.D.) en chimie

Jury

**Touria Cohen-Bouhacina**

Présidente

**Michel Lafleur**

Directeur de recherche

**Sophie Lecomte**

Codirectrice de recherche

**Pierre-Emmanuel Milhiet**

Rapporteur

**Maité Paternostre**

Rapporteuse

**Suzanne Giasson**

Examinatrice interne

**Vincent Raussens**

Examineur externe

Février 2020

© Mehdi Azouz, 2020

*« Savoir s'étonner à propos est le premier pas  
fait sur la route de la découverte. »*

Louis Pasteur

## Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est une neuropathologie complexe qui constitue la principale forme de démence chez l'être humain. Étroitement associée au vieillissement, elle se manifeste par une perte progressive de la mémoire et des fonctions cognitives. Avec 30 millions d'individus concernés au niveau mondial et des estimations voyant ce chiffre quadrupler d'ici 2050, elle constitue aujourd'hui une menace sociétale majeure. L'atrophie cérébrale observée chez les patients atteints de la MA est la conséquence d'un long processus de neurodégénérescence qui intervient au niveau moléculaire et s'amorce bien avant l'apparition des symptômes. Deux marqueurs histopathologiques ont été identifiés comme étant associés à ce processus : les plaques séniles, composées du peptide  $A\beta_{1-42}$  et les dégénérescences neurofibrillaires constituées de la protéine Tau. Ces deux molécules, considérées comme les protagonistes décisifs du développement de la MA, concentrent les recherches afin de mieux comprendre leurs rôles dans le processus neurodégénératif et pouvoir mettre en place des solutions thérapeutiques, inexistantes à ce jour.

Un des axes de recherche majeurs se focalise sur l'interaction de ces molécules avec la membrane plasmique. L'occurrence d'un tel phénomène pourrait potentiellement être en cause dans la mort neuronale s'il s'avérait délétère. Il est donc capital d'étudier en détail ces processus afin d'identifier les facteurs qui pourraient conduire  $A\beta_{1-42}$  et Tau à endommager l'intégrité des membranes. De nombreux travaux ont démontré que certains lipides pouvaient promouvoir ces interactions. Cependant, les conclusions sont parfois divergentes et un consensus commun reste à trouver quant à leurs rôles.

Ce travail de thèse s'est consacré à l'étude des modes d'action du peptide  $A\beta_{1-42}$  et d'un fragment clé de la protéine Tau, le peptide K18, sur des membranes modèles, en se focalisant principalement sur l'influence de certains lipides. Afin d'élucider les mécanismes qui régissent ces phénomènes, les processus de solubilisation membranaire ont dans un premier temps été étudiés avec des molécules amphiphiles bien caractérisées : les détergents. Cette étude a permis d'établir que les phénomènes de solubilisation membranaire peuvent varier en fonction de la composition membranaire et démontrer de la sélectivité lors de l'extraction lipidique.

Le cœur du projet était de visualiser les effets des peptides amyloïdes  $A\beta_{1-42}$  et K18 sur des modèles membranaires, les bicouches supportées, avec pour principale technique d'investigation la microscopie à force atomique. Elle nous a permis d'observer ces phénomènes *in situ*, en conditions physiologiques et à l'échelle sub-micrométrique. Nous avons pu montrer que la composition membranaire était un facteur pouvant moduler l'interaction avec  $A\beta_{1-42}$ . L'étude établit que les domaines lipidiques favorisent les perturbations membranaires induites par le peptide. Il est proposé que des défauts d'empilement lipidiques aux interfaces de ces domaines agissent comme des sites d'adsorption du peptide, menant à la destruction des membranes. En utilisant la même approche, avec des compositions lipidiques plus en adéquation avec la protéine Tau, nous avons pu observer que K18 induisait également des effets de perturbation en fonction de la nature des lipides dans la membrane et des propriétés qui leurs sont associées.

Dans les deux cas, nous montrons les effets délétères que peuvent induire ces peptides, qui se manifestent par des effets de solubilisation comparables à ceux des détergents et qui sont

dépendants de la composition des membranes. L'agrégation des peptides, qui peut conduire à leur fibrillation, n'a également été mise en évidence qu'en présence de lipides spécifiques.

Ce travail de thèse apporte de nouvelles informations sur l'importance des lipides et leurs capacités à pouvoir moduler les interactions avec les peptides A $\beta$ <sub>1-42</sub> et K18. Par extension aux membranes cellulaires, ces phénomènes pourraient potentiellement être associés aux processus neurodégénératifs complexes impliqués dans la MA.

Mots-clés: Maladie d'Alzheimer, membranes, lipides, peptides amyloïdes, solubilisation membranaire.

# Abstract

Alzheimer's disease is a complex neuropathological disorder that constitutes the prime form of dementia. Intimately related to ageing, it is associated to the gradual loss of memory and cognitive functions in individual suffering from the pathology. With nearly 30 million people concerned today, and the alarming trends predicting this figure to increase fourfold by 2050, Alzheimer's disease will constitute a major burden for our societies in the upcoming decades. The cerebral atrophy occurring within the brain results from slow and progressive neurodegenerative mechanisms triggered many years before the appearance of the first symptoms. Two histopathological markers have been identified as strongly associated to the neurodegeneration: the senile plaques, majorly composed of the amyloid peptide  $A\beta_{1-42}$ , and the neurofibrillary tangles, constituted of the abnormally phosphorylated form of Tau protein. These two molecules, hence considered as the main culprits of the disease, are therefore under the spotlight of researchers who try to better understand their respective roles in the neurodegeneration process and uncover therapeutic solutions to a still incurable disease.

One of the promising research axis is focusing on the interplay between these molecules and the plasma membrane as potential interactions could convincingly rationalize the neural cell deaths if they happened to be deleterious. Therefore, investigate these interactions in detail is of primary importance to identify the factors that might drive  $A\beta_{1-42}$  and Tau to cause damages on membranes. A strong body of evidences has demonstrated that certain lipids could promote these interactions and are then suspected to be involved into detrimental phenomena. However, numerous results appear to be contradicting and consensual conclusions are still lacking.

This PhD was dedicated to the investigation of the effects of  $A\beta_{1-42}$  and K18, a key peptide fragment of Tau protein, on membranes with a particular focus on the influence of lipids. The aim of this work was to elucidate the action mechanisms of these peptides. To first comprehend how membrane damages can be induced, we first focused on the solubilising ability of extensively used amphiphile agents: detergents. As a first study, we revealed that the membrane composition and the physicochemical properties of lipids play an important role in driving the solubilisation of the bilayer, a process that can even lead to a selectivity during the lipid extraction.

The core part of the project was to visualize the effects of the amyloid peptides  $A\beta_{1-42}$  and K18 on supported lipid bilayers, used as membrane models, using atomic force microscopy as an investigation technique. With its high spatial resolution and its ability to operate in physiological milieu, this approach has shown that the membrane composition could promote membrane disruption induced by  $A\beta_{1-42}$  oligomers in a lipid-dependent manner. More importantly, we propose that packing defects at the interface of membrane domains act as adsorption and nucleation sites leading to membrane damages.

Using the same strategy, we observed that K18 could also induce solubilisation phenomenon and demonstrated to be sensitive to the lipid nature.

In both cases, we have highlighted that these peptides could be detrimental to supported lipid bilayers and that their disruptive abilities, associated to detergent-like mechanisms, were intimately dependent of lipids. We also show that the aggregation, a phenomenon that can lead to the peptide fibrillation can only be triggered in presence of certain lipids.

This work provides important insights about the decisive role of the membrane composition in modulating interactions with the A $\beta$ <sub>1-42</sub> and K18. This interplay could constitute one of the numerous factors that promote neurotoxic phenomena, taking part in the complex neurodegenerative processes associated to Alzheimer's disease.

Key words: Alzheimer's disease, membranes, lipids, amyloid peptides, membrane solubilisation.

# Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iii</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>x</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des abréviations et des symboles.....</b>	<b>xix</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xxii</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1    La maladie d'Alzheimer : généralités et impacts de la démence.....	1
Avant-propos.....	1
1.1.1    Caractéristiques cliniques.....	2
1.1.2    Caractéristiques histopathologiques.....	3
1.1.3    Le peptide A $\beta$ .....	4
1.1.4    La protéine Tau .....	11
1.1.5    L'intime relation entre A $\beta$ <sub>1-42</sub> et Tau.....	14
1.2    Étudier l'origine de la toxicité : interactions avec les membranes.....	15
1.2.1    La membrane lipidique.....	15
1.2.2    Propriétés des membranes.....	17
1.2.3    Mécanismes de perméabilisation des membranes.....	24
1.2.4    Le rôle des lipides dans la maladie.....	25
1.2.5    Membranes biomimétiques : les différents modèles utilisés.....	27
1.3    Objectifs de la thèse.....	32
1.4    Les techniques d'étude utilisées .....	34
1.4.1    Titration calorimétrique isotherme.....	34
1.4.2    Microscopie à force atomique .....	35
1.4.3    Techniques de caractérisation de taille.....	39

1.5	Situation des articles à la date de dépôt du manuscrit .....	44
1.6	Références.....	45
<b>Chapitre 2 : Lipid selectivity in detergent extraction from bilayers .....</b>		<b>61</b>
2.1	Abstract.....	61
2.2	Introduction.....	62
2.3	Materials and methods.....	64
2.3.1	Materials.....	64
2.3.2	Preparation of large unilamellar vesicles and detergent suspensions.....	64
2.3.3	Isothermal titration calorimetry.....	64
2.3.4	Lipid efflux analysis.....	65
2.4.	Results and discussion.....	66
2.4.1	Determination of the detergent critical micellar concentrations .....	66
2.4.2	Construction of the phase diagrams .....	66
2.4.3	Analysis of detergent selectivity for lipids.....	71
2.5	Conclusions.....	74
2.6	Conflicts of interest.....	74
2.7	Acknowledgements.....	74
2.8	References.....	74
2.9	Supplementary material.....	78
<b>Chapitre 3 : Membrane domain modulation of A<math>\beta</math><sub>1-42</sub> oligomer interactions with supported lipid bilayers : an atomic force microscopy investigation .....</b>		<b>80</b>
3.1	Abstract.....	80
3.2	Introduction.....	81
3.3	Materials and methods.....	83
3.3.1	Materials.....	83
3.3.2	ThT fluorescence spectroscopy.....	83
3.3.3	Preparation of small unilamellar vesicles.....	84



3.3.4	Preparation of supported lipid bilayers .....	84
3.3.5	Peptide addition.....	84
3.3.6	Atomic force microscopy .....	84
3.4.	Results.....	85
3.4.1	Effects of the peptides on pure POPC bilayers .....	85
3.4.2	Effects of the peptides on POPC/cholesterol bilayers (90/10).....	87
3.4.3	Effects of the peptides on POPC/GM1 bilayers (90/10).....	88
3.4.4	Effects of the peptides on DOPC/DPPC/cholesterol bilayers.....	91
3.4.5	Effects of the peptides on DOPC/SM/cholesterol bilayers .....	92
3.5	Discussion.....	93
3.6	Conclusions.....	98
3.7	Conflicts of interest.....	99
3.8	Acknowledgements.....	99
3.9	References.....	99
3.10	Supplementary material.....	106
<b>Chapitre 4 : Tau protein fragment K18 peptide interactions with membranes : the role of lipids.....</b>		<b>107</b>
4.1	Abstract.....	107
4.2	Introduction.....	108
4.3	Materials and methods.....	110
4.3.1	Materials.....	110
4.3.2	Peptide production.....	110
4.3.3	Preparation of the lipid suspensions.....	111
4.3.4	Preparation of the supported lipid bilayers and addition of K18.....	111
4.3.5	Atomic force microscopy .....	112
4.3.6	Fluorescence assays.....	112
4.4	Results.....	112

4.4.1	Effects of K18 on SLB containing zwitterionic lipids.....	113
4.4.2	Effects of K18 on SLB containing anionic lipids.....	118
4.5	Discussion.....	121
4.5.1	K18 solubilizes zwitterionic fluid phases in SLB .....	121
4.5.2	Negatively charged lipids promote K18 aggregation onto the SLB.....	122
4.6	Conclusions and perspectives.....	124
4.7	Conflicts of interest.....	124
4.8	Acknowledgements.....	124
4.9	References.....	125
4.10	Supplementary material.....	130
<b>Chapitre 5 : Microfluidic diffusional sizing probes lipid nanodiscs formation and nanodiscs/peptide interactions .....</b>		<b>131</b>
5.1	Abstract.....	131
5.2	Introduction.....	132
5.3	Materials and methods.....	136
5.3.1	Materials.....	136
5.3.2	Preparation of SMA (3:1).....	136
5.3.3	Preparation of the lipid suspensions.....	136
5.3.4	Production and purification of K18 peptide.....	137
5.3.5	Negative staining for transmission electron microscopy.....	137
5.3.6	Microfluidic diffusional sizing.....	138
5.3.7	Peptide/nanodisc interactions.....	138
5.4	Results & discussion.....	138
5.4.1	Protocol setup for lipid detection by MDS.....	138
5.4.2	Validation of lipid detection by MDS .....	140
5.4.3	Peptide/nanodisc interactions.....	145
5.5	Conclusions.....	146

5.6	Conflicts of interest.....	147
5.7	Acknowledgements.....	147
5.8	References.....	148
5.9	Supplementary material.....	152
<b>Chapitre 6 : Conclusions générales.....</b>		<b>153</b>
6.1	Conclusions.....	153
6.2	Perspectives .....	157
6.3	Références.....	158

## Liste des tableaux

<b>Table 2.1</b> - CMC values for each detergent as measured with ITC at 28 °C.....	66
<b>Table 2.2</b> - Phase boundaries associated data for the three compositions with each detergent. .....	70
<b>Table 5.1</b> - Comparative table of $R_{\text{sat}}$ and $R_{\text{sol}}$ values for SMA (3:1) driven solubilisation of different lipids or mixtures.....	143

## Liste des figures

- Figure 1.1** - Image d'une coupe de cerveau (hippocampe) démontrant la présence de plaques amyloïdes (flèches violettes) et de dégénérescences neurofibrillaires (flèches bleues). Les lésions ont été mises en évidence grâce à des marquages par anticorps. La barre d'échelle est de 10  $\mu\text{m}$ . Image reprise et modifiée avec permission de [25]..... 4
- Figure 1.2** - Représentation des deux voies de clivages de l'APP en bleu (le segment en rouge représente la séquence donnant lieu à la formation des peptides  $A\beta$ ). La voie non-amyloïdogène met en jeu l' $\alpha$  puis la  $\gamma$ -sécrétase pour former le fragment APP  $s\alpha$ , le peptide P3 et le domaine intracellulaire de la protéine précurseure amyloïde (AICD). La voie amyloïdogène met en jeu la  $\beta$  puis la  $\gamma$ -sécrétase et mène à la production de l'APP  $s\beta$  puis des peptides  $A\beta$  et de l'AICD. .... 6
- Figure 1.3** - Séquence du peptide  $A\beta_{1-42}$ . Les acides aminés en rouge représentent les régions hydrophobes de la séquence du peptide. .... 7
- Figure 1.4** - Profil de fibrillation du peptide  $A\beta_{1-42}$ ..... 8
- Figure 1.5** - Représentation de la structure cross  $\beta$ . **A)** et **B)** montrent respectivement l'association parallèle ou antiparallèle des brins peptidiques, **C)** représente le profil de diffraction de rayons X caractéristique des fibres amyloïdes telles que celles d' $A\beta_{1-42}$  (non orientées). **D)** est une représentation conceptuelle de l'assemblage des peptides sous forme de feuillets  $\beta$  parallèles..... 9
- Figure 1.6** - Structuration des fibres du peptide  $A\beta_{1-42}$  : **A** et **B** sont des images de microscopie électronique à transmission de fibres (coloration négative). **C** et **D** sont des modèles atomiques des chaînes peptidique formant des dimères au sein de la fibre organisée en feuillets  $\beta$  parallèles **D**. Images reproduites avec permission de [55]..... 10
- Figure 1.7** - Séquences des isoformes de Tau. Figure reprise avec permission de [94]..... 12
- Figure 1.8** - Structuration des fibres de Tau dans les PHF. **A** est une image de microscopie électronique à transmission de fibres (en coloration négative). **B** est une représentation tridimensionnelle des PHF et **C** est un modèle atomique des chaînes peptidiques de Tau, organisées en dimères et constituant la fibre en feuillets  $\beta$  parallèles. **D** représente la séquence des quatre unités de répétition formant au total huit brins  $\beta$  et **E**, leur répartition tridimensionnelle en feuillets  $\beta$ . Images reproduites avec permission de [106]..... 14

<b>Figure 1.9</b> - Diagramme illustrant la chronologie des étapes clés de la cascade amyloïde déclenchées par les oligomères du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> . Nous nous focalisons particulièrement sur les encadrés en rouge sur le diagramme. Figure reprise et traduite avec permission de [111].	15
<b>Figure 1.10</b> - Structure de la membrane plasmique selon le modèle de la mosaïque fluide. Figure reprise avec permission et modifiée de [119].	16
<b>Figure 1.11</b> - Représentations conceptuelles d'un lipide (phosphatidylcholine) à gauche et d'une bicouche lipidique assemblée en phase aqueuse à droite.	17
<b>Figure 1.12</b> - Structures moléculaires de la 1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -glycéro-phosphocholine (POPC), de la 1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -glycéro-phosphoéthanolamine (POPE), du 1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -glycéro-phosphoglycérol (POPG), de la 1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -glycéro-phospho-L-sérine (POPS) et d'un phosphatidylinositol (PIP <sub>2</sub> ).	18
<b>Figure 1.13</b> - Structures moléculaires de la sphingomyéline et du GM1.	19
<b>Figure 1.14</b> - Structure moléculaire du cholestérol.	20
.....	21
<b>Figure 1.15</b> - Structures des autoassemblages prédites par le paramètre d'empilement P. Figure reprise avec permission et modifiée de [140].	21
<b>Figure 1.16</b> - Représentations conceptuelles des phases L $\beta$ (gel), l <sub>d</sub> (liquide désordonnée) au-dessus de la température de transition de phase T <sub>M</sub> et l <sub>o</sub> (liquide ordonnée) en présence de cholestérol. Sous l'effet du cholestérol, la phase gel a donc tendance à se fluidifier alors que la phase liquide désordonnée se rigidifie. Figure modifiée de [145].	23
<b>Figure 1.17</b> - Représentations des potentiels mécanismes de perturbation membranaire par les peptides amyloïdes. Figure reprise avec permission de [80].	25
<b>Figure 1.20</b> - Schéma d'une bicouche lipidique supportée. L'épaisseur de la bicouche est généralement de l'ordre de 4 nm alors que la fine couche d'hydratation qui la sépare de la surface solide fait de 1 à 2 nm.	29
<b>Figure 1.21</b> - Les différentes étapes menant à la formation de bicouches supportées par étalement de vésicules. Figure reprise avec permission de [200].	31
<b>Figure 1.22</b> - Représentation schématique d'un calorimètre ITC.	34
<b>Figure 1.23</b> - Exemple d'un thermogramme ITC (dosage de liposomes par un détergent cationique). Chaque pic correspond à une injection.	35
<b>Figure 1.24</b> - Principe de fonctionnement de l'AFM. <b>A)</b> est une représentation schématique du principe de fonctionnement de l'AFM et <b>B)</b> , un diagramme illustrant les variations de forces en fonction de la distance entre la pointe et la surface. Images reprises et modifiées avec permission de [221] et de [222] respectivement.	37

<b>Figure 1.25</b> - Représentation des principes de fonctionnement du mode contact (A) et du mode contact intermittent (B) sur une membrane. Image reprise avec permission de [227].....	38
<b>Figure 1.26</b> - Illustration d'une courbe de force lors d'un cycle d'approche-retrait obtenue avec le mode PFT. Image reprise et modifiée avec permission de [228].....	39
<b>Figure 1.27</b> - Représentation schématique d'un appareil de DLS.....	40
<b>Figure 1.28</b> - Illustration de l'influence de la taille sur la variation de l'intensité diffusée et sur la fonction d'autocorrélation G en DLS.....	41
<b>Figure 1.29</b> - Principe de fonctionnement de la MDS. A) représente schématiquement le trajet que parcourent les particules dans les canaux et B) montre le type de plaquettes microfluidiques utilisée durant une expérience de MDS. Figures reprises et modifiées avec permission de [234]. C) représente le signal typique délivré par la MDS. La valeur des intensités de fluorescence aux plateaux permet de déterminer le rayon hydrodynamique moyen des objets d'intérêt.....	43
<b>Figure 2.1</b> - Solubilisation of POPC vesicles (4 mM) titrated with TX (100 mM) at 28 °C as monitored by ITC. Typical differential heating power ( $\Delta p$ ) profile recorded as a function of time during a solubilisation experiment of POPC LUVs suspension with TX (A). Differential enthalpy of reaction ( $\Delta H$ ) as a function of the TX/POPC molar ratios (B). Vertical dashed lines represent the range limits of the vesicle/micelle coexistence range. Composition-phase diagrams for POPC/TX (C), POPC-POPG/TX (D), and POPC-POPE/TX (E). The green symbols on the graphs correspond to the selected coordinates for the extraction analysis.....	68
<b>Figure 2.2</b> - Solubilisation of POPC vesicles (4.2 mM) titrated by DTAC (100 mM) at 50 °C as monitored by ITC. Typical differential heating power ( $\Delta p$ ) profile recorded as a function of time during a solubilisation experiment of POPC LUVs by DTAC (A). Differential enthalpy of reaction ( $\Delta H$ ) recorded as a function of the POPC/DTAC molar ratios (B). Vertical dashed lines represent the range limits of the vesicle/micelle coexistence range. Composition-phase diagrams for POPC/DTAC (C), POPC-POPG/DTAC (D) and POPC-POPE/DTAC (E). The green symbols on the graphs correspond to the selected coordinates for extraction analysis..	69
<b>Figure 2.3</b> - Solubilisation of POPC vesicles (4.2 mM) titrated by SDS (100 mM) at 60 °C as monitored by ITC. Typical differential heating power ( $\Delta p$ ) profile recorded as a function of time during a solubilisation experiment of POPC LUVs by SDS (A). Differential enthalpy of reaction ( $\Delta H$ ) recorded as a function of the POPC/SDS molar ratios (B). Vertical dashed lines represent the range limits of the vesicle/micelle coexistence range. Composition-phase diagrams for POPC/SDS (C), POPC-POPG/SDS (D) and POPC-POPE/SDS (E). The green symbols on the graphs correspond to the selected coordinates for extraction analysis.....	70

**Figure 2.4** - Specific lipid extraction, as assessed by LC/MS, from POPC/POPE (60/40 mol/mol) vesicles with TX (A), with DTAC (B), and with SDS (C). The lipid and detergent concentrations were previously selected from the phase composition-diagrams (corresponding to the green symbols on **figures 2.1E, 2.2E and 2.3E**). Lipid extraction experiments were conducted in the same conditions than ITC: 28 °C for TX, 50 °C for DTAC and 60 °C for SDS. The results from vesicles without detergent have been included as a negative control. The extraction differences were found statistically significant using a t test with a 90 % confidence interval..... 72

**Figure 2.5** - Specific lipid extraction, as assessed by LC/MS, from POPC/POPG (60/40 mol/mol) vesicles with TX (A), with DTAC (B), and with SDS (C). The lipid and detergent concentrations were previously selected from the composition-phase diagrams (corresponding to the green symbols on **figures 2.1D, 2.2D and 2.3D**). Lipid extraction experiments were conducted in the same conditions than ITC: 28 °C for TX, 50 °C for DTAC and 60 °C for SDS. The results from vesicles without detergent have been included as a negative control. The extraction differences were found not statically significant using a t test with a 90 % confidence interval..... 73

**Figure 2S.1** - Enthalpograms of solubilisation (A) for POPC/POPG and (B) for POPC/POPE vesicles titrated by TX at 28 °C as monitored by ITC. The dashed lines represent the  $R_{sat}$  and  $R_{sol}$  transitions at which intersect the blue slopes..... 78

**Figure 2S.2** - Enthalpograms of solubilisation (A) for POPC/POPG and (B) for POPC/POPE vesicles titrated by DTAC at 50 °C as monitored by ITC. The dashed lines represent the  $R_{sat}$  and  $R_{sol}$  transitions at which intersect the blue slopes..... 78

**Figure 2S.3** - Enthalpograms of solubilisation (A) for POPC/POPG and (B) for POPC/POPE vesicles titrated by SDS at 60 °C as monitored by ITC. The dashed lines represent the  $R_{sat}$  and  $R_{sol}$  transitions at which intersect the blue slopes..... 79

**Figure 3.1** - AFM images (90 x 90  $\mu\text{m}^2$ ) of a pure POPC bilayer before (A), after 2 h (B) and 12 h (C) of incubation with 5  $\mu\text{M}$  of  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Graph D, E and F are the cross sections (bilayer depth vs. lateral distance) corresponding to the dashed line on image A, B and C respectively. Images G and H (7 x 7  $\mu\text{m}^2$ ) were recorded before peptide addition and after 12 h of incubation respectively..... 86

**Figure 3.2** - AFM images (90 x 90  $\mu\text{m}^2$ ) of a pure POPC bilayer 1 h before (A), right before peptide addition (B), after 2 h (C) and after 12 h (D) of incubation with 5  $\mu\text{M}$  of G37C. Graph E is the cross section corresponding to the dashed line on image F (10 x 10  $\mu\text{m}^2$ ), recorded after 4 hours of incubation with the peptide..... 87



**Figure 3.3** - AFM images ( $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC/cholesterol bilayer before peptide addition (A), after 2 h (B) and after 12 h (C) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Graphs D, E and F are the cross sections corresponding to the dashed line on images A, B and C respectively. Image G is a  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  image of one of the created defects..... 88

**Figure 3.4** - AFM images ( $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC/cholesterol bilayer before (A), after 2 h (B) and after 12 h (C) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of G37C. Images D and G ( $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}^2$ ) correspond to the bilayer morphology before peptide addition and after 2 h of incubation. The cross sections corresponding to the dashed line on images D and G are represented on graphs E and F. .... 88

**Figure 3.5** - AFM images ( $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC/GM1 bilayer before (A), after 2 h (B) and after 12 h (C) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of  $\text{A}\beta_{1-42}$ . The black arrows point to deposits and the holes subsequently formed. Graphs D, E and F are the cross sections corresponding to the dashed lines on images A, B and C respectively. .... 89

**Figure 3.6** - AFM images ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) of  $\text{A}\beta_{1-42}$  aggregates on the POPC/GM1 bilayer after 2 h (A), 4 h (B) and 8 h (C) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of the peptide. The blue arrows show the fibrils formed on the aggregates. Graphs D, E and F are the cross sections corresponding to the dashed lines on image A, B and C respectively. Image G ( $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$ ) displays the fibrils. Graph H corresponds to the dashed line on image G..... 90

**Figure 3.7** - AFM images ( $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC/GM1 bilayer before (A), after 2 h (B) and after 12 h (C) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of G37C. Images D and G ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) were recorded before peptide addition and after 2 h of incubation in the centre of the zone scanned on images A and B respectively. The cross sections corresponding to the dashed line on D and G are represented on graphs E and F. .... 90

**Figure 3.8** - AFM images of a DPPC/DOPC/cholesterol bilayer before (A), right after addition (B) and after a 2-hour incubation with of  $\text{A}\beta_{1-42}$  ( $5 \mu\text{M}$ ) (C). Images are  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  to clearly distinguish the phase separation. On image C, the blue arrows point to different zones where the peptide formed aggregates. The locations of the arrows were reproduced on images A and B. Graphs D, E and F represent the cross sections corresponding to the dashed line on images A, B and C respectively. .... 91

**Figure 3.9** - AFM images ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) of a DPPC/DOPC/cholesterol bilayer before (A), right after addition (B) and after 2 h (C) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of G37C. On image C, the blue arrows point to different zones where the peptide deposited and then formed aggregates. The

locations of the arrows were reproduced on images **A** and **B**. Graphs **D**, **E** and **F** represent the cross sections corresponding to the dashed line on images **A**, **B** and **C** respectively..... 92

**Figure 3.10** - AFM images ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) of a DOPC/SM/cholesterol bilayer before (**A**), after addition (10 minutes, **B**) and after 2-hour incubation with  $5 \mu\text{M}$  of  $\text{A}\beta_{1-42}$  peptide. On image **C**, the blue arrows point to different zones where the peptide deposited and then formed aggregates. The locations of the arrows were reproduced on images **A** and **B**. Graphs **D**, **E** and **F** are the cross sections corresponding to the dashed lines on images **A**, **B** and **C** respectively. .... 93

**Figure 3.11** - AFM images ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) of a DOPC/SM/cholesterol bilayer before (**A**), shortly after addition (10 minutes, **B**), and after 2 h (**C**) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of G37C. Graph **D** is the cross section corresponding to the dashed line on image **C**..... 93

**Figure 3S.1** - Thioflavin T fluorescence intensity variation as a function of time for  $\text{A}\beta_{1-42}$  (blue stars) and G37C peptides (orange triangles). Concentration was  $5 \mu\text{M}$  in a total volume of  $100 \mu\text{L}$  of buffer. .... 106

**Figure 3S.2** - AFM images ( $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ ): coalescence phenomenon as illustrated on the disappearance of defects on a POPC bilayer (**A**) and after 1 h (**B**), recorded on the same zone. Graphs **C** and **D** represent the cross sections corresponding to the dashed lines on images **A** and **B** respectively..... 106

**Figure 3S.3** - AFM images of the fibrils formed on the POPC/GM1 bilayer; magnifications are  $1.9 \times 1.9 \mu\text{m}^2$  (**A**) and  $650 \times 650 \text{nm}^2$  (**B**). .... 106

**Figure 4.1** - Structure of full-length Tau (**A**). Graph **B** represents ThT fluorescence assay curves obtained with K18 without (black) and in the presence (blue) of heparin sulfate (HS). **C** is a  $600 \times 600 \mu\text{m}^2$  AFM image of the K18 fibers formed in presence of heparin sulfate as a cofactor. .... 113

**Figure 4.2** - Effect of K18 on POPC SLB. AFM images of a pure POPC SLB before the addition of the peptide (**A** and **B**) and images of the exact same locations after a 2-hour incubation with  $1 \mu\text{M}$  of K18 (**E** and **F**). Left column:  $30 \times 30 \mu\text{m}^2$  and right column:  $3.3 \times 3.3 \mu\text{m}^2$ . Graphs **C**, **D**, **G** and **H** are the cross-sections corresponding to the blue dashed lines on **A**, **B**, **E** and **F** respectively..... 114

**Figure 4.3** - AFM images ( $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC SLB incubated with  $100 \text{ nM}$  of K18. Image **A** represents a residual defect in the SLB before the peptide addition. Images **B** to **I** were recorded every 10 minutes after the addition of K18..... 115

**Figure 4.4** - AFM images ( $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ ) of a DPPC supported lipid bilayer before (**A**) and after a 2-hour incubation with  $1 \mu\text{M}$  K18 (**B**). Graphs **C** and **D** represent the cross-sections corresponding to the blue dashed lines on **A** and **B** respectively..... 116

**Figure 4.5** - AFM images of a DOPC/DPPC bilayer (1:1). Images **A** and **B** ( $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ ) show the SLB before and after 2 hours with K18 ( $1 \mu\text{M}$ ). Image **C** displays the same area after 6 hours incubation at a higher magnification ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ). The red arrows point to thicker part of the DPPC-rich domains subsequent to the possible peptide insertion. Graphs **D**, **E** and **F** are the cross-sections corresponding to the blue dashed lines on **A**, **B**, and **C** respectively..... 117

**Figure 4.6** - AFM images of a DOPC/DPPC/cholesterol bilayer (1:1:1). Image **A** ( $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ ) displays the SLB and image **B** represents the  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  area framed on **A**. Image **C** is the same area, recorded after a 2-hour incubation with K18 ( $1 \mu\text{M}$ ). ..... 118

**Figure 4.7** - AFM images of a POPC/POPS bilayer (4:1). Images **A** ( $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ ) and **B** ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) show the SLB before incubation while images **E** and **F** represent the same locations after a 2-hour incubation with  $1 \mu\text{M}$  K18. The red arrows on **F** point at several aggregates that formed upon incubation. Graphs **C**, **D**, **G** and **H** are the cross-sections corresponding to the blue dashed lines on **A**, **B**, **E** and **F** respectively..... 119

**Figure 4.8** - AFM image ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC/PIP<sub>2</sub> bilayer (4:1). **B** is the cross section associated to the blue dashed line on image **A**..... 120

**Figure 4.9** - AFM images ( $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC/PIP<sub>2</sub> (4:1). Images **A**, **B** and **C** represent the SLB before, after 2 hours and after 4 hours incubation with K18 ( $1 \mu\text{M}$ ). Graphs **D**, **E** and **F** are the cross-sections corresponding to the blue dashed lines on **A**, **B**, **C** respectively..... 120

**Figure 4.10** - AFM images of the POPC/PIP<sub>2</sub> after a 6 h incubation with K18 ( $1 \mu\text{M}$ ). Image **A** ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) shows filiform structures, pointed out with red arrows. **B** is a zoomed image ( $3.1 \times 3.1 \mu\text{m}^2$ ) corresponding to the red frame on **A**. Image **C** is a higher magnification ( $900 \times 900 \text{nm}^2$ ) of the fibres. Graph **D** is the cross-section corresponding to the blue dashed line on **B**. ..... 121

**Figure 4S.1** - AFM images of the aggregation of K18 on mica. **A** ( $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ ) displays the mica imaged in buffer while **B** ( $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ ) is the same area after 2 hours of incubation with  $1 \mu\text{M}$  of K18. Image **C** ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) is the area framed on image **B**..... 130

**Figure 4S.2** - AFM images ( $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ ) of a DPPC supported lipid bilayer before (**A**) and after 2 hours incubation with  $1 \mu\text{M}$  K18 (**B**). Graphs **C** and **D** represent the cross-sections corresponding to the blue dashed lines on **A** and **B** respectively. **E** and **F** represent the reduced Young modulus maps over similar surface areas ( $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ ) and associated to **A** and **B** respectively. On **E**, mica appears brighter which indicates it is stiffer than the SLB while the

edges appear darker on **F** meaning they are softer. Young's modulus were determined using the Hertz model on the Nanoscope software..... 130

**Figure 5.1** - Scheme representing the flow of sample through a microfluidic chip during a MDS analysis on a Fluidity One instrument..... 139

**Figure 5.2** - Graph **A** represents a MDS measurement of POPC/POPE (9:1) LUVs. Graph **B** displays the MDS measurement of POPC/POPE (9:1) LUVs after solubilisation with excess SMA (3:1) ( $n_{\text{SMA}3:1}/n_{\text{Lipids}} > 5$ ). In blue, Channel A corresponds to the channel where the sample has been introduced while in red, channel B is the one where the sample has diffused..... 140

**Figure 5.3** - **A** and **B** are TEM images of LUVs of POPC/POPE (9:1). **C** is an image of the sample after addition of a solubilising excess SMA (3:1) ( $n_{\text{SMA}3:1}/n_{\text{Lipids}} > 5$ )..... 141

**Figure 5.4** - Particle diffusion ratio (blue full circles) and diameter (red full circles for MDS and empty circles for DLS) as a function of the molar ratio for **A**) POPC/POPE (9:1) and **B**) DMPC/DMPE (9:1). Horizontal blue and red error bars represent errors in lipid concentration determination. Vertical blue and red bars represent the standard deviation on the measurements ( $n \geq 2$ )..... 142

**Figure 5.5** - Hydrodynamic radius ( $R_H$ ) changes of K18 (1  $\mu\text{M}$ ) following a titration with increasing concentrations of POPC (black) and POPC/PIP<sub>2</sub> (80/20 mol%) (red) SMALPs. Each experiment was repeated three times to get statistical insight about the size variation upon SMALPs interaction..... 145

**Figure 5S.1** - MDS measurement of POPC/POPS (9:1) MLVs diffusion. In blue, Channel A corresponds to the channel where the sample has been introduced while in red, channel B is the one where the sample diffused..... 152

## Liste des abréviations et des symboles

Å : Ångstrom.

$a_0$  : surface efficace de la tête lipidique.

AD : maladie d'Alzheimer (*Alzheimer's disease*).

AFM : microscopie à force atomique (*atomic force microscopy*).

AFM-IR : microscopie à force atomique couplée à la spectroscopie infrarouge.

AICD : domaine intracellulaire de l'APP (*APP intracellular domain*).

ApoA1 : Apolipoprotéine A1.

APP : protéine précurseur de l'amyloïde (*amyloid precursor protein*).

ARN : acide ribonucléique.

A $\beta$  : peptides amyloïdes bêta.

B : bicouche (*bilayer*).

CMC : concentration micellaire critique (*critical micellar concentration*).

Ch : canal (*channel*).

D : coefficient de diffusion.

DLS : diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering*).

DOPC : 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine.

DPPC : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine.

DTAC : chlorure de n-dodécyltriméthylammonium (*dodecyltrimethylammonium chloride*).

DTT : dithiothréitol.

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique.

G37C : mutant oligomérique d'A $\beta_{1-42}$  (Glycine substituée par une Cystéine en position 37).

GUVs : vésicules unilamellaires géantes (*giant unilamellar vesicles*).

HDL : particules lipoprotéiques ou lipoprotéine de haute densité (*high density lipoprotein*).

Hepes : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthane sulfonique.

IAPP : polypeptide amyloïde Islet (*Islet amyloid polypeptide*).

ITC : titration calorimétrique isotherme (*isothermal titration calorimetry*).

K18 : peptide fragment de Tau.

$k_B$  : constante de Boltzmann.

$l_c$  : longueur critique de la chaîne lipidique.

LC/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (*liquid chromatography-mass spectrometry*).

$l_d$  : phase liquide désordonnée (*liquid-disordered phase*).

l<sub>o</sub> : phase liquide ordonnée (*liquid-ordered phase*).

LUVs : grandes vésicules unilamellaires (*large unilamellar vesicles*).

L<sub>β</sub> : phase gel.

M : micelle.

MA : voir AD.

MDS : analyse microfluidique de taille (*microfluidic diffusional sizing*).

MES : acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique.

MLVs : vésicules multilamellaires (*multilamellar vesicles*).

MP : protéine membranaire (*membrane protein*).

MSP : protéine d'échafaudage (*membrane scaffold protein*).

n<sub>0</sub> : viscosité du milieu.

NFT : dégénérescences neurofibrillaires (*neurofibrillary tangles*).

NMR : résonance magnétique nucléaire (*nuclear magnetic resonance*).

P : paramètre d'empilement.

PC : phosphatidylcholine.

PE : phosphatidyléthanolamine.

PF QNM : mode d'imagerie AFM PeakForce (*PeakForce Quantitative Nanomechanical*).

PG : phosphatidylglycérol.

PHF : filaments appariés en hélices (*paired helical filaments*).

PI : phosphatidylinositol.

PIP<sub>2</sub> : 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phospho-(1'-myo-inositol-4',5'-bisphosphate).

PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyle.

POPC : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine.

POPE : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine.

POPG : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoglycérol.

POPS : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phospho-L-sérine.

PrP : protéine prion.

Q<sub>R</sub> : chaleur de réaction.

R<sub>H</sub> : rayon hydrodynamique.

RMN : voir NMR.

SDS : dodécylsulfate de sodium (*sodium dodecyl sulfate*).

SLB : bicouche lipidique supportée (*supported lipid bilayer*).

SM : sphingomyéline.

SMA : poly(styrène-co-acide maléique) (*styrene-maleic acid*).

SMALPs : nanodisques formés à partir du SMA (*SMA lipid particles*).

SUVs : petites vésicules unilamellaires (*small unilamellar vesicles*).

T : température.

t : temps.

Tau : protéine Tau (*tubulin associated unit*).

TEM : microscopie électronique à transmission (*transmission electron microscopy*)

TERS : spectroscopie Raman exaltée par effet de pointe (*tip-enhanced Raman spectroscopy*).

ThT : thioflavine T.

$T_M$  : température de transition de phase (*melting temperature*).

Tris : tris(hydroxyméthyl)aminométhane.

TX : triton X-100 (polyéthylène glycol p-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)-phényl éther).

v : volume occupé par les chaînes lipidiques.

$\Delta H$  : variation d'enthalpie.

$\Delta p$  : puissance de compensation du calorimètre ITC.

$\lambda$  : longueur d'onde.

## Remerciements

A travers cette partie du manuscrit, je souhaiterais remercier les nombreuses personnes qui auront, de près ou de loin, fait partie de ce projet de thèse et qui lui ont, de manière directe ou indirecte, permis de se concrétiser.

Bien entendu, ma gratitude va en premier lieu à Sophie et Michel qui auront été les artisans de la conception du projet de thèse et qui, grâce à leur soutien et leur suivi essentiels, lui ont permis d'aboutir. Merci de m'avoir accueilli dans vos laboratoires pour m'initier à cette belle discipline qu'est la biophysique et enseigné vos connaissances dans ce domaine avec bienveillance et pédagogie. Cette expérience de thèse aura également été extrêmement enrichissante grâce à sa dimension internationale et aux nombreux congrès auxquels vous m'avez donné la chance de pouvoir participer pour présenter mes travaux.

Je remercierai ensuite le jury de thèse qui aura accepté d'évaluer ce travail. Merci à Pierre-Emmanuel Milhiet et Maïté Paternostre d'avoir révisé le manuscrit. J'exprime ma gratitude personnelle à Suzanne Giasson qui aura également évalué ce mémoire en plus d'avoir, aux côtés de Christian Pellerin au sein du comité de thèse, veillé au bon déroulement de la thèse. Mes sincères remerciements vont également à Touria Cohen-Bouhacina et Vincent Raussens.

Je tiens particulièrement à remercier Sarah Henry et Alexandre Therrien qui m'auront légué, à travers leurs travaux de thèse, une base de travail solide qui aura fortement contribué à la faisabilité et à l'aboutissement des travaux.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Isabel Alves et à Christophe Cullin pour leur sympathie et pour tous les échanges que nous avons pu avoir et qui m'auront permis de mieux cerner la nature des objets en jeu dans le projet. Je remercie également Christophe mais aussi Claude Bobo et Nad'ja Lepejova-Caudy pour m'avoir constitué un stock important de peptides amyloïdes.

Je tiens à remercier Patricia Moraille pour la pédagogie et la bonne humeur quotidienne avec lesquelles elle m'a appris à me servir d'un microscope à force atomique. Merci pour tous ces précieux conseils qui m'ont aidé à optimiser la préparation et la qualité de mes échantillons, à perfectionner mes protocoles et ma façon d'imager ces objets parfois capricieux que sont les bicouches supportées.

Un grand merci à Alexandre Ciaccafava, Cécile Feuillie et Michaël Molinari avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à échanger et collaborer durant la dernière année de thèse.



Merci à Etienne Harté et Sandrine Villette pour leur disponibilité et leur aide au niveau des laboratoires du CBMN ainsi qu'à Sylvain Essiembre à l'Université de Montréal.

J'ai également une pensée pour certains membres du CBMN et du corps enseignant du département de chimie de l'Université de Montréal avec lesquels les échanges m'auront permis de créer du lien avec mes travaux de thèse.

Je souhaiterais remercier les nombreux amis qui m'ont accompagné tout au long de ma scolarité. L'ordre chronologique veut que la fine équipe de l'IUT soit la première remerciée : Bonzom, Mialocq, Escur, Husson, Lleida et Bixaïba ; les amis de l'Université de Toulouse : Geoffrey, Camille, Alexandra, Faustin et Haïkel.

La liste est bien trop longue pour mentionner toutes les personnes de l'ENSCBP qui m'ont importé, j'espère que les vrais, notamment « les Canardos » ou le groupe des filles, se reconnaîtront. Merci à Didier qui m'a fait le plaisir d'imprimer le manuscrit (entre autres !).

De nombreuses personnes que j'ai eu la chance de côtoyer dans les laboratoires durant la thèse auront incarné un soutien important, ne serait-ce que pour l'empathie communiquée de nos parcours communs : Ghita, Willy, Olivier, Charly, Adrian, Oussama, Rim, Marion, Antoine, Antho, Estelle. Merci à vous pour toutes ces discussions entre les manip infructueuses.

D'autres personnes auront également contribué à mon épanouissement personnel en dehors des enceintes des laboratoires de recherche ; je nommerai particulièrement la « team Tulipe » qui a beaucoup compté pendant les deux années passées au Québec : Marco, Twagi, Alizée, Amal, Camille, Arthur, Antho et Kevin. Une pensée également pour mes colocataires montréalais : Ana, Antoine Clément et Achref.

De la reconnaissance envers les amis de longue date, si ce n'est de toujours, avec lesquels rien ne se perd au fil des années qui passent et qui nous ont pourtant vus grandir : Auré, Seb, Sam, Sylvain, Luc, Tristan, Matthieu.

Parce que tu as un peu subi le stress de la dernière année tout comme moi : merci à toi Carole d'avoir été là, d'avoir partagé avec moi tous ces bons moments qui m'auront permis de m'évader un peu en dehors du laboratoire et de garder le cap.

Leur place vient à la fin de cette partie mais leur importance aura sans nuls doutes été capitale pour l'aboutissement de la thèse. Du fond du cœur, un immense merci à ma mère qui m'a toujours motivé à aller de l'avant ; merci pour ton soutien indéfectible et les mots que tu as toujours su trouver pour m'aider à surmonter les moments difficiles. Cette thèse, c'est aussi ta récompense. Je remercie aussi et sincèrement ma sœur, mes frères et mon père.

# Chapitre 1 : Introduction

## 1.1 La maladie d'Alzheimer : généralités et impacts de la démence

### Avant-propos

Il y a un peu plus d'un siècle, Alois Alzheimer, psychiatre, médecin et neurologue allemand, décrivait pour la première fois les caractéristiques très singulières des symptômes qu'il avait observés chez une patiente âgée de 51 ans et atteinte d'une forme de démence particulière [1]. Sans doute ne s'imaginait-il pas, lorsqu'il exposa devant ses pairs en 1906, le bilan de ses études clinicopathologiques lors d'une conférence à Tübingen, que la maladie qui porte aujourd'hui son nom, serait considérée, plus de 100 ans après, comme étant l'une des préoccupations majeures de santé publique du 21<sup>ème</sup> siècle. Avec près de 30 millions de personnes atteintes de par le monde [2], dont 1,2 millions en France [3] et 600 000 au Canada [4], 10 millions de cas de démence sont diagnostiqués et reportés chaque année, les proportions françaises et canadiennes représentant 225 000 et 50 000 personnes de ces chiffres en 2019. D'ici 2050, 150 millions d'individus montreront les symptômes de la démence associée à la maladie d'Alzheimer (MA) ce qui fera peser un coût considérable sur nos sociétés au niveau mondial. Si l'on prend le cas des États-Unis, les coûts associés aux soins des patients atteints de la MA devraient atteindre 290 milliards de dollars en 2019 (environ 5,8 millions de personnes sont atteintes) ; ce chiffre avoisinera ~ 3 trilliards de dollars en 2050 (13,8 millions de personnes) [5]. En cause, la durée des soins médicaux qu'il faut apporter aux patients sur le long terme. Une personne diagnostiquée comme atteinte de la MA à l'âge de 65 ans vivra en moyenne entre 4 et 8 ans et passera près de 40 % de cette période dans la phase sévère de la démence, nécessitant une prise en charge spécialisée [6]. La MA, actuellement incurable [7], est donc une pathologie à laquelle apporter des solutions thérapeutiques constitue un enjeu sociétal majeur.

La complexité des mécanismes neurodégénératifs associés à cette forme de démence, dont l'origine est de toute évidence multifactorielle, rend cet objectif encore difficilement envisageable ; ces mécanismes nécessitent d'être investigués et corrélés au niveau fondamental. Dans ce projet de doctorat, je souhaitais apporter des éléments de réponses quant aux modes d'actions des différents protagonistes - peptides et protéines - impliqués dans la pathologie sur les membranes. Ce premier chapitre a pour but de définir le contexte de ce travail de thèse et d'établir mon approche scientifique pour comprendre ces modes d'action. Dans un premier

temps, je décrirai les aspects cliniques et pathologiques de la MA afin d'introduire les différents acteurs de son développement. Une seconde partie abordera l'importance de la membrane lipidique, de ses propriétés et de ce que nous connaissons actuellement de son implication dans la maladie. Le chapitre se termine par l'introduction des modèles membranaires et les techniques utilisées dans le cadre de ce projet. Le plan de la thèse sera ensuite exposé.

### 1.1.1 Caractéristiques cliniques

La MA est une forme de neuropathologie complexe qui, sur le plan clinique, constitue la forme de démence la plus répandue (60 à 80 % des cas [8]). Son développement est lent, progressif et ses effets sont irréversibles. En termes d'étiologie, de nombreux facteurs ont factuellement été identifiés comme étant favorables à l'apparition de la démence : un facteur génétique (lié au gène de l'Apolipoprotéine ApoE4 [9]), des facteurs liés à des maladies, des risques ou des antécédents cardiovasculaires (hypertension artérielle, diabète, accidents cardiovasculaires, hypercholestérolémie, obésité...) ou liés au mode de vie ou à l'environnement (consommation excessive d'alcool, tabagisme, privation de sommeil, dépression, pollution, empoisonnement avec certains métaux, consommation de certains médicaments...) [10, 11]. Les voies possibles d'infections virales et bactériennes sont également de plus en plus évoquées [12, 13]. Le facteur de risque majeur reste cependant le vieillissement puisque la MA ne se manifeste généralement chez l'humain qu'à partir de 60-65 ans. Passé cette tranche d'âge, la probabilité d'en démontrer les symptômes double tous les 5 ans. Chez les personnes de 85 ans et plus, près d'une personne sur trois démontre les signes de la démence [7] ; l'âge est donc l'indicateur qui se corrèle le mieux avec l'apparition des symptômes de la MA. Il existe néanmoins des cas précoces où ces symptômes peuvent se manifester dès l'âge de 30 ans mais ils font partie de l'exception que représente la forme dite « familiale » de la maladie. Liée à l'hérédité, elle est transmise par voie autosomale [9] et concerne moins de 1% des cas. Les mutations liées à l'hérédité, qui représentent des cas rares, ont cependant permis d'en apprendre beaucoup sur les origines de la neurodégénérescence.

La MA est majoritairement sporadique : plus de 99 % des personnes atteintes par la démence la développent sans qu'il ne soit établi de lien avec des antécédents familiaux. La manifestation des symptômes associés à la neurodégénérescence est progressive et dure généralement entre 7 et 10 ans, le dernier stade se soldant inévitablement par la mort du patient. Les signes préliminaires du développement de la démence sont souvent des troubles cognitifs plus ou moins importants : difficulté à résoudre des problèmes, pertes d'attention et de mémoire immédiate. L'ensemble de ces symptômes n'est pas forcément perçu comme un indicateur

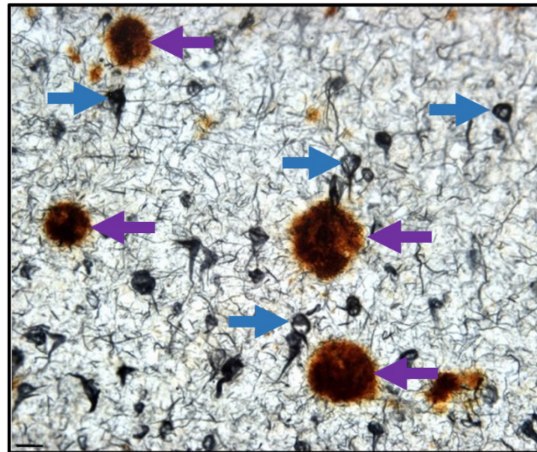
précurseur de la maladie mais souvent comme une conséquence normale du vieillissement. La démence commence explicitement à se manifester lors d'un premier stade (dit « léger ») qui dure généralement de 2 à 5 ans et au cours duquel l'individu démontre des signes de perte de mémoire plus importants, allant généralement au-delà du niveau d'informations immédiates et pouvant affecter des événements appartenant aux moyen et long termes. Se manifestent également des difficultés à réaliser des tâches modérément complexes ainsi que des troubles du comportement tels que des sautes d'humeur ou de la dépression. Le deuxième stade de démence, dit « modéré », qui dure 2 à 4 ans, est marqué par des troubles de la mémoire plus importants qui peuvent affecter significativement le mode de vie, entraînant ainsi des pertes d'indépendance au niveau de la réalisation des tâches quotidiennes et un besoin d'assistance. Au cours du stade suivant, caractérisé de « démence sévère », l'individu est devenu totalement dépendant, nécessite une assistance spécialisée pour l'ensemble des tâches quotidiennes et peut présenter des troubles majeurs de la personnalité. Enfin, la phase terminale du processus neurodégénératif est caractérisée par un état quasi végétatif du patient devenu inapte à communiquer, à se déplacer ou à se nourrir. Le système immunitaire étant souvent très affaibli à ce stade et les infections, notamment pulmonaires telles que la pneumonie, sont des causes de décès courantes des patients atteints de la MA [14].

### 1.1.2 Caractéristiques histopathologiques

D'un point de vue physiopathologique, la MA est associée au développement de lésions intracrâniennes dans des régions associées à la cognition et la consolidation de la mémoire dans le cerveau. La présence de ces lésions est corrélée à une importante atrophie cérébrale résultant de la dégradation progressive de certaines populations de synapses et de neurones. Cette atrophie suit une progression spatio-temporelle et se manifeste initialement dans le cortex entorhinal, se propageant ensuite dans l'hippocampe, dans les cortex temporal et frontal, pour finalement affecter la totalité du volume cérébral. La formation de ces lésions est aujourd'hui considérée comme étant la cause la plus probable du processus neurodégénératif même si cette théorie est encore parfois contestée. En effet, l'étendue des phénomènes d'agrégation dans le cerveau, soit la présence et la quantité des lésions observées après autopsie, n'est pas forcément corrélée à la gravité des symptômes. Ceci laisse penser que des phénomènes concourants, de nature inflammatoire notamment, peuvent également survenir en parallèle de la formation de ces dépôts protéiques [15, 16]. Ces lésions constituent néanmoins des marqueurs histopathologiques importants de la MA [17-20]. Deux types de dépôts protéiques sont typiquement observés :

- \* les plaques séniles, ou plaques amyloïdes, qui constituent des dépôts sphériques dans le milieu extracellulaire et sont majoritairement composées du peptide A $\beta$  [21, 22].
- \* les dégénérescences ou enchevêtrements neurofibrillaires (ou NFT, pour *neurofibrillary tangles* en anglais) que l'on retrouve dans la partie centrale des neurones, des axones et des dendrites du néocortex et de l'hippocampe [23]. Elles sont principalement constituées d'isoformes de la protéine Tau anormalement hyperphosphorylées [17, 24].

Ces deux marqueurs histopathologiques sont représentés à la **figure 1.1**.



**Figure 1.1** - Image d'une coupe de cerveau (hippocampe) démontrant la présence de plaques amyloïdes (flèches violettes) et de dégénérescences neurofibrillaires (flèches bleues). Les lésions ont été mises en évidence grâce à des marquages par anticorps. La barre d'échelle est de 10  $\mu$ m. Image reprise et modifiée avec permission de [25].

A noter que l'accumulation protéique à l'origine de la formation de ces marqueurs débiterait bien avant l'apparition des premiers symptômes (10 à 20 ans) [26-28]. Leur formation résulte de l'agrégation et de la lente accumulation de matériel protéique : le peptide A $\beta$  et la protéine Tau. Pour comprendre les origines de ces phénomènes, il est essentiel de s'intéresser à la nature de ces molécules et aux facteurs qui conduisent à leur agrégation.

### 1.1.3 Le peptide A $\beta$

Le lien entre le peptide A $\beta$  et la pathologie a réellement été établi lorsque les plaques amyloïdes, identifiées lors des diagnostics post-mortem réalisés par Alois Alzheimer mais caractérisées comme étant bel et bien des structures histopathologiques dans les années 1960, ont été purifiées et analysées biochimiquement dans les années 1980 [21, 22]. Bien que de composition complexe, ces plaques sont majoritairement constituées de peptides de nature similaire, dont le poids moléculaire moyen est d'environ 4 kDa et présentent un repliement spécifique en feuillets  $\beta$ . Ces peptides ont d'abord été appelés, en raison de leur caractère amyloïde, « *amyloid  $\beta$ -protein* », puis « A $\beta$  » par contraction [21]. Ils ont en effet tendance à

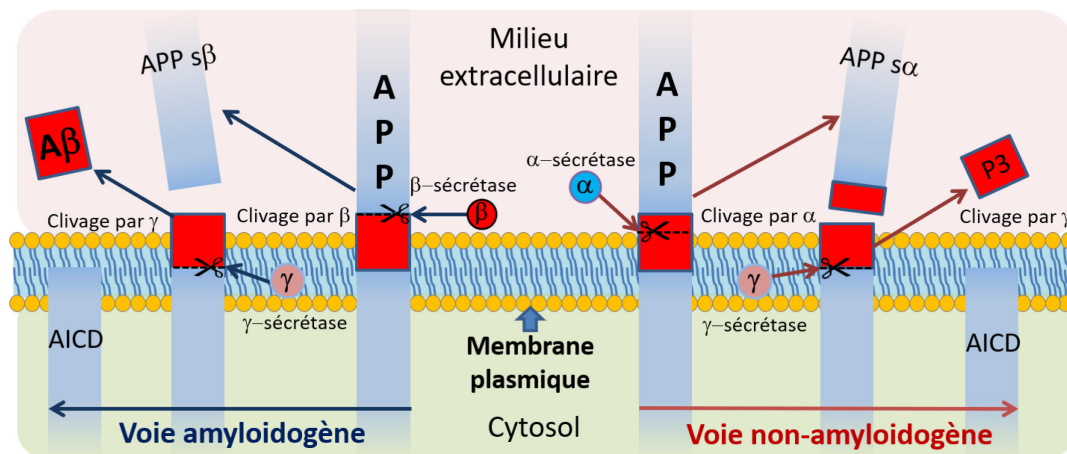
former des fibres via un processus d'autoassemblage résultant d'un changement conformationnel de leur chaîne peptidique en feuillet  $\beta$ . Ce phénomène de repliement anormal (*misfolding* en anglais) est en lien avec le développement d'autres maladies, neurodégénératives notamment, et est considéré comme étant à la base d'un mécanisme pathogène commun [29, 30]. Depuis, de nombreux travaux ont été réalisés afin de documenter la nature, l'origine et les propriétés de ces peptides car ils sont très vite apparus comme étant les principaux acteurs de la pathogénèse dans le cas de la MA. De nombreuses corrélations sur le plan génétique ont en effet été établies, notamment avec le cas des personnes souffrant du syndrome de Down (trisomie 21) [31]. Le chromosome 21 comporte le gène qui encode la protéine responsable de la production du peptide  $A\beta$ , nommée Protéine Précurseur de l'Amyloïde (ou APP pour *amyloid precursor protein* en anglais) pour cette raison [9, 31]. La duplication de ce gène conduit à une plus grande production de peptide  $A\beta$  et à la prévalence de la MA chez la grande majorité des personnes souffrant de trisomie 21. Les mutations intervenant dans la forme familiale de la maladie, impliquant les gènes qui encodent des protéases (les Présénilines 1 et 2) qui catalysent la formation du peptide  $A\beta$  et entraînent la neurodégénérescence à un stade précoce, sont également en bonne adéquation avec cette théorie, aussi appelée « hypothèse amyloïde ». Établie au début des années 1990, elle suppose que l'agrégation et l'accumulation de dépôt d' $A\beta$  sont les facteurs pathogènes initiaux de la MA [27, 32] et qu'ils amorcent une série de phénomènes complexes, appelée « cascade amyloïde », ayant pour finalité la mort neuronale [33]. L'hypothèse amyloïde a solidement été confortée par l'observation de dépôts amyloïdes durant les phases précliniqués de la maladie.

### 1.1.3.A Production du peptide

Les peptides  $A\beta$  sont produits suite à deux clivages protéolytiques de la protéine APP [34]. Cette dernière est une protéine transmembranaire ubiquitaire ayant une séquence de 695 à 770 acides aminés et dont la fonction biologique n'est pas clairement identifiée. Elle jouerait un rôle dans la différenciation neuronale [35]. Au cours de son processus métabolique, la protéine est clivée par deux enzymes ; d'abord par la  $\alpha$ -sécrétase qui clive APP dans le milieu extracellulaire proche de la membrane, puis dans un deuxième temps par la  $\gamma$ -sécrétase, une enzyme intramembranaire. Cette voie de clivage est courante et ne produit que des espèces non-amyloïdes (fragments P3 et APP  $\alpha$ ) ayant démontré des effets neuroprotecteurs pour les cellules neuronales [36, 37]. Il existe également une autre voie de clivage durant laquelle APP est d'abord clivée par une autre enzyme, la  $\beta$ -sécrétase, donnant lieu à la formation d'un

fragment, l'APP s $\beta$ , ayant démontré une fonction neuroprotectrice et un rôle dans la croissance des axones [38]. Cependant, la partie transmembranaire restante peut à nouveau être clivée par la  $\gamma$ -sécrétase [37]. L'occurrence de cette voie de clivage est minoritaire par rapport à la voie de sécrétion courante ( $\sim 1$  clivage sur 10) mais elle est responsable de la production des peptides amyloïdes A $\beta$ . Les deux voies de clivages sont distinguées en fonction des sous-produits qu'elles forment : la voie usuelle, non-amyloïdogène, et la voie amyloïdogène ; elles sont représentées sur la **figure 1.2**.

Suite à ces clivages, les peptides A $\beta$  sont libérés dans le milieu extracellulaire. La concentration globale en peptide a été quantifiée dans les fluides biologiques : elle avoisine 10 ng/mL dans les fluides cérébrospinaux mais les peptides A $\beta$  transitent également, en faibles proportions, dans le sérum [39]. S'il est plausible qu'ils possèdent une fonction physiologique particulière, des études ayant avancé l'hypothèse d'une fonction antimicrobienne de ces peptides liée à l'immunité innée [40-42], aucune n'a solidement été établie à ce jour. Les peptides A $\beta$  sont encore très majoritairement considérés comme les sous-produits d'une voie de clivage anormale de l'APP.



**Figure 1.2** - Représentation des deux voies de clivages de l'APP en bleu (le segment en rouge représente la séquence donnant lieu à la formation des peptides A $\beta$ ). La voie non-amyloïdogène met en jeu l' $\alpha$  puis la  $\gamma$ -sécrétase pour former le fragment APP s $\alpha$ , le peptide P3 et le domaine intracellulaire de la protéine précurseure amyloïde (AICD). La voie amyloïdogène met en jeu la  $\beta$  puis la  $\gamma$ -sécrétase et mène à la production de l'APP s $\beta$  puis des peptides A $\beta$  et de l'AICD.

Il existe plusieurs isoformes d'A $\beta$ . La position spécifique du clivage protéolytique par la  $\gamma$ -sécrétase étant variable, la séquence peut comprendre 38 à 43 acides aminés. Il existe cependant des voies de clivages préférentielles. Ainsi, l'isoforme A $\beta_{1-40}$  est produite de manière prépondérante alors qu'à contrario, A $\beta_{1-42}$  est une espèce faiblement générée et ne représente que 5 à 10 % de la quantité d'A $\beta_{1-40}$  [43]. Le peptide A $\beta_{1-42}$ , dont la séquence est montrée à la

**figure 1.3**, constitue en revanche l'isoforme qui suscite le plus d'intérêt depuis les dernières décennies car il est le composant majoritaire des plaques séniles. Bien que minoritairement produit, ses 2 résidus supplémentaires en bout de chaîne (l'isoleucine et l'alanine) lui confèrent une hydrophobicité accrue et une propension plus importante à s'agréger en milieu physiologique par rapport à ses homologues [44, 45].

**A $\beta$ <sub>1-42</sub>** : <sup>1</sup>DAEFRHDSG<sup>10</sup>YEVHHQK**L**V**F**<sup>20</sup>**F**AEDVGSNKG<sup>30</sup>A**I****I****G****L****H****V****G****G****V**<sup>40</sup>**V****I****A**<sup>42</sup>

**Figure 1.3** - Séquence du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Les acides aminés en rouge représentent les régions hydrophobes de la séquence du peptide.

---

En effet, l'hydrophobicité de la partie C-terminale du peptide est le facteur physicochimique qui limite la solubilité du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> et favorise son agrégation. Cette caractéristique est capitale car elle rationalise la raison pour laquelle A $\beta$ <sub>1-42</sub> se trouve être le composant initial des plaques séniles observées dans le cerveau, en plus d'en être le composant majoritaire [46]. Etant donné la forte corrélation entre l'agrégation de ce peptide et la neurodégénérescence, A $\beta$ <sub>1-42</sub> est considéré comme l'agent pathogène central parmi les peptides produits par la voie amyloïdogène dans le développement de la MA. Des études ont démontré que la gravité du déclin cognitif observé chez la forme précoce (familiale) de la maladie d'Alzheimer était associée à une forte production d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> [47] et que l'augmentation du ratio A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> est associée à la sévérité de la démence [48, 49].

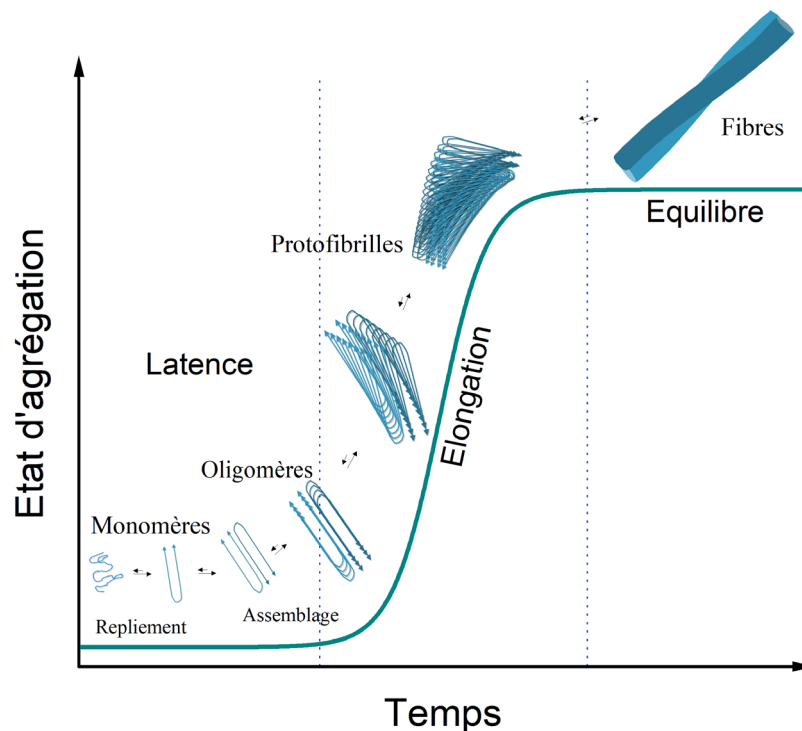
### 1.1.3.B Fibrillation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>

L'agrégation, ou autoassemblage, du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> résulte du repliement anormal du peptide qui forme par la suite des fibres amyloïdes. Ces fibres possèdent des propriétés très spécifiques, propres à tous les amyloïdes. Elles sont résistantes à la protéolyse, riches en feuillets- $\beta$  et présentent des propriétés optiques de biréfringence et tinctoriales, notamment au rouge de Congo [50]. La thioflavine T (ThT) est également un colorant spécifique des fibres amyloïdes et présente l'avantage de fluorescer intensément lorsqu'elle s'insère dans les interstices formés par les résidus des chaînes peptidiques des feuillets  $\beta$  [51, 52]. Grâce à cette spécificité pour la structure des fibres amyloïdes, ce fluorophore est très largement utilisé pour suivre la cinétique d'auto-assemblage *in vitro* [52, 53].

Le processus de fibrillation adopte généralement un profil sigmoïdal caractéristique, associé à trois différentes étapes, comme représenté à la **figure 1.4**. Il débute par une **phase de latence** au cours de laquelle un changement conformationnel de la forme monomérique du peptide se produit. Le peptide, qui sous sa forme native ne présente pas d'organisation particulière, forme alors des brins  $\beta$ . S'ensuit un assemblage de monomères qui forment ainsi



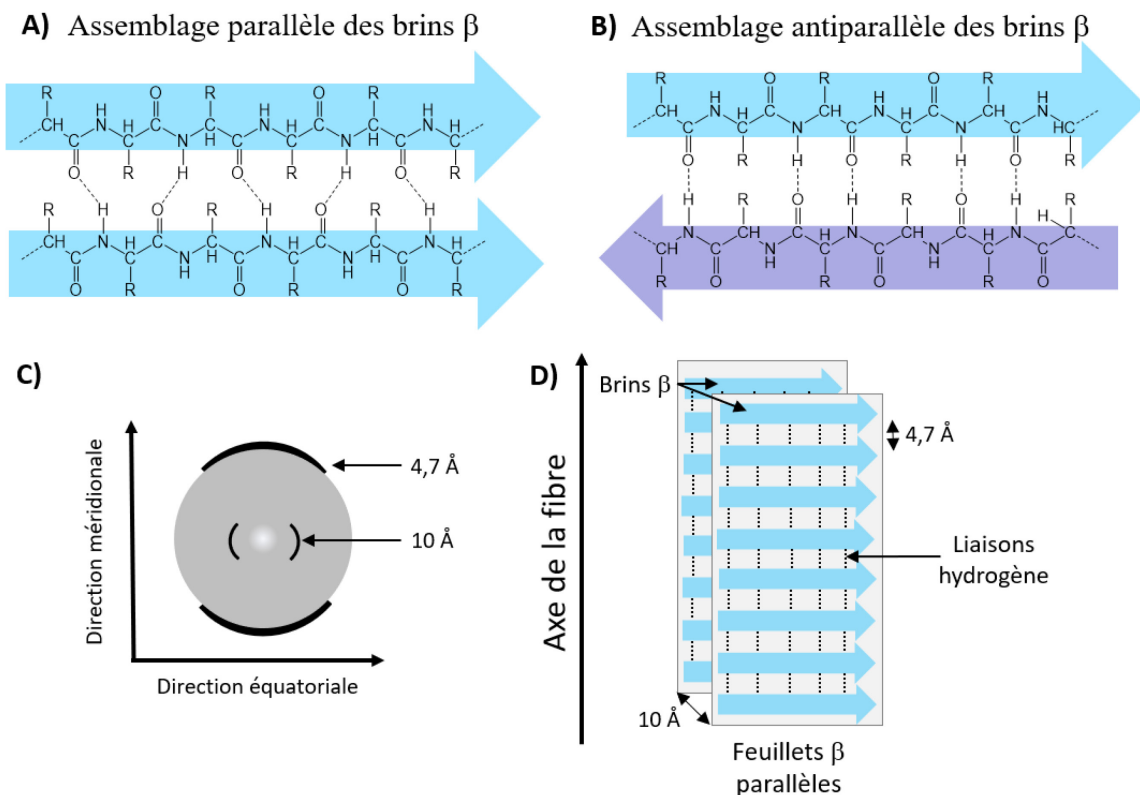
des noyaux. Cette étape constitue le facteur limitant de la fibrillation des amyloïdes dont la cinétique est dépendante de ce processus de nucléation. Ces noyaux deviennent ensuite des points de fixation pour d'autres monomères et la **phase d'élongation**, au cours de laquelle se forment des espèces de poids moléculaires croissants, est alors amorcée. Pendant cette phase, de nombreuses espèces intermédiaires sont générées. On distingue tout d'abord la formation d'oligomères solubles, qui forment ensuite des protofibrilles par addition de monomères et qui s'allongent jusqu'à la formation des fibres. L'élongation suit une croissance exponentielle jusqu'à atteindre un **équilibre**, illustré par un plateau sur les profils de fluorescence de ThT.



**Figure 1.4** - Profil de fibrillation du peptide  $A\beta_{1-42}$ .

La structure des fibres d' $A\beta_{1-42}$  a relativement bien été caractérisée notamment par diffraction des rayons X, RMN du solide et par microscopie électronique [54, 55]. Le peptide, replié sur lui-même, forme des brins  $\beta$  et établit des liaisons intermoléculaires (liaisons hydrogène), longitudinales à l'axe de la fibre, avec les chaînes peptidiques adjacentes. L'empilement de brins  $\beta$  perpendiculaires à l'axe de la fibre forme ainsi des feuillets  $\beta$  dans cet axe. Cette organisation est appelée « cross  $\beta$  » et constitue un critère structural commun à tous les amyloïdes. Lorsqu'ils s'associent, les brins peuvent s'empiler de manière parallèle ou antiparallèle (**figure 1.5, A et B**). Les fibres amyloïdes présentent toutefois un empilement de brins parallèles. Cette organisation se caractérise généralement, sur les profils de diffraction de rayons-X, par deux halos caractéristiques qui renseignent sur l'arrangement spatial des feuillets au sein de la fibre comme montré à la **figure 1.5, C**. Un arc méridional (parallèle à l'axe de la

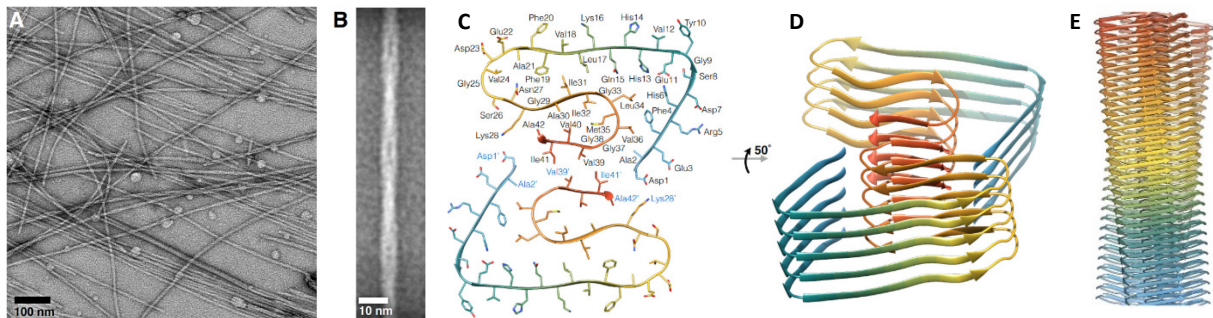
fibre) intense à 4,7 Å est associé à la distance entre les brins  $\beta$ . Cette distance est indépendante de la séquence du peptide car elle est fixée par la longueur des liaisons hydrogène formées par les groupements de la chaîne peptidique entre les brins [54]. On distingue également un deuxième halo équatorial (perpendiculaire à l'axe de la fibre) plus faible, à 10-11 Å ; il correspond à la distance entre les feuillets qui peut varier en fonction de la composition de la chaîne latérale du peptide [56].



**Figure 1.5** - Représentation de la structure cross  $\beta$ . **A)** et **B)** montrent respectivement l'association parallèle ou antiparallèle des brins peptidiques, **C)** représente le profil de diffraction de rayons X caractéristique des fibres amyloïdes telles que celles d' $A\beta_{1-42}$  (non orientées). **D)** est une représentation conceptuelle de l'assemblage des peptides sous forme de feuillets  $\beta$  parallèles.

Dans le cas d' $A\beta_{1-42}$ , des études en microscopie électronique ont permis de caractériser la structure moléculaire des fibres formées *in vitro* et comprendre comment le peptide s'organise spatialement. Elles sont généralement composées de deux protofilaments de 2 à 5 nm de diamètre qui se torsadent pour former une fibre de 8 à 12 nm d'épaisseur. Pour isoler ses portions hydrophobes, le peptide s'autoassemble en dimères et organise spatialement ses brins  $\beta$ . Une des structures probables sous la forme d'un « LS » (**figure 1.6 C et D**), où la partie N-terminale adopte la forme d'un L et la partie C-terminale la forme d'un S, a récemment été reportée [55]. D'autres structures ont également été observées avec une conformation

peptidique légèrement différente au sein des filaments [57-60]. Ceci témoigne notamment de la sensibilité du repliement d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> aux conditions expérimentales utilisées pour préparer le peptide *in vitro* [58, 61].



**Figure 1.6** - Structuration des fibres du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> : **A** et **B** sont des images de microscopie électronique à transmission de fibres (coloration négative). **C** et **D** sont des modèles atomiques des chaînes peptidiques formant des dimères au sein de la fibre organisée en feuillets  $\beta$  parallèles **D**. Images reproduites avec permission de [55].

### 1.1.3.C Les oligomères d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>

Si l'agrégation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> est très étroitement liée à la MA puisque le processus conduit à la formation des plaques séniles, il existe en revanche une discordance entre le développement des plaques et le degré du déclin cognitif. En effet, des observations *post mortem* ont rapporté la présence importante de plaques dans le cerveau d'individus n'ayant montré aucun signe de démence avérée de leur vivant [62]. Ceci a remis en question la causalité potentielle de l'agrégation d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> sur l'induction de la neurotoxicité et forcé à revoir l'hypothèse amyloïde. L'analyse de ces plaques a démontré un aspect diffus, lié à la structure dénuée de fibres amyloïdes ce qui les différencie intrinsèquement des plaques séniles [63]. La distinction majeure ayant été faite entre ces deux types de plaques concerne les proportions résiduelles en espèces oligomériques du peptide A $\beta$ . Ces espèces solubles de faibles masses molaires sont abondantes dans les plaques amyloïdes alors que les plaques diffuses en sont pauvres [64]. Les recherches se sont alors davantage axées sur l'étude des oligomères d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> qui constituaient dès lors les acteurs pathogènes potentiels des plaques amyloïdes. Certaines études se sont révélées majeures car elles ont démontré le caractère délétère et neurotoxique de ces espèces oligomériques *in vivo* [65, 66] contrairement à la forme monomérique du peptide [67, 68] ou celle des fibres [69]. De nombreux travaux ont depuis consolidé la relation entre la toxicité et l'état d'agrégation oligomérique du peptide [59, 68, 70, 71]. Différentes formes oligomériques ont été mises en évidence dans ces études. On distingue les oligomères à faibles degrés de répétition (dimères [72], trimères, tétramères... [68]), les protofibrilles linéaires ou annulaires [73] et les petits agrégats solubles appelés ADDL (pour *A $\beta$ -derived diffusible*

*ligands*) [74]. Si la pathogénèse de la MA est aujourd'hui solidement corrélée à ces espèces oligomériques, il n'existe cependant pas de consensus sur l'origine de leur formation. Certaines théories avancent qu'elles seraient formées lors du processus d'autoassemblage (*on-pathway*) [50] alors que d'autres hypothèses mentionnent que leur production en serait indépendante (*off-pathway*) [75-77].

Différentes hypothèses ont également été avancées pour justifier le caractère toxique propre à ces espèces oligomériques ; elles se démarquent de la forme monomérique et des fibres d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>. L'origine probable de la toxicité de ces oligomères proviendrait de leurs singularités morphologiques et structurales caractéristiques. Elles sont souvent globulaires et adoptent surtout une structure secondaire en feuillets  $\beta$  antiparallèles (cf. **figure 1.5, B**) [75, 78-80]. Le monomère est aléatoirement organisé et les fibres sont, quant à elles, structurées en feuillets  $\beta$  parallèles [55, 58]. Cette relation structurale avec la toxicité a été observée dans le cas d'autres protéines impliquées dans des processus pathologiques, comme l' $\alpha$ -synucléine (maladie de Parkinson) [81] ou la protéine prion PrP (encéphalopathie spongiforme) [82]. Ceci laisse penser que la structure en feuillets  $\beta$  antiparallèles serait un facteur de toxicité commun aux amyloïdes impliqués dans des processus délétères [80, 83].

Jusqu'à présent et malgré les très nombreuses recherches réalisées sur A $\beta$ <sub>1-42</sub>, la nature, l'origine de leur formation, et les propriétés intrinsèques de ces espèces oligomériques toxiques restent encore peu cernées. En cause, le caractère transitoire de ces espèces et le manque de techniques appropriées pour pouvoir les caractériser en détail. Pour pallier ce problème, certains travaux se tournent alternativement vers l'utilisation de mutants d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> générés dans la levure afin de reproduire des espèces aux propriétés morphologiques et structurales semblables et pouvoir comprendre l'origine de leur toxicité *in vivo* [75] et *in vitro* [80, 84].

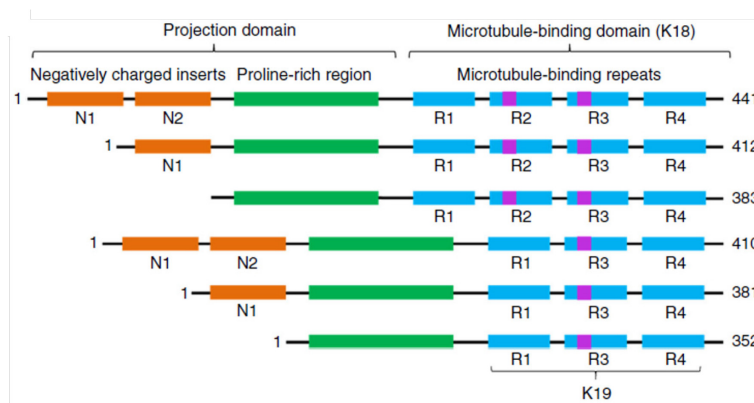
#### 1.1.4 La protéine Tau

Tau (pour *tubulin associated unit*) est une protéine cytoplasmique soluble synthétisée dans le neurone, localisée principalement au sein des axones [85] et qui possède des fonctions physiologiques bien identifiées [86]. Elle favorise la polymérisation des tubulines qui, une fois assemblées, forment les microtubules, des armatures qui assurent le maintien du cytosquelette des neurones et le transport axonal. Tau se lie également et spécifiquement aux microtubules afin d'en stabiliser la structure [87-89] et remplit ainsi une fonction capitale pour le maintien de la viabilité des cellules neuronales.

### 1.1.4.A Production de Tau

Comme présenté à la **figure 1.7**, Tau présente six isoformes différentes dont la séquence peut varier de 352 acides aminés pour sa forme la plus courte (hTau23) à 441 acides aminés lorsqu'elle est complète (hTau40 ou « *Tau full-length* »). Ces isoformes diffèrent en fonction de la longueur de leur séquence et du nombre d'unités de répétitions (R1, R2, R3 et R4 contenant 31-32 acides aminés chacune [89]). On compte trois isoformes ayant trois unités de répétition (hTau39, hTau37, hTau23) et trois isoformes en possédant quatre (hTau40, hTau34, hTau24). Les deux types d'isoformes majeures de la protéine (3R et 4R) sont présents en proportions équimolaires [90, 91]. Ces isoformes sont produites suite à l'épissage alternatif d'exons localisés sur le chromosome 17. Les exons 2, 3 et 10 étant concernés, les protéines constituent les six combinaisons possibles de cet épissage [92, 93].

Pour se lier aux microtubules, la protéine n'engage que la partie de sa séquence qui contient les unités de répétition. Ce domaine de liaison aux microtubules est appelé K18 lorsqu'il comporte quatre unités et K19 lorsqu'il n'en comporte que trois. Le reste de la séquence est appelé domaine de projection car cette partie de la protéine n'est pas impliquée dans son association aux microtubules et est donc « projetée » en dehors de la zone de liaison.



**Figure 1.7** - Séquences des isoformes de Tau. Figure reprise avec permission de [94].

Les différentes isoformes de Tau présentent une distribution asymétrique de résidus chargés. Le domaine de répétition, contenant de nombreuses lysines, est chargé positivement, ce qui assure la liaison aux microtubules, chargés négativement. La région N-terminale est globalement acide alors que la région C-terminale est neutre [95].

En conditions pathologiques surviennent des processus encore mal identifiés qui conduisent à une agrégation de Tau, inhibant ainsi son association aux microtubules et nuisant à sa fonction [18, 89, 96]. Ce phénomène a des conséquences neurodégénératives et constitue la caractéristique commune des maladies appelées « tauopathies » dont la MA fait partie.

L'agrégation de Tau provoquerait la dépolymérisation des microtubules, la dégénérescence des axones et par conséquent la mort des cellules neuronales.

La mise en évidence de la nature hyperphosphorylée de Tau dans les dégénérescences neurofibrillaires laisse penser que des phénomènes de phosphorylation de la protéine seraient à l'origine de son agrégation et de la perte de fonction de la protéine. Cependant, d'autres facteurs tels que des interactions avec des polyanions ou des lipides chargés négativement ont démontré qu'ils pouvaient induire la fibrillation de la protéine *in vitro* [95, 97]. Pour cette raison, l'implication de la phosphorylation dans le processus d'agrégation de la protéine reste encore non avérée.

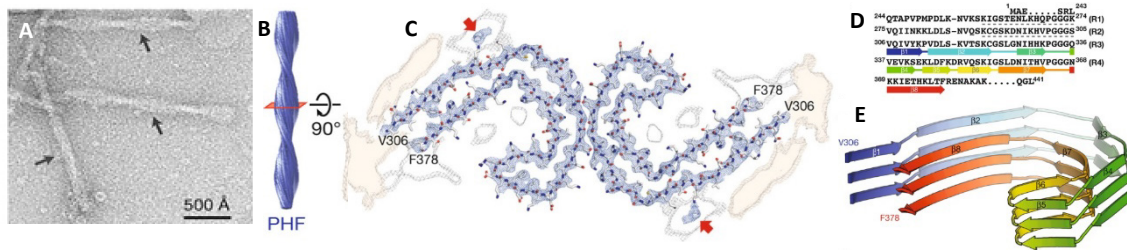
#### 1.1.4.B Fibrillation de Tau

L'agrégation de Tau est un phénomène qui suscite de nombreuses interrogations à cause de la nature physicochimique de la protéine. Contrairement au peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>, dont l'origine de l'agrégation peut être associée au caractère hydrophobe de sa partie C-terminale, Tau est très hydrophile en raison des nombreux acides aminés polaires contenus dans sa séquence [95]. Cette propriété intrinsèque se reflète sur sa solubilité particulièrement importante et l'absence de structure secondaire définie chez sa forme native [98-100]. Lorsqu'elle est amenée à s'agréger, Tau exprime un caractère amyloïde et forme des fibrilles, ayant une structure *cross  $\beta$* , qui s'organisent en filaments appariés en hélices (PHF, pour *paired helical filaments* en anglais) [17]. L'accumulation intra-neuronale de ces structures conduit à la formation des dégénérescences neurofibrillaires.

L'agrégation de Tau est liée à son domaine de répétition car le repliement de la protéine est initié dans cette portion de sa séquence. C'est la raison pour laquelle ce domaine constitue le cœur des PHF [101, 102]. Deux domaines hexapeptidiques hydrophobes ont été identifiés dans les unités de répétition R2 et R3 comme étant décisifs dans le repliement de Tau car ils ont une forte tendance à former des brins  $\beta$  [103, 104]. Les PHF résultant de leur autoassemblage sont composés de deux brins entrelacés, de 10 à 20 nm d'épaisseur, qui présentent généralement une périodicité de 80 nm [17] et sont constitués d'un mélange des six isoformes de la protéine [17, 92].

La microscopie électronique et la modélisation moléculaire ont récemment permis de visualiser directement cette organisation moléculaire de Tau au sein de PHF extraits de cerveaux [105, 106]. Dans la structure des PHF, les peptides s'associent en dimères et adoptent une conformation en forme de « C » se positionnant dos à dos l'un par rapport à l'autre (**figure 1.8**).

Huit brins  $\beta$  sont dénombrés au sein du domaine de répétition qui constitue le cœur de la fibre de Tau.

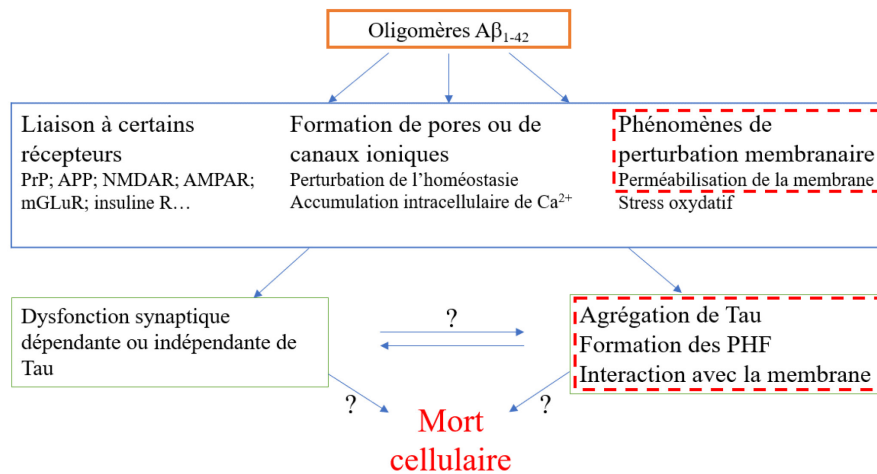


**Figure 1.8** - Structuration des fibres de Tau dans les PHF. **A** est une image de microscopie électronique à transmission de fibres (en coloration négative). **B** est une représentation tridimensionnelle des PHF et **C** est un modèle atomique des chaînes peptidiques de Tau, organisées en dimères et constituant la fibre en feuillets  $\beta$  parallèles. **D** représente la séquence des quatre unités de répétition formant au total huit brins  $\beta$  et **E**, leur répartition tridimensionnelle en feuillets  $\beta$ . Images reproduites avec permission de [106].

### 1.1.5 L'intime relation entre $A\beta_{1-42}$ et Tau

La singularité de la MA réside dans la manifestation du repliement anormal observé chez  $A\beta_{1-42}$  et Tau, deux phénomènes manifestement indépendants, et induisant des changements histopathologiques distincts qui semblent avoir une finalité commune dans la pathogénèse. Les oligomères du peptide  $A\beta_{1-42}$  induiraient des effets neurotoxiques liés à leurs structures dans le milieu extracellulaire alors que la perte de fonction de Tau entraînerait la dégénérescence des neurones depuis le milieu intracellulaire. Il a été démontré que l'apparition des NFT se corrélait chronologiquement davantage avec l'apparition des signes de neurodégénérescence que les plaques séniles [107, 108]. Pourtant, l'agrégation du peptide  $A\beta_{1-42}$  est un phénomène qui précède l'apparition des symptômes de la démence [20]. Ceci laisse penser qu'il existe une chronologie dans les processus physiopathologiques de ces deux protagonistes.

La cascade amyloïde, associée à l'hypothèse amyloïde mentionnée plus haut, est le concept qui a été adopté dans le but de définir la hiérarchisation des différentes étapes associées à la neurodégénérescence. Elle édicte globalement que l'accumulation du peptide  $A\beta_{1-42}$  et la formation d'espèces oligomériques toxiques peuvent initier des événements cellulaires qui seraient responsables de l'agrégation de la protéine Tau et conduire à la mort neuronale. Cette théorie est supportée par certains travaux ayant démontré que l'accumulation d' $A\beta_{1-42}$  et l'effet de ces oligomères sur les membranes pouvait perturber la fonction de Tau [109, 110]. Ce concept et les étapes probables qu'il met en jeu sont représentés à la **figure 1.9**.



**Figure 1.9** - Diagramme illustrant la chronologie des étapes clés de la cascade amyloïde déclenchées par les oligomères du peptide  $A\beta_{1-42}$ . Nous nous focalisons particulièrement sur les encadrés en rouge sur le diagramme. Figure reprise et traduite avec permission de [111].

Plusieurs scénarios peuvent justifier la manifestation de la neurotoxicité d' $A\beta_{1-42}$  et de Tau. L'une des hypothèses qui est très régulièrement abordée est la capacité de ces molécules à pouvoir interagir avec la membrane biologique et induire des effets de perturbation qui pourraient s'avérer délétères. Certaines études ont en effet démontré le rôle majeur que peuvent jouer les composants membranaires, notamment les lipides, à promouvoir une interaction avec des peptides/protéines amyloïdes, à favoriser leur agrégation *in vitro* et à catalyser la formation d'espèces intermédiaires toxiques [112-117]. Dans ce travail de thèse, nous nous focalisons tout particulièrement sur ces phénomènes d'interactions (encadrés rouges sur le **figure 1.9**). Nous souhaitons élucider les mécanismes d'action qui interviennent dans ces phénomènes et mettre en évidence les facteurs qui peuvent les moduler.

Pour bien comprendre comment la membrane peut avoir une potentielle influence, il est d'abord primordial d'établir en détail ce qui la caractérise et de définir ses propriétés.

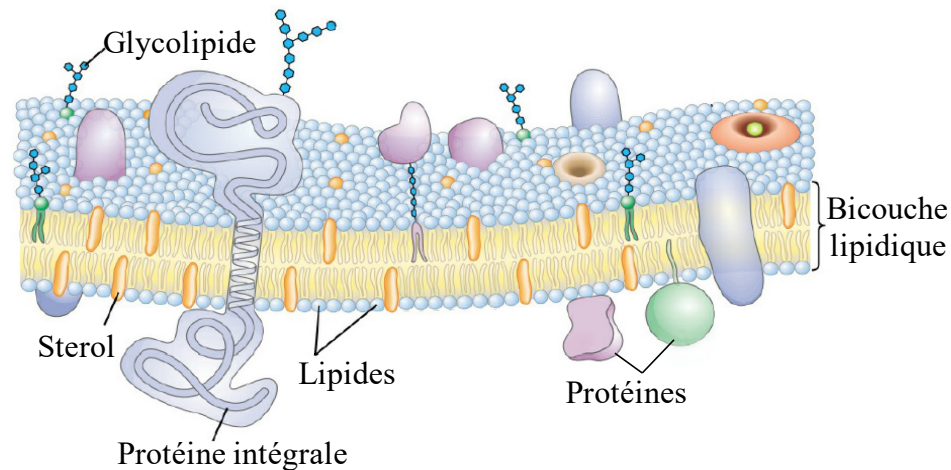
## 1.2 Étudier l'origine de la toxicité : interactions avec les membranes

### 1.2.1 La membrane lipidique

La membrane biologique est l'entité qui délimite la cellule, garantissant son intégrité ainsi que la viabilité de son contenu en s'opposant, comme une barrière imperméable mais sélective, au milieu extracellulaire. Elle joue un rôle majeur dans la communication entre les domaines extra et intracellulaire. La multitude de ses fonctions n'est possible que grâce à une composition riche et à une organisation complexe. La membrane est majoritairement constituée de deux



composants majeurs : les lipides et les protéines, des molécules biologiques mobiles qui s'harmonisent pour faire de la membrane une entité hautement dynamique. Le modèle qui a initialement été proposé pour décrire les propriétés de la membrane biologique est celui de la mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson en 1972 [118] représenté à la **figure 1.10**. Il illustre le caractère hétérogène (« mosaïque ») de la composition de la membrane, structurée en deux feuillettes de lipides formant une bicouche, et la dynamique des libres mouvements de ses composants est associée à la notion de fluidité.



**Figure 1.10** - Structure de la membrane plasmique selon le modèle de la mosaïque fluide. Figure reprise avec permission et modifiée de [119].

Cependant, au cours des quatre dernières décennies et grâce aux nombreuses observations qui ont depuis été faites sur les membranes, ce modèle a été revu car il stipulait que la répartition de tous les constituants membranaires était parfaitement homogène. Il a été observé que certains lipides et protéines pouvaient se partitionner latéralement pour former des domaines ayant une composition, une organisation et une dynamique différentes par rapport au reste de la membrane. Leur formation résulterait d'interactions spécifiques entre les lipides ou de la tendance qu'auraient certaines protéines à s'y confiner. Ces domaines, que l'on appelle les radeaux lipidiques, ou « *rafts* » [120], peuvent avoir des dimensions variant de l'échelle du nanomètre à celle du micron [121-123] et rempliraient de nombreuses et importantes fonctions au sein de la membrane [124, 125]. Ils seraient toutefois impliqués dans le développement de pathologies, associées au vieillissement notamment, comme la MA [126-128].

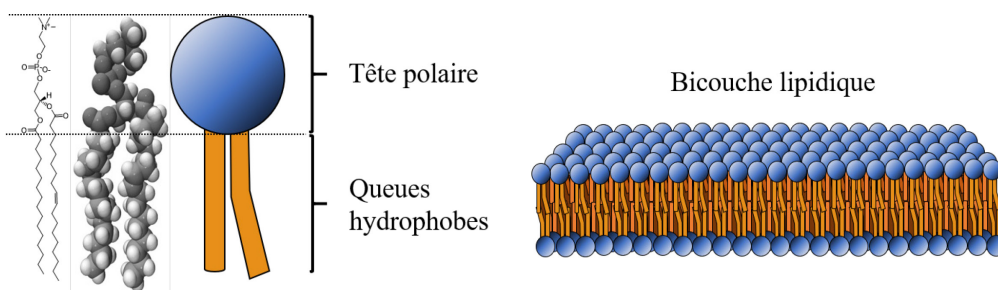
Il a également été montré que l'hétérogénéité des composants membranaires n'était pas seulement latérale mais transversale. En effet, les composants membranaires ne se répartissent pas de la même manière sur les deux feuillettes de la bicouche [129].

Dans ce travail de thèse, nous souhaitons spécifiquement étudier le rôle des lipides qui constitueront dès lors les composants essentiels de nos modèles membranaires. Nous excluons donc la contribution des protéines dans ce chapitre introductif qui va par la suite aborder les paramètres qui définissent les propriétés des membranes.

## 1.2.2 Propriétés des membranes

### 1.2.2.A La bicouche lipidique

Les lipides sont des molécules biologiques qui sont des composants essentiels de la membrane cellulaire. Ils possèdent une nature amphiphile qui leur confère une aptitude à se rassembler lorsqu'ils se trouvent en phase aqueuse. Cette ambivalence provient de leurs structures moléculaires : ils possèdent une extrémité polaire que l'on appelle généralement la « tête » et par distinction, généralement une ou plusieurs « queue(s) » qui sont quant à elles apolaires et donc hydrophobes (**figure 1.11**). De cette propriété découle cette tendance qu'ont les lipides à s'autoassembler dans l'eau sous forme d'organisations collectives. La taille et la structure de ces organisations dépendent directement de la géométrie respective de la tête/chaîne(s) des lipides. Les lipides forment la matrice de la membrane cellulaire : la bicouche lipidique. Dans le milieu biologique, ils s'associent en deux feuillets superposés, faisant face l'un à l'autre, afin d'enfouir les parties hydrophobes des lipides vers l'intérieur de la double couche, leurs têtes polaires étant de cette manière exposées à la phase aqueuse. Cette organisation est directement liée au concept d'effet hydrophobe : elle vise à diminuer le coût entropique associé à l'organisation des molécules d'eau en présence de molécules apolaires.



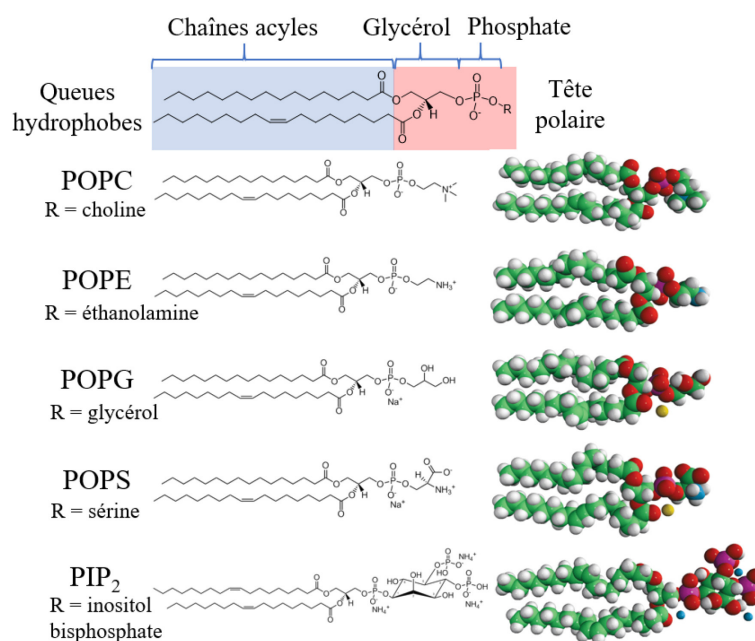
**Figure 1.11** - Représentations conceptuelles d'un lipide (phosphatidylcholine) à gauche et d'une bicouche lipidique assemblée en phase aqueuse à droite.

### 1.2.2.B Les lipides

#### Les phospholipides

Les lipides les plus abondants dans la membrane cellulaire sont les phospholipides. Ils possèdent dans leur grande majorité deux chaînes hydrophobes (les lysophospholipides n'en possèdent qu'une), l'une étant généralement saturée, l'autre possédant une ou plusieurs

double(s) liaison(s) cis [130]. Ce sont des chaînes acyles, dont la longueur et le nombre d'insaturations peut varier. Cependant, dans les systèmes biologiques, on retrouve en grande majorité des chaînes à seize et dix-huit carbones [131]. La chaîne saturée linéaire contenant seize atomes de carbone est nommée palmitoyle. La chaîne de dix-huit atomes de carbone possédant une insaturation cis entre les carbones 9 et 10 se nomme oléoyle ; c'est une des chaînes insaturées les plus abondantes dans les lipides de plusieurs membranes. Les chaînes hydrocarbonées sont reliées via un groupement glycérol à un phosphate. La structure des phospholipides peut comporter des différences au niveau du groupement qui fonctionnalise le phosphate et qui définit ainsi la tête polaire du lipide. Le phospholipide le plus abondant dans la membrane des cellules eucaryotes est la phosphatidylcholine (PC) [131]. Elle possède un groupement phosphate et une choline, lesquels sont respectivement chargés négativement et positivement. La PC est zwitterionique donc globalement neutre. Les autres phospholipides abondants dans la membrane plasmique des eucaryotes sont la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylsérine (PS). On retrouve également d'autres phospholipides en moindre proportions comme les phosphatidylinositols (PI). Il est à noter que certains phospholipides sont spécifiques des cellules procaryotes comme le phosphatidylglycérol (PG). Lorsque ces lipides portent une chaîne palmitoyle en position 1 et une chaîne oléoyle en position 2, les deux lettres décrivant la partie polaire sont précédées de PO. Ainsi, la PC avec de telles chaînes est la POPC. La structure moléculaire de chaque lipide est représentée sur la **figure 1.12**.



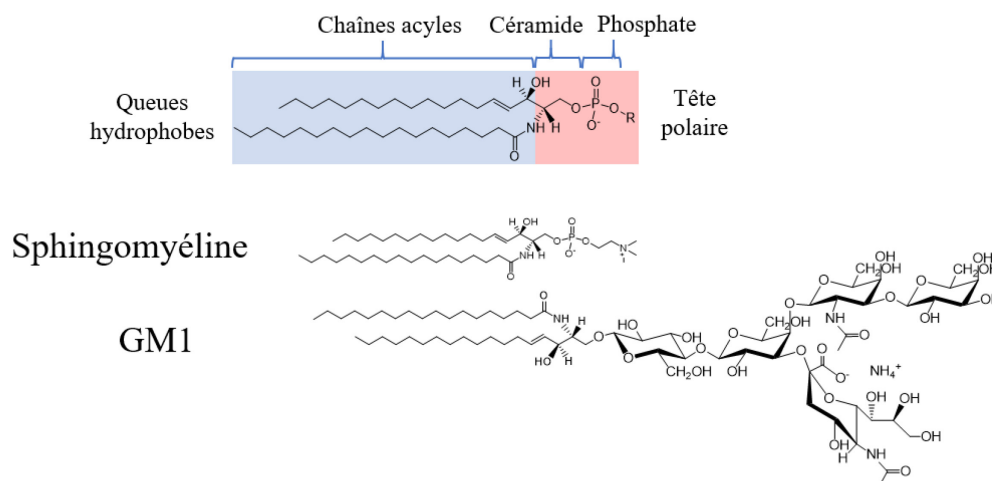
**Figure 1.12** - Structures moléculaires de la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-phosphocholine (POPC), de la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-phosphoéthanolamine (POPE), du 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-phosphoglycérol (POPG), de la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-phospho-L-sérine (POPS) et d'un phosphatidylinositol (PIP<sub>2</sub>).

## Les sphingolipides

Les sphingolipides constituent une deuxième grande classe de lipides. Leur squelette carboné est dérivé de la sphingosine et ce n'est donc pas le glycérol qui fait office de lien entre les chaînes carbonées et la tête polaire mais la fonction céramide [131]. Ils représentent environ 10 à 20 % des lipides de la membrane [132]. En fonction du groupement lié au phosphate à l'extrémité de la tête polaire, ils se différencient en phosphosphingolipides ou en glycosphingolipides. Lorsque le groupement lié au phosphate est une choline, le lipide en question est la sphingomyéline (SM), le sphingolipide le plus abondant de la membrane plasmique [132].

Les glycosphingolipides possèdent quant à eux une variété de saccharides au niveau de la tête polaire à défaut d'un groupement phosphate, ainsi qu'un ou plusieurs résidus d'acide sialique, ce qui leur confère une charge négative nette. Ils se localisent particulièrement dans la membrane plasmique des cellules nerveuses où ils constituent de 5 à 10 % de la masse lipidique [131]. Le ganglioside GM1 est probablement le glycosphingolipide le plus investigué car il constitue la cible de nombreux agents infectieux (notamment la toxine du choléra) [133]. Il ne possède qu'un acide sialique et se partitionne principalement dans le feuillet externe de la membrane.

La SM et le GM1 sont particulièrement importants car ils sont impliqués dans la formation de radeaux lipidiques au sein des membranes [134]. Leurs structures respectives sont représentées à la **figure 1.13**.

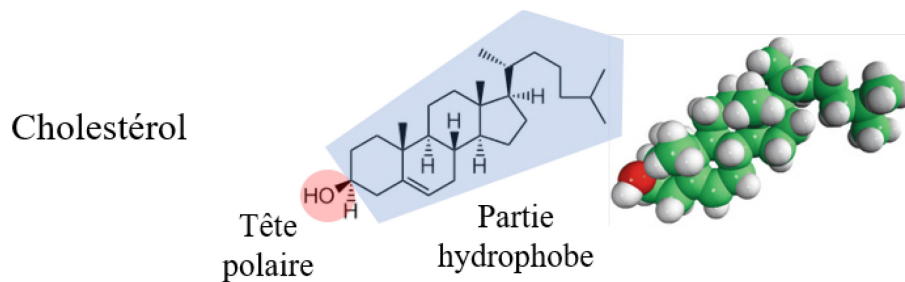


**Figure 1.13** - Structures moléculaires de la sphingomyéline et du GM1.

## Les stérols

La dernière grande famille de lipides est celle des stérols. Ils se démarquent des deux types de lipides précédemment cités de par leurs structures. Ils contiennent un noyau de stérane

qui confère aux stérols une structure relativement plane et rigide [131]. Le seul stérol présent dans la membrane plasmique des mammifères est le cholestérol. Il contient un groupement hydroxyle, qui constitue la seule entité polaire de sa structure, quatre cycles et une chaîne hydrocarbonée. Sa structure moléculaire est représentée à la **figure 1.14**. Pour maximiser les interactions, notamment entre son groupement hydroxyle et la tête des lipides, il s'oriente de manière parallèle aux chaînes des phospholipides dans la bicouche lipidique [135]. C'est un composant essentiel des membranes car il joue un rôle majeur dans l'organisation structurale des lipides et affecte substantiellement la fluidité et la perméabilité de la bicouche [135, 136]. Il représente 20 à 40 mol% des lipides dans la membrane plasmique chez les mammifères. La membrane neuronale en est particulièrement riche (jusqu'à 50 % de sa composition lipidique [137]) et contient ainsi la majorité du cholestérol contenu dans le système nerveux central soit environ 25 % de la quantité corporelle en cholestérol [138].



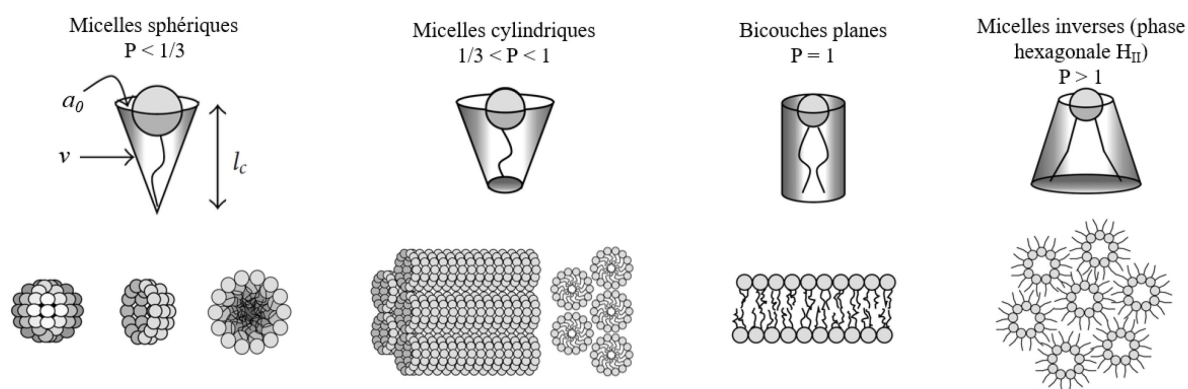
**Figure 1.14** - Structure moléculaire du cholestérol.

Le cholestérol est également un composant notoire des radeaux lipidiques et son implication dans de nombreuses maladies a souvent été investiguée, notamment dans le cadre de la MA [115, 127, 139].

### 1.2.2.C Les propriétés physiques des membranes

#### Paramètre d'empilement

Comme énoncé plus haut, la forme des structures autoassemblées par les lipides est directement liée à leur géométrie moléculaire. Cette caractéristique influence en effet l'empilement des lipides. Ils peuvent ainsi donner lieu à la formation de micelles (sphériques ou cylindriques), de bicouches (ou phase lamellaire) ou de phase hexagonale inverse. Afin de pouvoir faire la corrélation entre la forme et la structure supramoléculaire formée, le paramètre d'empilement a été introduit :  $P = v/(a_0 l_c)$  où  $v$  représente le volume occupé par les chaînes hydrocarbonées,  $a_0$  est la surface efficace (ou optimale) de la tête polaire et  $l_c$ , la longueur critique de la chaîne. La valeur de ce paramètre d'empilement permet d'anticiper le type de structure formée (**figure 1.15**) :



**Figure 1.15** - Structures des autoassemblages prédites par le paramètre d'empilement  $P$ . Figure reprise avec permission et modifiée de [140].

Dans le cas des lipides précédemment cités, la POPC, la POPS et le POPG présentent un paramètre d'empilement voisin de 1, ce qui leur confère une géométrie quasi-cylindrique. Les phospholipides portant les fonctions choline, sérine ou glycérol adoptent donc la phase lamellaire et forment ainsi des bicouches relativement flexibles en solution aqueuse. En revanche, la POPE possède une géométrie en cône inversé ( $P > 1$ ) et a tendance à s'empiler sous la forme de micelles inverses à cause de sa courbure spontanée négative. Le cholestérol possède également une structure en cône inversé dû à l'occupation spatiale prépondérante du stéranne (partie hydrophobe) en comparaison avec celle du groupement hydroxyle (tête polaire). Lorsqu'il est incorporé dans les membranes, il a tendance à comprimer les chaînes carbonées des lipides alentours ce qui réduit leur ordre conformationnel (effet de condensation du cholestérol [141]).

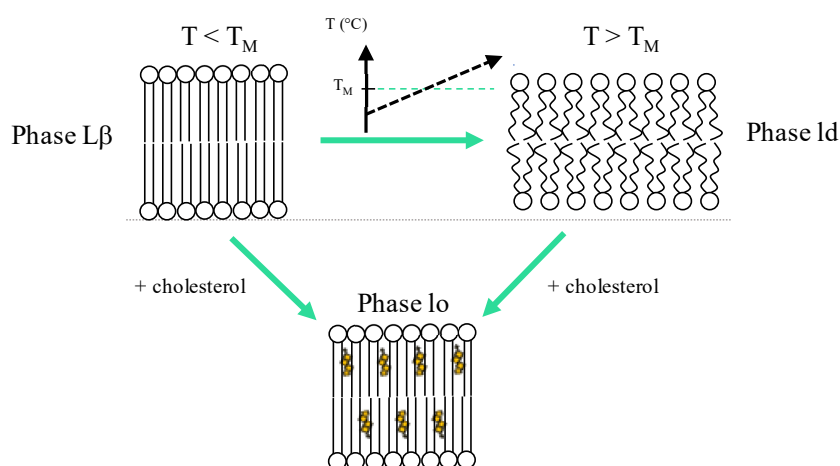
### Séparation de phases lipidiques

En fonction de la température, la membrane peut démontrer des phénomènes réversibles de séparation de phase. Nous pouvons distinguer deux états thermodynamiques particuliers : la phase gel ou solide ordonné ( $L\beta$ ) et la phase liquide cristalline, encore appelée phase fluide ou liquide désordonnée ( $l_d$  ou  $L\alpha$ ). Lorsque la membrane est en phase gel, elle se trouve dans un état relativement rigide dans lequel les lipides sont peu mobiles (diffusion latérale,  $D \sim 10^{-11} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  [142]) et très ordonnés. Les interactions de van der Waals, qui s'exercent essentiellement sur les chaînes hydrocarbonées, sont importantes ce qui condense fortement leur empilement. À cause de la réduction des mouvements intra et intermoléculaires, les chaînes se trouvent alors dans une conformation quasi toute trans et sont ainsi complètement étendues, ce qui tend à augmenter l'épaisseur de la bicouche lipidique. Au-delà d'une certaine température, appelée température de transition de phase ( $T_M$  pour *melting temperature* en anglais), une transition conformationnelle des chaînes a lieu : elles passent d'une conformation

quasi toute trans à une structure qui inclut plusieurs conformères gauches, ce qui induit la formation de coudes (*kinks*) dans les chaînes. Ceci tend à écarter les lipides à cause du volume plus important qu'occupent les chaînes et réduit ainsi l'empilement et les forces d'interaction intermoléculaires entre les lipides. L'augmentation des mouvements intramoléculaires des chaînes mène aussi à la diminution de l'épaisseur de la bicouche. La phase est qualifiée de fluide car les lipides présentent des diffusions latérale et rotationnelle plus élevées ( $D \sim 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) [143].

Les propriétés de polymorphisme des membranes dépendent directement des paramètres structuraux des lipides. Ainsi, la température de transition de phase est impactée par la longueur des chaînes hydrocarbonées, la présence et le nombre d'insaturations ainsi que des propriétés de la tête polaire comme la charge. Pour des lipides analogues, une plus grande longueur de chaînes carbonées accroît la possibilité d'établir des interactions de van der Waals, ce qui augmente la  $T_M$ . En revanche, la présence d'insaturations limite la cohésion moléculaire entre les chaînes et fait diminuer la  $T_M$ . Certains lipides, présentant des chaînes longues et saturées, possèdent ainsi des températures de transition de phase élevées et sont donc en phase gel à température ambiante. C'est notamment le cas de la SM et de lipides synthétiques comme la 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-phosphocholine (DPPC).

Un état thermodynamique intermédiaire peut exister entre les phases  $L\beta$  et  $l_d$ . La phase liquide ordonnée ( $l_o$ ) se forme généralement en présence de phospholipides ou de sphingolipides et de cholestérol. Dans cet état intermédiaire, les chaînes hydrocarbonées des lipides saturés sont plus ordonnées et étendues que dans la phase  $l_d$ . Les lipides peuvent cependant se mouvoir plus rapidement que dans la phase  $L\beta$  ( $D \sim 2.5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) ce qui confère à la membrane un caractère fluide [144, 145]. Les trois types de phase sont représentés à la **figure 1.16**.



**Figure 1.16** - Représentations conceptuelles des phases  $L\beta$  (gel), ld (liquide désordonnée) au-dessus de la température de transition de phase  $T_M$  et lo (liquide ordonnée) en présence de cholestérol. Sous l'effet du cholestérol, la phase gel a donc tendance à se fluidifier alors que la phase liquide désordonnée se rigidifie. Figure modifiée de [145].

Dans la membrane, des lipides ayant des propriétés de polymorphisme différentes peuvent spontanément se séparer latéralement pour former des domaines. Le phénomène de séparation de phase est un concept physique important puisqu'il participe à la formation, dans la membrane biologique, des radeaux lipidiques qui se trouveraient dans la phase lo. Expérimentalement, des mélanges ternaires de lipides comme la dioléoyl-*sn*-glycérophosphocholine (DOPC), la DPPC ainsi que le cholestérol permettent d'obtenir des membranes sujettes à la démixtion, reproduisant des domaines qui peuvent s'apparenter à ces radeaux lipidiques. Cette apparenté nécessite toutefois d'être nuancée car la composition lipidique d'une membrane cellulaire est beaucoup plus complexe qu'un mélange ternaire de lipides. Il est également important de noter que la notion de radeaux lipidiques reste controversée sur plusieurs points, notamment en ce qui concerne leurs tailles et leurs durées de vie, des paramètres reportés comme étant très variables ce qui rend ces domaines difficiles à caractériser de manière unanime [146-148].

### Répartition et asymétrie des lipides dans la membrane

Les lipides se partitionnent latéralement mais leur distribution est également hétérogène entre les feuillet de la membrane plasmique [149]. Ainsi, les lipides zwitterioniques constituent par exemple près de 90% de la composition du feuillet externe des globules rouges avec les glycosphingolipides comme le GM1. Le feuillet interne de la membrane plasmique est généralement enrichi en lipides négativement chargés tels que la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI). La phosphatidyléthanolamine (PE) est également majoritairement



localisée dans le feuillet interne [130]. Le cholestérol se partitionne quant à lui de manière équivalente dans les feuillets.

Dans le cadre du présent travail et par rapport aux modèles de membranes utilisés, ce niveau de complexité a été omis.

### 1.2.3 Mécanismes de perméabilisation des membranes

Les propriétés des membranes sont en partie modulées par les propriétés physicochimiques des lipides qui les constituent. En présence d'agents endogènes ou exogènes, l'intégrité des membranes peut être compromise. Certains peptides amyloïdes ont démontré une capacité à pouvoir déstabiliser la bicouche lipidique [150-152]. Certains mécanismes ont été introduits pour décrire les processus qui peuvent conduire ces peptides à induire des effets délétères sur l'intégrité de la membrane.

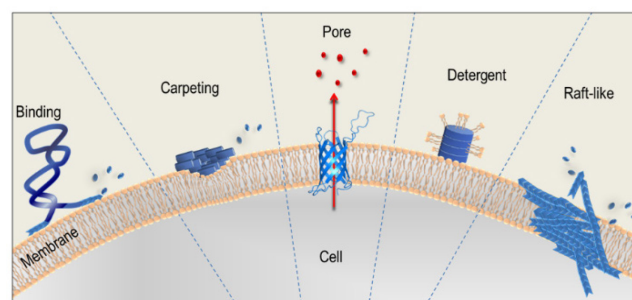
L'effet de tapis (*carpet model*) se manifeste par le dépôt et l'accumulation de peptides amyloïdes sur la surface de la bicouche lipidique. Ceci exerce une pression transversale asymétrique sur un des deux feuillets et peut conduire à une déstabilisation de la membrane, pouvant alors entraîner sa perméation et la fuite de petites molécules du milieu intracellulaire.

La formation de pores est un phénomène au cours duquel le peptide s'insère dans la membrane et forme un canal ionique. Ce mécanisme de perméation membranaire a probablement été le plus évoqué car certaines techniques comme la microscopie à force atomique ont permis d'observer des structures annulaires ressemblant à des pores dans des membranes modèles, avec des peptides amyloïdes comme  $A\beta_{1-42}$  et l' $\alpha$ -synucléine [153] ou encore le polypeptide amyloïde Islet IAPP (diabète de type 2) [154]. La formation probable de ces canaux a également été mise en évidence par la mesure de courants ioniques. Ce modèle détient une certaine pertinence physiopathologique car la formation de pores peut conduire à la fuite d'ions  $Ca^{2+}$  et déclencher toute une série de dérèglements cellulaires liés notamment à une dérégulation de l'homéostasie calcique, un événement considéré dans la cascade amyloïde. La formation de pores serait également responsable de la perturbation des mitochondries et pourrait conduire à la formation de dérivés réactifs à l'oxygène comme des radicaux libres et des peroxydes pouvant induire du stress oxydatif [155]. Ce mécanisme reste cependant contesté car les peptides amyloïdes sont considérés comme étant peu susceptibles de pénétrer complètement la membrane [112]. De plus, si la formation de tels pores est effective, ces structures ne seraient pas statiques et ne constitueraient qu'une étape préliminaire à d'autres phénomènes de déstabilisation membranaire.

Le dernier grand modèle est assimilé au mécanisme de solubilisation, analogue à celle produite par des détergents (*detergent-like effect*). Les détergents sont des molécules amphiphiles à la structure moléculaire conique qui fragmentent les membranes et forment des micelles mixtes avec les lipides solubilisés. Dans le cas des peptides amyloïdes, qui peuvent également présenter des propriétés amphiphiles, le mécanisme décrit d'abord une association et une insertion de la molécule dans la partie hydrophobe de la bicouche puis une capacité à s'entourer de lipides pour former un complexe dont la structure s'apparente à une micelle. Ce phénomène, qui a été mis en évidence avec des peptides amyloïdes comme A $\beta$  [156] et IAPP [157], entraîne une solubilisation progressive des lipides et se manifeste par la désintégration de la membrane. Certains travaux émettent l'hypothèse que la formation de pores serait une phase préliminaire de l'effet détergent des peptides amyloïdes [112, 157, 158].

Un récent mécanisme, moins souvent évoqué, s'apparente aux propriétés membranaires des radeaux lipidiques (*raft-like effect*). Ce phénomène a été observé avec un peptide amyloïde mutant capable de former des domaines au sein de la membrane [80].

L'ensemble de ces mécanismes est illustré à la **figure 1.17**. La diversité de ces phénomènes indique qu'il n'existe actuellement pas de consensus sur le mode d'action des peptides amyloïdes pouvant conduire à des effets de déstabilisation membranaire.



**Figure 1.17** - Représentations des potentiels mécanismes de perturbation membranaire par les peptides amyloïdes. Figure reprise avec permission de [80].

## 1.2.4 Le rôle des lipides dans la maladie

L'environnement lipide-protéine semble être un facteur physicochimique important dans la promotion des interactions avec les peptides amyloïdes mais aussi sur leur capacité à fibriller. Un nombre important d'études de fibrillation en présence de lipides a démontré que la cinétique de ce processus pouvait fortement être impactée en fonction de la nature des lipides.

### 1.2.4.A Dans le cas d'A $\beta_{1-42}$

Le cholestérol est le lipide qui a été le plus largement abordé dans le cadre de la MA [115, 159, 160]. Il a été montré que le stérol pouvait favoriser l'interaction avec A $\beta_{1-42}$  *in vitro*

[116, 161-163] menant notamment à la formation de structures s'apparentant à des pores [164]. Les études réalisées avec  $A\beta_{1-42}$  sont en revanche parfois divergentes. En cause, le caractère ambigu du lipide qui pourrait inhiber ou favoriser l'interaction avec le peptide [114].

Les lipides anioniques ont également démontré qu'ils pouvaient interagir spécifiquement avec  $A\beta_{1-42}$ . Le ganglioside GM1 en particulier a abondamment été évoqué [165-168]. Il a été démontré que le lipide pouvait favoriser l'association d' $A\beta_{1-42}$  à la membrane et promouvoir un changement conformationnel du peptide vers la structure en feuillets  $\beta$  [169]. Un mécanisme dans lequel le GM1 formerait des domaines (*clusters*) favorisant la formation de fibres sur la membrane a été proposé [113, 167]. D'après le modèle, ces agrégats constitueraient des plateformes sur lesquelles  $A\beta_{1-42}$  pourrait se replier, s'agréger et former des fibres [170]. De nombreuses observations ont supporté cette hypothèse et le GM1 est considéré comme un lipide important dans la modulation de l'interaction entre  $A\beta_{1-42}$  et les membranes. Le phénomène n'a toutefois jamais été visualisé directement et reste un modèle hypothétique.

Enfin, les radeaux lipidiques sont également souvent décrits comme jouant un rôle dans la MA [171]. Ces domaines seraient impliqués dans plusieurs processus pouvant être associés à la production d' $A\beta$  [128, 172] ainsi qu'à la modulation des interactions avec la membrane [117, 173].

#### 1.2.4.B Dans le cas de Tau

Si certains agents polyanioniques comme l'ARN ou l'héparine sulfate ont démontré une capacité à pouvoir amorcer l'agrégation de Tau [174, 175], l'influence des lipides n'a pour l'instant pas été investiguée en détail. Le peptide K18 est souvent utilisé *in vitro* en substitution de la protéine car il reproduit le comportement amyloïde de Tau et constitue le cœur des PHF [104, 176]. De récents travaux ont rapporté que ce peptide pouvait se déposer et s'agréger sur des membranes modèles et que ce phénomène serait particulièrement sensible aux interactions électrostatiques [177]. Il a également été démontré qu'il pouvait interagir avec des phospholipides chargés négativement et que cette interaction pouvait conduire à la formation d'agrégats [178], de fibres [97] ou de complexes pouvant induire des phénomènes de perturbation membranaire ou de toxicité [179, 180]. Ces observations ainsi que la détection de lipides dans la structure des PHF [181] ou des fibres formées *in vitro* [97] démontrent que l'agrégation et la fibrillation de K18 et *a fortiori* de Tau, pourraient être associés à un mécanisme mettant en jeu l'intégrité des membranes.

## 1.2.5 Membranes biomimétiques : les différents modèles utilisés

Dans le but de mieux comprendre comment les membranes lipidiques s'organisent, comment elles peuvent se comporter en fonction des conditions environnementales dans lesquelles elles sont placées ou encore comment elles peuvent réagir en présence d'agents exogènes, de nombreux modèles biomimétiques sont utilisés. De tels modèles membranaires ont été utilisés dans le cadre des présents travaux. La membrane cellulaire possède une composition lipidique extrêmement variée [137] et l'utilisation de modèles membranaires à partir de lipides synthétiques ou d'origines animale/végétale permet d'en simplifier grandement les études.

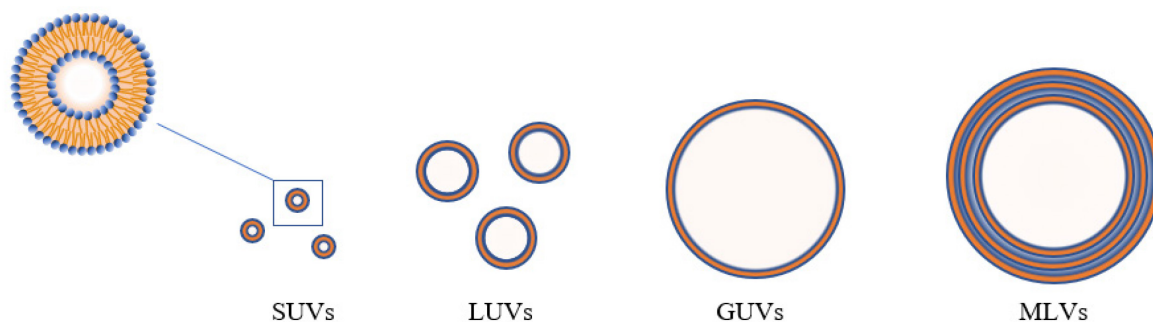
### 1.2.5.A Les liposomes

Les liposomes sont des structures vésiculaires sphériques qui peuvent adopter une gamme de morphologies et de tailles différentes lorsque les lipides s'autoassemblent dans une phase aqueuse. La formation de liposomes est dépendante, entre autres, de la température de transition de phase des lipides qui les constituent. Une morphologie analogue aux membranes des cellules eucaryotes est la vésicule unilamellaire, qui ne comporte qu'une seule bicouche lipidique. La nomenclature des liposomes reflète la taille et le nombre de bicouches des vésicules.

- \* Les petites vésicules unilamellaires (ou SUVs pour *small unilamellar vesicles* en anglais), généralement préparées par sonication ou extrusion, ont un diamètre inférieur à 100 nm.
- \* Les grandes vésicules unilamellaires (ou LUVs pour *large unilamellar vesicles*) ont un diamètre compris entre 100 nm et 1  $\mu\text{m}$  et sont généralement préparées par extrusion.
- \* Les vésicules unilamellaires géantes (ou GUVs pour *giant unilamellar vesicles*) ont un diamètre supérieur à 1  $\mu\text{m}$  et sont généralement préparées par électroformation [182].
- \* Les vésicules multilamellaires (ou MLVs pour *multilamellar vesicles*) se forment spontanément en solution aqueuse et peuvent avoir des tailles et un nombre de bicouches concentriques très variables.

Les différents types de vésicules sont reportés à la **figure 1.18**.

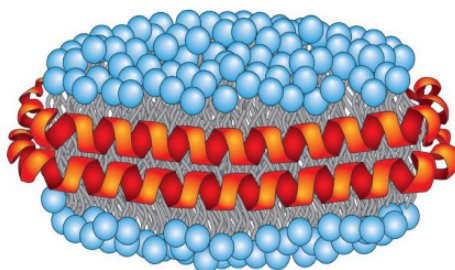
Vésicule unilamellaire



**Figure 1.18** - Représentations comparatives des différents types de vésicules en fonction de leur tailles.

### 1.2.5.B Les nanodisques

Les nanodisques sont des mimes membranaires constitués de bicouches discoïdales de dimensions nanométriques dont les côtés sont entourés d'agents amphiphiles [183, 184]. Ces systèmes auto-assemblés, dont la popularisation est relativement récente, sont souvent utilisés pour l'extraction de protéines membranaires. Leur concept originel est inspiré de l'apolipoprotéine A1 (ApoA1), une protéine qui stabilise les particules lipoprotéiques de haute densité (HDL de *high density lipoproteins* en anglais) pour transporter le cholestérol à travers le flux sanguin [185]. Elle forme une couronne autour d'une bicouche lipidique discoïdale grâce à sa structure en hélice  $\alpha$  comme représenté à la **figure 1.19**. D'autres protéines, que l'on qualifie « d'échafaudage » (ou MSP, de *membrane scaffold proteins* en anglais) ont également été utilisées pour l'obtention de nanodisques. Aujourd'hui toutefois, des copolymères séquencés comme celui du styrène associé à l'acide maléique (SMA, pour *styrene-maleic acid* en anglais) sont souvent utilisés pour former les nanodisques [186].

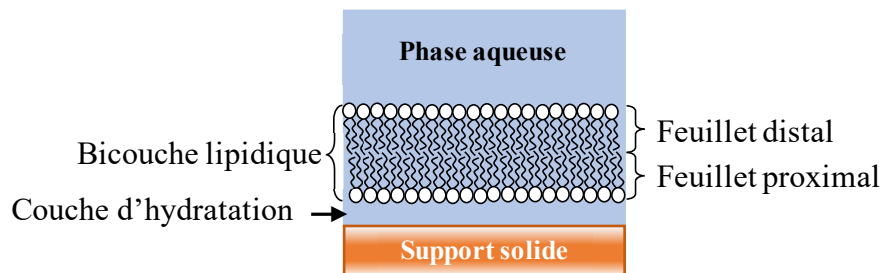


**Figure 1.19** - Illustration d'un nanodisque de lipides entourés de deux chaînes protéiques en hélices  $\alpha$ . Figure reprise avec permission de [183].

L'attrait des nanodisques préparés à partir des copolymères séquencés réside dans la non-sélectivité lipidique associée à leur formation lorsqu'ils solubilisent des membranes [187, 188]. Cela permet notamment de garantir le maintien de l'environnement natif des protéines membranaires, un avantage considérable pour la préservation de leurs structures et de leurs fonctionnalités [187, 189].

### 1.2.5.C Les bicouches supportées

Le concept de bicouche supportée par une surface solide hydrophile a été introduit dans les années 1980 par Tamm et McConnell [190]. Ils ont ouvert, grâce à leurs travaux pionniers, le champ de la recherche biophysique à l'utilisation d'une nouvelle classe de modèle membranaire. Ils démontraient à l'époque que la formation de bicouches composées de phospholipides zwitterioniques sur des substrats solides (silice, quartz et silicium) était possible et rapportaient que la diffusion latérale des lipides était semblable à celle des bicouches libres dans les modèles communément utilisés (généralement des MLVs). Pourtant, les forces mises en jeu au niveau de l'interface entre le feuillet directement supporté (feuillet proximal) et la surface solide qui est généralement chargée sont nombreuses [191] ; la combinaison des interactions électrostatiques, des forces de van der Waals, des forces d'hydratation et des forces stériques garantit le maintien de la membrane sur le support [192]. Il existe en revanche une couche d'hydratation relativement fine (1 à 2 nm) entre la bicouche et la surface comme représenté à la **figure 1.20**. Cette couche permet aux deux feuillets de conserver des propriétés de fluidité plus ou moins comparables à celles qu'ils ont dans des systèmes vésiculaires en fonction de la nature du support [193]. Les libres mouvements rotationnels et translationnels des lipides sont ainsi préservés ce qui rend le modèle attractif. Cependant, comme elle est supportée par la surface solide, il est convenu que la bicouche perd de sa capacité à pouvoir se déformer et offre au milieu extérieur une surface plane dans le cas où le substrat solide est plan.



**Figure 1.20** - Schéma d'une bicouche lipidique supportée. L'épaisseur de la bicouche est généralement de l'ordre de 4 nm alors que la fine couche d'hydratation qui la sépare de la surface solide fait de 1 à 2 nm.

De nombreux procédés sont aujourd'hui utilisés pour former des bicouches supportées continues sur différents types de substrats. Les techniques les plus couramment utilisées sont :

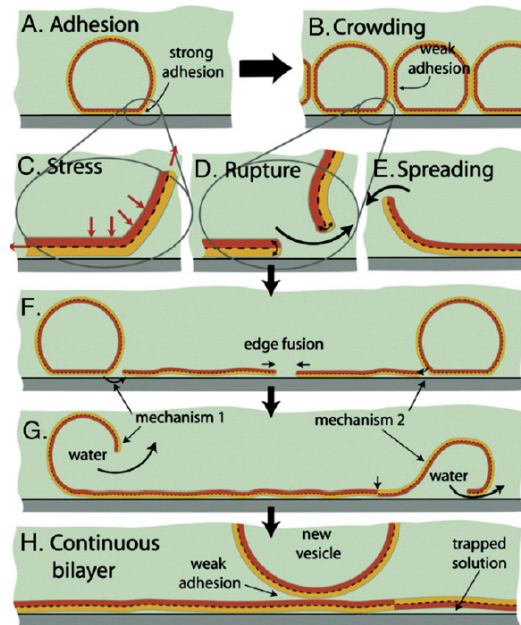
- \* les méthodes de Langmuir-Blodgett et Langmuir-Schaefer qui utilisent des cuves afin d'associer des monocouches formées à l'interface air/eau [194].
- \* la méthode d'étalement de vésicules, souvent dénommée « fusion de vésicules ».

- \* d'autres méthodes moins répandues, impliquent notamment la combinaison des deux techniques précédemment citées, comme la dilution de micelles [195, 196] ou, plus récemment, la formation de bicouches assistée par solvants organiques [197, 198].

### Formation des bicouches supportées par étalement de vésicules

Ce procédé de formation est particulièrement apprécié et très souvent utilisé parce qu'il ne nécessite pas l'utilisation de matériels spécifiques, contrairement aux méthodes de Langmuir, et s'illustre par un procédé d'obtention de bicouches supportées relativement aisé. Il consiste tout d'abord à préparer une suspension de vésicules unilamellaires (LUVs ou SUVs) de composition lipidique souhaitée puis d'en déposer un volume sur une surface préalablement conditionnée pour présenter des propriétés hydrophiles et une propreté optimale. Les supports qui sont généralement utilisés sont le mica, le verre ou le silicium. La surface peut également avoir été fonctionnalisée par une couche de polymère, une monocouche lipidique ou une monocouche d'alcanethiols.

Un des mécanismes de formation possible est représenté à la **figure 1.21**, mettant en jeu différentes étapes. Les vésicules commencent tout d'abord par diffuser vers la surface pour y adhérer (A). Une fois adsorbées et agglomérées, elles se déforment et si cette déformation est suffisante, une rupture se produit pour former des disques de bicouche (B à E). S'ensuit alors une étape durant laquelle les bords des disques, thermodynamiquement instables car hydrophobes [199], coalescent pour former des bicouches de plus en plus étendues (F). Des interactions de type hydrophobes entre les bords de la bicouche et les vésicules qui ne se sont pas rompues interviennent (G). Enfin les vésicules simplement déposées sur la surface de la bicouche sont désorbées par rinçage. Ce procédé de formation opère donc spontanément après dépôt de la suspension sur la surface.



**Figure 1.21** - Les différentes étapes menant à la formation de bicouches supportées par étalement de vésicules. Figure reprise avec permission de [200].

La formation de bicouches continues et homogènes est néanmoins sensible à de nombreux paramètres qui nécessitent d'être compris et maîtrisés afin de se placer dans les conditions qui rendent l'étalement des vésicules favorable. La nature des lipides est un des éléments clés à considérer car elle détermine la faisabilité des premières étapes du processus (interactions favorables avec la surface, adhésion et rupture). La concentration de vésicules est également importante pour l'étape d'agglomération (« crowding ») sur la surface du support. Le paramètre de taille est un élément décisif qui joue principalement sur l'étape de rupture ; la bicouche lipidique de petites vésicules est sous tension et son étalement sur la surface vient libérer ce stress. La réussite de la méthode est aussi dépendante de la nature du matériau qui constitue la surface solide (charge, rugosité, structure), de l'environnement aqueux (force ionique/pH de la solution, présence éventuelle d'ions divalents) et de la température [201, 202].

Les compositions dans les feuillet distal et proximal sont comparables lorsque l'on forme les bicouches supportées en utilisant ce procédé mais il a été rapporté que des interactions avec la surface solide pouvaient induire une asymétrie en fonction de la nature du support et de celle des lipides [203].

### Support utilisé

Le support le plus couramment utilisé pour l'obtention de bicouches supportées est le mica muscovite (« le verre de Moscou »). Ce matériau est un minéral de composition chimique  $K(Si_3AlO_{10})Al_2(OH)_2$  qui se structure sous forme de couches [204]. Chacune d'entre elles comporte deux feuillets de  $(Si,Al)_2O_5$  et sont liées les unes aux autres par un feuillet central



d' $\text{Al}_2(\text{OH})_2$ . La charge globale des couches est contrebalancée par les ions potassium qui se coordonnent dans le plan. Ce matériau est généralement utilisé pour ses propriétés topographiques : surface plane à l'échelle atomique et une très faible rugosité [205] ce qui le rend particulièrement apprécié pour l'étude d'échantillons biologiques à l'échelle moléculaire [206-208]. Grâce à sa structure, le mica présente également la particularité de pouvoir être clivé ce qui génère des surfaces hydrophiles. Cet avantage permet de pouvoir s'affranchir d'étapes de traitement de surfaces et de nettoyage nécessaires avec d'autres types de supports comme la silice ou le silicium.

### 1.3 Objectifs de la thèse

Dans ce travail de thèse, nous souhaitons visualiser les effets d' $\text{A}\beta_{1-42}$  et de K18, fragment peptidique essentiel de la protéine Tau, tous deux peptides amyloïdes, sur des membranes modèles. Le but de ce projet est d'établir s'ils conduisent à des perturbations membranaires et, le cas échéant, d'élucider leurs modes d'actions. Notre approche consiste à faire varier la composition de modèles membranaires afin de comprendre comment elle peut moduler les interactions avec ces peptides, conduire à de potentiels effets de perturbation membranaire et dans quelles mesures ces effets sont associés à des phénomènes d'agrégation et de fibrillation.

Dans un premier temps, nous souhaitons revisiter le mécanisme de solubilisation membranaire par des molécules amphiphiles relativement bien caractérisées : les détergents. L'aspect original de cette étude, qui constitue le deuxième chapitre de ce manuscrit, est de démontrer que ces phénomènes peuvent induire un certain degré de sélectivité lipidique. La titration calorimétrique isotherme (ITC) est la technique que nous utiliserons pour étudier les phénomènes de solubilisation membranaire d'un point de vue thermodynamique, afin de pouvoir se placer dans des conditions favorables à l'observation de potentielles sélectivités. La chromatographie liquide, couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS), sera employée pour quantifier les efflux lipidiques. Nous nous intéressons particulièrement aux propriétés physicochimiques des lipides (caractère électrostatique et les aspects de courbures) ainsi qu'à celles des agents induisant de la fragmentation. Ce travail permettra de mieux comprendre les phénomènes de solubilisation membranaire et de discuter de la sélectivité lipidique associée aux effets des détergents, une notion relativement peu investiguée. Ce chapitre constitue une étape préliminaire avant l'étude des interactions entre les membranes et les peptides amyloïdes, dont les propriétés d'agrégation et d'autoassemblage compliquent substantiellement la

compréhension des phénomènes de perturbations membranaire qui peuvent, comme cité plus haut, être associés à des effets détergents.

Les interactions entre ces peptides et les membranes feront l'objet des chapitres 3 et 4.

Nous nous intéresserons tout d'abord au peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>. La microscopie à force atomique sera utilisée en milieu liquide, pour caractériser *in situ*, les effets du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> et d'un mutant oligomérique, le G37C, présentant des similarités morphologiques et structurales avec les espèces supposées toxiques associées à la MA, sur les membranes. Le modèle membranaire que nous emploierons dans cette étude est celui des bicouches supportées obtenues par étalement de vésicules sur mica. Certains travaux se sont intéressés aux effets d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> sur des membranes mais très peu se sont intéressés à la notion et à l'implication des domaines membranaires. L'originalité de notre approche consiste donc à se placer dans des conditions où les membranes forment des domaines lipidiques en utilisant indépendamment le cholestérol, le GM1 et des systèmes lipidiques ternaires pour lesquels surviennent de la séparation de phases liquide-liquide. Ce travail permettra de comprendre comment les domaines peuvent ou non promouvoir l'interaction d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> et du mutant oligomérique avec les membranes.

Le quatrième chapitre sera dédié à l'étude des interactions entre les membranes et le peptide amyloïde K18. Ce fragment essentiel de Tau conditionne les propriétés de repliement, d'agrégation et de fibrillation de la protéine, des processus probablement impliqués dans la perte d'association de la protéine avec les microtubules [209]. Actuellement, il existe encore très peu d'études qui se sont spécifiquement intéressées aux interactions de Tau ou du peptide K18 avec les membranes. Nous souhaitons apporter des éléments de réponse sur ces aspects à travers une étude similaire à celle conduite dans le chapitre 3. Étant donné la nature intracellulaire de Tau, des lipides constituant le feuillet interne de la membrane seront privilégiés pour former les membranes modèles. De la même manière qu'avec A $\beta$ <sub>1-42</sub>, nous étudierons donc les effets de K18 sur des bicouches supportées de compositions variées, comprenant notamment des lipides comme la POPS ou le PIP<sub>2</sub> mais également la présence de domaines lipidiques. Le but de ce chapitre est de comprendre comment la nature des lipides influence le comportement du peptide dans des conditions physiologiques.

Enfin, une récente technique de caractérisation de taille, l'analyse de taille microfluidique (MDS pour *microfluidic diffusional sizing* en anglais), sera employée dans le cinquième chapitre de ce manuscrit. Dans le contexte de la thèse, cette technique a notamment permis d'étudier les phénomènes de solubilisation de vésicules avec des copolymères séquencés

de type SMA pour la formation de nanodisques. Nous souhaitons également employer la MDS afin d'évaluer les premières étapes intervenant dans l'interaction entre K18 et des nanodisques de compositions lipidiques mixtes.

Ce manuscrit se terminera par un chapitre élaborant les grandes conclusions de ce travail de thèse et ouvrera la voie à d'éventuelles perspectives.

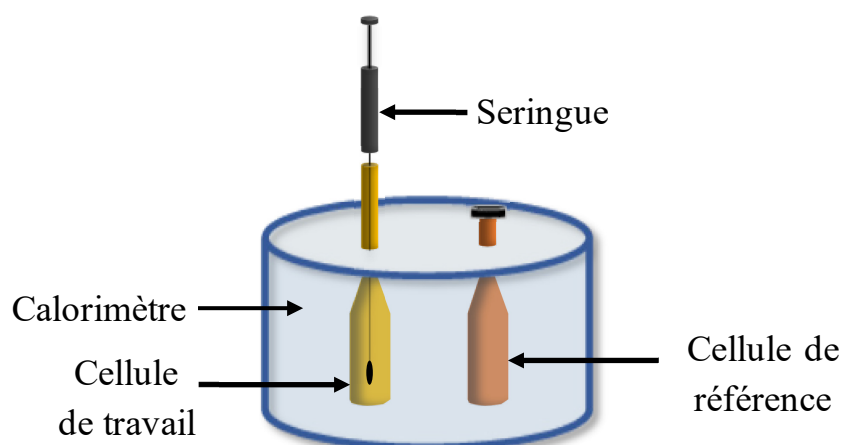
## 1.4 Les techniques d'étude utilisées

### 1.4.1 Titration calorimétrique isotherme

Lorsqu'une réaction physique ou chimique se produit, de l'énergie peut être absorbée ou dégagée sous forme de chaleur. La titration calorimétrique isotherme (ITC, pour *isothermal titration calorimetry* en anglais) est une technique extrêmement sensible qui permet de quantifier les échanges de chaleur associés à une réaction chimique lorsque l'on mélange deux solutions données. Elle est particulièrement adaptée pour étudier les interactions entre des (bio)molécules.

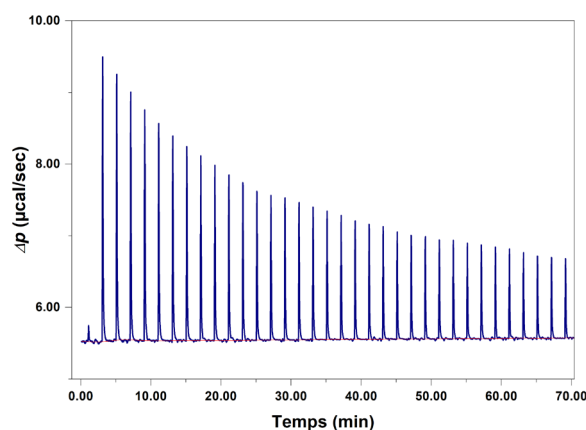
#### Principe de fonctionnement

L'appareil est un calorimètre adiabatique composé d'une cellule de référence, généralement remplie d'eau dégazée, et d'une cellule de travail maintenue à pression constante dans laquelle est placée une première solution (**figure 1.22**) [210]. Une deuxième solution est ajoutée par injections successives dans la cellule de travail grâce à une seringue, généralement automatisée, extrêmement précise et dont l'embout est doté d'une pale rotative permettant d'homogénéiser le mélange tout au long de l'expérience. Ces deux cellules sont maintenues à une température rigoureusement identique grâce à un système de compensation qui réajuste systématiquement la température de la cellule de travail après chaque injection.



**Figure 1.22** - Représentation schématique d'un calorimètre ITC.

La chaleur absorbée ou dégagée après chaque injection est mesurée de manière très précise ( $\sim 1 \mu\text{cal}$ ) [210]. Le calorimètre délivre une courbe de titration calorimétrique sous forme de thermogramme, correspondant à la chaleur que le système de compensation a dû fournir ou dissiper ( $\Delta p$ ) après chaque injection, afin de maintenir la cellule de travail à la même température que celle de référence en fonction du temps. Un exemple de thermogramme illustrant une série d'injections est présenté à la **figure 1.23**.



**Figure 1.23** - Exemple d'un thermogramme ITC (dosage de liposomes par un détergent cationique). Chaque pic correspond à une injection.

En intégrant ce signal sur la durée d'une injection, on peut mesurer la chaleur absorbée ou dégagée lors de chaque injection (ou chaleur de réaction  $Q_R$ ).

Grâce à ces signaux, la technique se démarque par son potentiel à déterminer, en outre et de manière assez simple, des grandeurs caractéristiques comme la constante d'affinité ou encore la variation d'enthalpie  $\Delta H$ , de réaction ou de mélange.

L'ITC se révèle être une technique performante pour déterminer l'affinité de ligands avec des protéines dans le contexte de développement de médicaments. Elle est également considérée comme une technique de choix pour étudier les phénomènes de solubilisation membranaires, notamment par des détergents, car elle présente une précision supérieure à celles des techniques généralement utilisées [211-213]. Dans ce travail de thèse et plus précisément dans le chapitre 2 de ce manuscrit, c'est dans cette optique que la technique sera employée.

## 1.4.2 Microscopie à force atomique

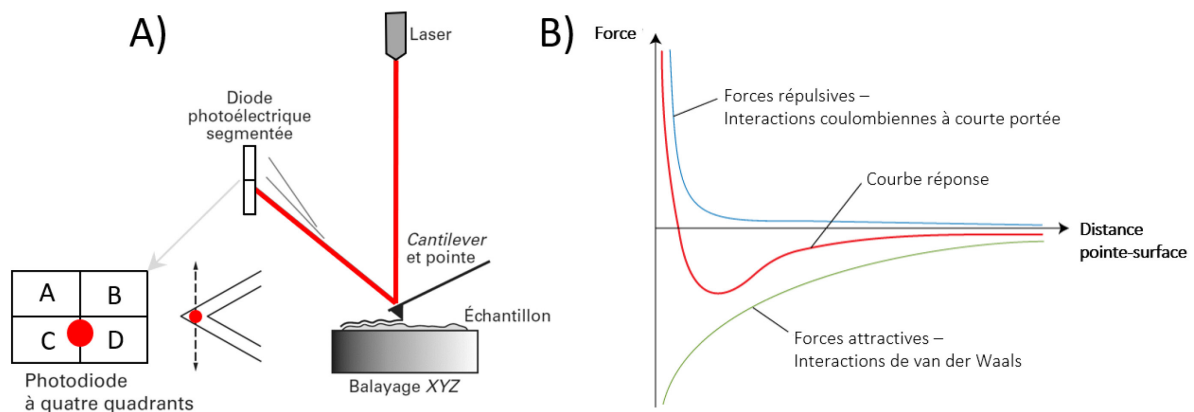
La microscopie à force atomique (AFM, pour *atomic force microscopy* en anglais) est une technique de microscopie à sonde locale, dont le concept a été introduit en 1986 par Binnig, Quate et Gerber comme une application alternative à la microscopie à effet tunnel (STM pour *scanning tunneling microscopy*), afin de pouvoir étudier la surface de matériaux isolants à l'échelle de l'atome [214]. En combinant le principe de fonctionnement de la STM avec celle

de la profilométrie, les inventeurs de la technique montraient la possibilité d'imager des surfaces non-conductrices avec une résolution latérale de 30 Å et une résolution verticale inférieure à l'Ångstrom. Aujourd'hui, avec l'engouement qui s'est développé pour les nanomatériaux, le microscope à force atomique est devenu un instrument incontournable pour réaliser de l'imagerie et de la caractérisation de surface à l'échelle nanométrique (dimensionnelle, mécanique, magnétique, électrique...). Il présente l'avantage de pouvoir imaginer dans différents milieux, notamment en phase liquide, ce qui le rend plus polyvalent que le microscope électronique et parfaitement adapté aux études en milieux biologiques. Cette technique a rapidement démontré son potentiel pour la visualisation et la caractérisation de membranes artificielles et est aujourd'hui devenue une instrumentation de premier rang pour l'étude de surfaces biologiques comme les bicouches supportées [215-220]. Nous exploiterons le potentiel de l'AFM dans ce qui fera l'objet des chapitres 3 et 4 de ce manuscrit.

### Principe de fonctionnement

Doté d'une fine pointe dont l'extrémité possède des dimensions nanométriques, un microlevier flexible (cantilevier ou *cantilever* en anglais) généralement composé de nitrure de silicium, balaye la surface d'un échantillon pour définir sa topographie dans les dimensions XYZ ce qui permet d'obtenir une image tridimensionnelle de sa surface. Le déplacement du levier au-dessus de la surface de l'échantillon est assuré par un dispositif de balayage piézoélectrique (*scanners*) extrêmement précis. Un ensemble de forces s'applique sur la pointe lorsqu'elle est en contact avec l'échantillon ou très près de sa surface (cf. **figure 1.24**). On distingue les forces d'interaction coulombiennes, les forces de van der Waals, les forces capillaires et les forces magnétiques (si la pointe est recouverte d'un matériau magnétique). Il est important de noter qu'en milieu liquide, les forces capillaires disparaissent, la pointe étant complètement immergée, et des forces électrostatiques entre la pointe et l'échantillon s'appliquent. Comme ces forces n'ont pas toutes la même portée, leur grandeur dépend de la distance entre la surface et la pointe. À longue distance, ce sont les forces de van der Waals qui dominent ; elles s'exercent jusqu'à 10 nm de distance de l'échantillon. Lorsque la pointe est près ou en contact avec la surface, ce sont les interactions coulombiennes, liées aux répulsions entre les nuages électroniques des atomes de la pointe et ceux de la surface, qui prévalent. La résultante de l'ensemble de ces forces participe à faire varier la déflexion de la pointe. Pour mesurer ces variations, un faisceau laser est focalisé sur le dos du levier et sa réflexion est enregistrée par un quadrant à diodes photoélectriques segmentées (généralement en quatre quadrants), comme illustré sur la **figure 1.24, A**. La déviation du faisceau réfléchi permet de

mesurer les mouvements de déflexion verticale de la pointe lors de son déplacement sur l'échantillon. La déflexion globale est toutefois maintenue constante grâce à une boucle de rétrocontrôle qui ajuste la position verticale de la pointe en continu lors du balayage ce qui permet de mesurer la hauteur du levier en tous points, d'obtenir des informations importantes sur l'échantillon (module d'élasticité, propriétés adhésives...), mais aussi de protéger l'intégrité du levier et celle de l'échantillon. En balayant la surface ligne par ligne, on peut ainsi reconstruire le profil de hauteur de l'échantillon et en reconstituer l'image.



**Figure 1.24** - Principe de fonctionnement de l'AFM. **A)** est une représentation schématique du principe de fonctionnement de l'AFM et **B)**, un diagramme illustrant les variations de forces en fonction de la distance entre la pointe et la surface. Images reprises et modifiées avec permission de [221] et de [222] respectivement.

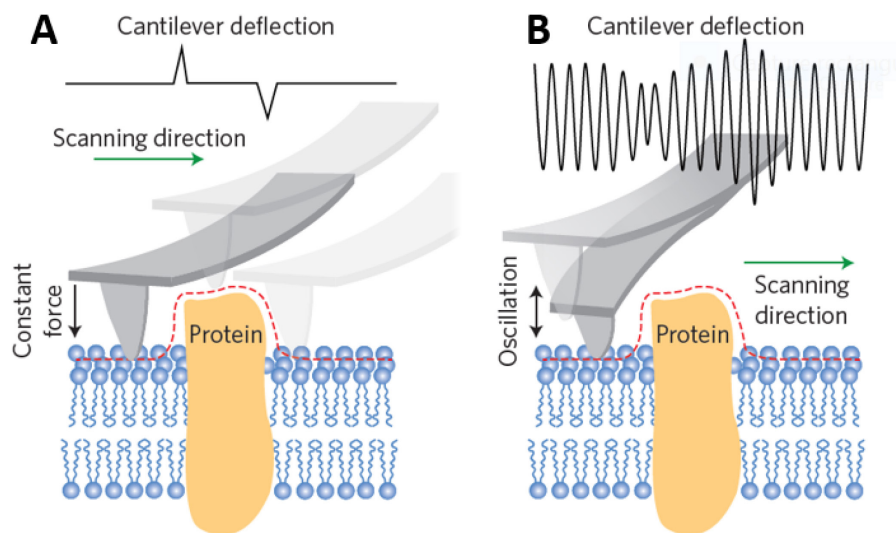
### Principaux modes d'imagerie

En fonction de la nature des signaux qui sont exploités, on distingue trois principaux modes d'imagerie utilisés pour définir la topographie de l'échantillon.

Le **mode contact** est le premier mode ayant été développé. La pointe se trouve dans une configuration où elle touche l'échantillon et se trouve alors dans le régime répulsif du potentiel. Lors du balayage, on peut faire le choix de maintenir la déflexion (force normale exercée par la pointe) constante avec la boucle de rétrocontrôle ; le dispositif de balayage vertical ajuste alors la hauteur de la pointe. Une autre méthode, utilisant des temps d'acquisition plus courts, consiste à maintenir la hauteur du levier constante, prise en valeur de consigne, et à mesurer la déflexion exercée par la surface. Bien que facile d'utilisation, ce mode n'est cependant pas adapté à tous les échantillons. En effet, si la force normale appliquée par la pointe peut être minimisée (dizaines de pN), les forces exercées latéralement peuvent être considérables, ce qui peut endommager de manière irréversible les matériaux mous, notamment les échantillons biologiques [223].

Le **mode contact intermittent** (ou *tapping mode* en anglais) a été introduit pour pallier cette limite [224, 225]. Un potentiel est appliqué pour faire vibrer la pointe à une fréquence proche de sa fréquence de résonance intrinsèque. Une boucle de rétrocontrôle maintient la hauteur du levier à sa fréquence d'oscillation. De cette manière, lorsque l'échantillon se trouve à portée du levier, la pointe n'interagit que périodiquement avec la surface. Grâce à la brièveté du contact ( $< 1$  ms), les forces verticales et latérales sont considérablement réduites ce qui présente un atout particulier pour l'étude d'échantillons déformables [224, 226]. Le paramètre utilisé en consigne est ici l'amplitude d'oscillation.

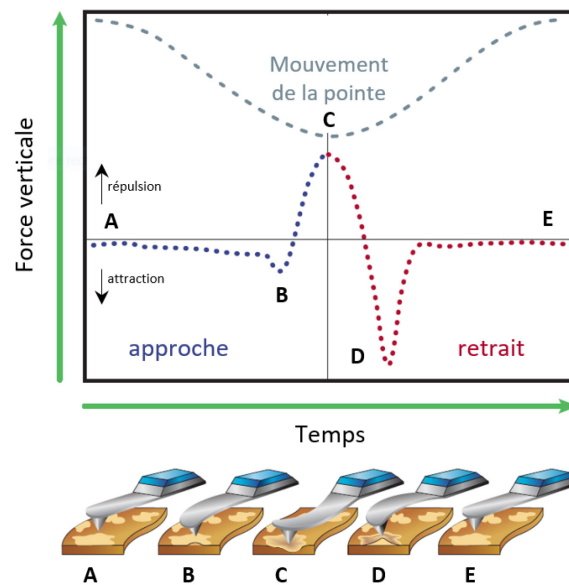
Les deux modes d'imagerie précédemment cités sont représentés à la **figure 1.25**.



**Figure 1.25** - Représentation des principes de fonctionnement du mode contact (A) et du mode contact intermittent (B) sur une membrane. Image reprise avec permission de [227].

Le dernier mode que nous aborderons ici est le **mode nanomécanique**, ou imagerie multiparamétrique, qui combine les avantages du mode contact intermittent avec la spectroscopie de force pour enregistrer en chaque point la force en fonction de la distance pointe/surface sous la forme d'une courbe force-distance [223]. Cette technologie est relativement récente et sa dénomination diffère en fonction des constructeurs de microscope. La firme Bruker par exemple, emploie le nom de *PeakForce Tapping* (PFT), dans lequel la pointe adopte une trajectoire sinusoïdale passant de pixel à pixel. Ce mode a le potentiel d'adapter continuellement la déflexion exercée par la pointe en fonction de la hauteur du levier, ce qui donne la possibilité de contrôler précisément la force exercée avec une grande sensibilité. Les forces de cisaillement étant réduites, la possibilité d'imager des échantillons mous est préservée. Grâce aux courbes de force enregistrées, le mode permet d'obtenir une cartographie des propriétés mécaniques de l'échantillon (module d'élasticité, adhésion, déformation...) en parallèle de sa topographie. Un exemple de courbe de forces lors de l'approche et du retrait de

la pointe est représenté à la **figure 1.26**. Contrôlée par un scanner à balayage vertical, le cantilevier s’approche progressivement de la surface, du point A au point de contact B. Des forces attractives entre la pointe et la surface opèrent généralement à très courte distance. Le cantilevier applique ensuite une force croissante jusqu’à atteindre une valeur de consigne au point C, le scanner se retire ensuite de la surface ; des forces d’adhésion maintiennent la pointe en contact avec la surface jusqu’à atteindre un point de détachement en D. Le cantilevier retrouve ensuite son état initial.



**Figure 1.26** - Illustration d’une courbe de force lors d’un cycle d’approche-retrait obtenue avec le mode PFT. Image reprise et modifiée avec permission de [228].

Dans le cadre de la thèse, nous avons principalement utilisé le mode *PeakForce Tapping* dans les chapitres 3 et 4 parce qu’il est parfaitement adapté à l’étude de bicouches supportées en milieu physiologique mais aussi pour la diversité des informations qu’il peut apporter [229].

### 1.4.3 Techniques de caractérisation de taille.

La taille des objets est une grandeur physique déterminante pour la caractérisation de l’état d’un système. Il est donc important de savoir la mesurer avec précision. Ainsi, nous pouvons déterminer les dimensions, étudier la stabilité d’une suspension quelconque dans le temps (liposomes, nanoparticules, etc...) et différencier des populations au sein d’un échantillon polydisperse, etc...

#### 1.4.3.A Diffusion dynamique de la lumière

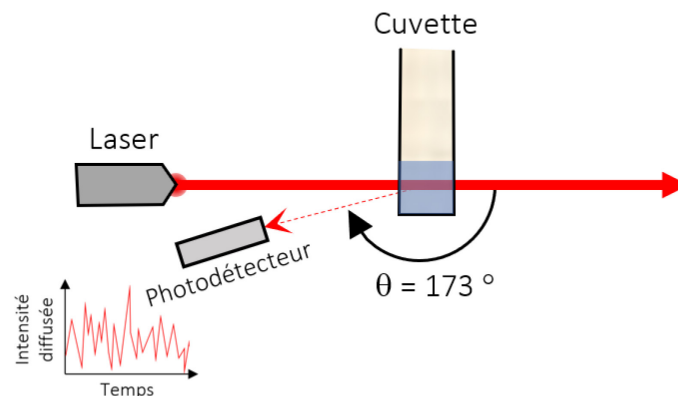
Les méthodes généralement employées pour caractériser la taille d’échantillons aux dimensions submicrométriques exploitent le phénomène de diffusion de la lumière. La technique la plus couramment utilisée est la spectroscopie par corrélation de photons



usuellement appelée diffusion dynamique de la lumière (DLS, pour *dynamic light scattering* en anglais). Elle permet de mesurer des tailles comprises entre le nanomètre et le micromètre.

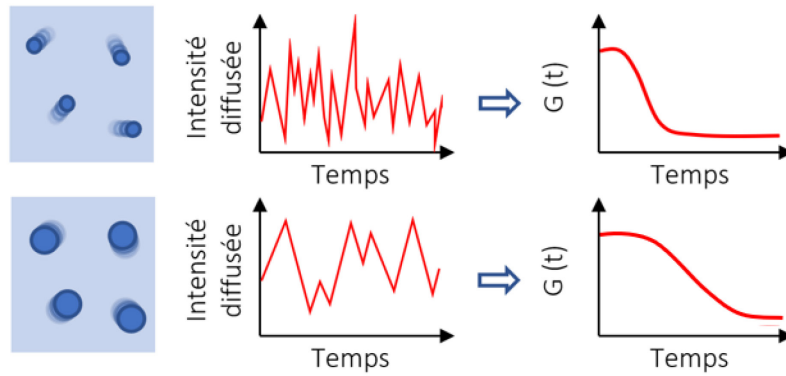
### Principe de fonctionnement

L'instrument de DLS est équipé d'un laser hélium-néon (émettant à 633 nm) dont le faisceau est focalisé sur un volume de solution donné contenu dans une cuvette. La lumière incidente est majoritairement transmise par la solution mais lorsque celle-ci contient des macromolécules ou des particules en suspension, certains photons sont diffusés dans toutes les directions de l'espace par ces objets (diffusion de Rayleigh). Comme illustré à la **figure 1.27**, un photodétecteur, généralement placé à un angle de  $173^\circ$  par rapport à la lumière incidente, mesure les variations de l'intensité de la lumière diffusée en fonction du temps.



**Figure 1.27** - Représentation schématique d'un appareil de DLS.

En solution, ces objets sont soumis au mouvement brownien : ils diffusent de manière translationnelle sous l'effet de l'agitation thermique. En fonction de leurs tailles, ils ne se meuvent pas à la même vitesse ; plus les objets sont petits, plus ils se déplacent rapidement. Cette propriété impacte directement la variation de l'intensité diffusée qui va fluctuer de manière plus importante que dans le cas de plus gros objets. Un traitement mathématique est alors appliqué à la variation de l'intensité lumineuse pour déterminer à quelle échelle de temps celle-ci fluctue. Pour ceci, le signal associé à la variation de l'intensité lumineuse va être comparé après un certain laps de temps ; la corrélation de ces deux signaux d'intensité diffusée décroît de manière exponentielle en fonction du temps. Mathématiquement, cette comparaison est décrite par une fonction d'autocorrélation  $G$ . Dans le cas de particules relativement petites, la variation de l'intensité diffusée est importante et l'autocorrélation décroît de manière plus rapide que dans le cas de plus grosses particules comme illustré à la **figure 1.28**.



**Figure 1.28** - Illustration de l'influence de la taille sur la variation de l'intensité diffusée et sur la fonction d'autocorrélation G en DLS.

### Détermination du paramètre de taille

Le vecteur d'onde est un paramètre physique qui décrit les propriétés de la lumière diffusée. Il dépend de l'indice de réfraction du milieu  $n$ , de la longueur d'onde du laser  $\lambda$  et de l'angle d'incidence du faisceau  $\theta$  selon la relation suivante :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

En modélisant la courbe associée à la fonction d'autocorrélation, on peut déterminer le temps de relaxation  $\tau$  de la décroissance exponentielle. Grâce à ce paramètre ainsi qu'au vecteur d'onde, on peut directement déterminer le coefficient de diffusion  $D$  qui caractérise le mouvement translationnel des objets avec la relation ci-dessous :

$$D = \frac{1}{2q^2\tau}$$

Enfin, à partir de ce coefficient et en considérant les objets globalement sphériques, l'instrument de DLS détermine le rayon hydrodynamique  $R_H$  des objets en utilisant l'équation de Stokes-Einstein où  $k_B$ ,  $T$  et  $\eta_0$  sont respectivement la constante de Boltzmann, la température et la viscosité du milieu [230] :

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D}$$

A noter que cette grandeur surestime légèrement la taille des objets car elle prend en compte la couche diffuse qui englobe ces objets.

La DLS est une technique d'analyse de routine dans les laboratoires grâce de nombreux avantages. La technique permet de mesurer la taille des objets avec précision de manière rapide

et non destructive. Elle opère sur une large gamme de concentrations et ne nécessite pas de préparation d'échantillon particulière. Elle présente cependant des limites, notamment lorsque l'échantillon est polydisperse. La technique manque également de précision lorsque les objets en solution ont des tailles inférieures à la dizaine de nanomètres.

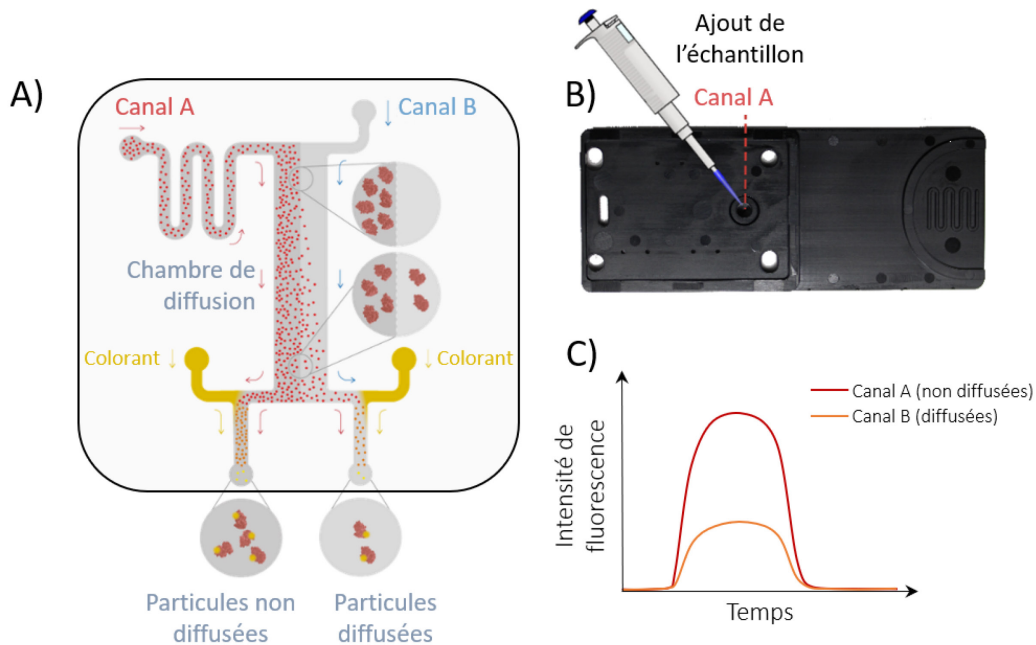
### 1.4.3.B Analyse microfluidique de taille

L'analyse microfluidique de taille (MDS, pour *microfluidic diffusional sizing* en anglais) est une technique récemment développée permettant de mesurer la taille de particules diffusant à travers un flux laminaire microfluidique [231, 232]. Commercialisée par l'entreprise Fluidic Analytics, elle est couramment utilisée dans le but d'analyser l'état de protéines en solution (agrégation, repliement, dénaturation...) [233]. La technique est caractérisée par une grande sensibilité de mesure dans une gamme de 0.3 à 30 nm et se démarque notamment pour les faibles quantités qu'elle requiert pour effectuer ces mesures (de l'ordre du nanogramme de protéine) [234].

#### Principe de fonctionnement

L'appareil de MDS utilise pour circuit microfluidique des plaquettes en copolymère d'oléfine cyclique, constituées de deux canaux (A et B), confectionnées via un procédé de moulage par injection. Une représentation simplifiée de ce circuit et une image de plaquette sont représentées à la **figure 1.29**. Quelques microlitres ( $\sim 5 \mu\text{L}$ ) de la solution contenant les particules d'intérêt sont déposés à l'entrée du canal A à travers lequel celle-ci circule sous l'effet d'une pression. Le canal B est quant à lui traversé par du tampon, introduit à la même pression. Ces deux canaux microfluidiques se rejoignent dans une « chambre de diffusion » à travers laquelle les deux flux se rencontrent et circulent parallèlement. Etant donné l'absence de convection en flux laminaire, les deux flux ne se mélangent pas. Ainsi, le seul phénomène selon lequel les particules introduites dans le canal A peuvent se retrouver dans le canal B est la diffusion. Comme discuté précédemment, le coefficient de diffusion est inversement proportionnel à la taille des objets. Ainsi, plus les objets sont petits plus ils auront tendance à diffuser rapidement ; le nombre de particules ayant diffusées dans le canal B est ainsi d'autant plus important que les particules sont petites. Lorsque les deux flux ont traversé la chambre de diffusion, les deux canaux se séparent et la diffusion entre les flux n'opère plus. Le nombre de particules diffusées est donc fixé et un colorant est ensuite introduit dans chaque canal. Ce colorant forme des complexes fluorescents en fixant spécifiquement les amines primaires contenues dans les particules ou macromolécules. Les fluorescences sont mesurées au niveau de chaque sortie de canal par absorption UV-visible à 440 nm avec un système d'excitation à

diode électroluminescente à 365 nm. Le rapport des intensités de fluorescence mesurées en chaque sortie de canal (canal A pour les particules n'ayant pas diffusées et canal B pour les particules diffusées) permet de déterminer le coefficient de diffusion  $D$  des objets. Un exemple de signal est illustré à la **figure 1.29**. Le rapport des intensités de fluorescence permet ensuite de déterminer le rayon hydrodynamique moyen des particules ayant diffusées [231].



**Figure 1.29** - Principe de fonctionnement de la MDS. **A)** représente schématiquement le trajet que parcourent les particules dans les canaux et **B)** montre le type de plaquettes microfluidiques utilisée durant une expérience de MDS. Figures reprises et modifiées avec permission de [234]. **C)** représente le signal typique délivré par la MDS. La valeur des intensités de fluorescence aux plateaux permet de déterminer le rayon hydrodynamique moyen des objets d'intérêt.

La technique présente plusieurs avantages. L'utilisation de plaquettes microfluidiques permet de minimiser le temps d'analyse ( $\sim 10$  à  $15$  minutes) mais surtout les quantités d'échantillon (concentration de travail de  $10$  à  $500$  nM) réduisant ainsi les coûts [234]. Dans le cas des protéines, elle ne nécessite aucun marquage préalable par des fluorophores pour les analyses, un procédé souvent fastidieux et parfois coûteux. La présence de sondes fluorescentes après marquage peut également influencer les interactions protéines/protéines. La technique est très largement employée pour l'étude de protéines mais elle peut théoriquement être utilisée pour une grande variété d'échantillons, à condition que les particules d'intérêt contiennent des amines primaires, comme certains lipides (POPE, POPS...) ou des nanoparticules fonctionnalisées. *A contrario*, cette propriété représente également une limite, notamment pour l'utilisation de certains tampons comme le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris). Comme la DLS, la MDS donne un rayon hydrodynamique moyen et ne permet pas d'obtenir de l'information sur la polydispersité de l'échantillon. La MDS fera l'objet du chapitre 5.

## 1.5 Situation des articles à la date de dépôt du manuscrit

**Chapitre 2 :** Azouz, M., Therrien, A., Blanchon, C., Buré C., Tokarski C., Lecomte, S., Lafleur, M. ; Lipid selectivity in detergent extraction from bilayers. **Article en préparation.**

Les expériences d'ITC ont été réalisées par Cécile Blanchon et Mehdi Azouz. Alexandre Therrien a réalisé des expériences préliminaires d'extraction et Mehdi Azouz a effectué celles menant aux résultats présentés dans l'étude. C. Buré et C. Tokarski ont permis les expérimentations par LC/MS réalisées par Mehdi Azouz. La rédaction a été effectuée par Mehdi Azouz et Michel Lafleur avec la participation de Sophie Lecomte.

**Chapitre 3 :** Azouz, M., Cullin, C., Lecomte, S., Lafleur, M.; Membrane domain modulation of A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomer interactions with supported lipid bilayers: an atomic force microscopy investigation. *Nanoscale*, 2019, **11**, 20857-20867.

Les expériences ont été réalisées par Mehdi Azouz. La production et la purification des peptides ont été réalisées par Christophe Cullin. La rédaction a été effectuée par Mehdi Azouz, Sophie Lecomte et Michel Lafleur avec la participation de Christophe Cullin.

**Chapitre 4 :** Azouz, M., Feuillie, C., Cullin, C., Molinari, M., Lafleur, M., Lecomte, S. ; Tau protein interactions with membranes : the role of lipids. **Article en préparation.**

Les expériences ont été réalisées par Mehdi Azouz et Cécile Feuillie. La production et la purification de K18 ont été conduites par Christophe Cullin. La rédaction a été effectuée par Mehdi Azouz, Cécile Feuillie, avec la participation de Sophie Lecomte et Michel Lafleur.

**Chapitre 5 :** Azouz, M., Gonin, M., Fiedler, S., Faherty, J., Decossas, M., Cullin, C., Villette, S., Alves, I., Lafleur, M., Lecomte, S., Ciaccafava, A. Microfluidic diffusional sizing probes lipid nanodiscs formation and nanodiscs/peptide interactions. **Article soumis dans BBA Biomembranes en Novembre 2019.**

Les expériences de MDS ont été réalisées par Mathilde Gonin, Mehdi Azouz et Alexandre Ciaccafava. Alexandre Ciaccafava et Marion Decossas ont réalisé les expériences de microscopie électronique. La production et la purification de K18 ont été conduites par Christophe Cullin. La rédaction a été effectuée par Mehdi Azouz, Alexandre Ciaccafava, avec la participation de Sebastian Fiedler, Jonathan Faherty, Sandrine Villette, Isabel Alves, Sophie Lecomte et Michel Lafleur.

## 1.6 Références

1. Alzheimer, A., *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin, 1907. **64**: p. 146-148.
2. World Health Organization, *Dementia*, 2019 [cité en Septembre 2019] ; disponible sur : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
3. France Alzheimer, *La maladie d'Alzheimer en chiffres*, 2019 [cité en Septembre 2019] ; disponible sur : <https://www.francealzheimer.org/maladie-dalzheimer-vos-questions-nos-reponses/maladie-dalzheimer-chiffres/>.
4. Société Alzheimer du Canada, *Une stratégie nationale sur la démence pour le Canada*, 2019 [cité en Septembre 2019] ; disponible sur : <https://alzheimer.ca/fr/Home/Get-involved/Advocacy/Latest-info-stats>.
5. *2019 Alzheimer's disease facts and figures*. Alzheimer's & Dementia, 2019. **15**(3): p. 321-387.
6. Arrighi, H.M., et al., *Lethality of Alzheimer disease and its impact on nursing home placement*. Alzheimer Disease & Associated Disorders, 2010. **24**(1): p. 90-95.
7. National Institute of Aging, *Treatment of Alzheimer's disease*, 2018 [cité en Octobre 2019] ; disponible sur : <https://www.nia.nih.gov/health/how-alzheimers-disease-treated>.
8. Barker, W.W., et al., *Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy Body, Vascular and Frontotemporal Dementia, and Hippocampal Sclerosis in the State of Florida Brain Bank*. Alzheimer Disease & Associated Disorders, 2002. **16**(4): p. 203-212.
9. Bekris, L.M., et al., *Review article: genetics of Alzheimer disease*. Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology, 2010. **23**(4): p. 213-227.
10. Harwood, D.G., et al., *The effect of alcohol and tobacco consumption, and apolipoprotein E genotype, on the age of onset in Alzheimer's disease*. International Journal of Geriatric Psychiatry, 2010. **25**(5): p. 511-518.
11. Kepp, K.P., *Ten challenges of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2017. **55**(2): p. 447-457.
12. Itzhaki, R.F., et al., *Microbes and Alzheimer's disease*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2016. **51**(4): p. 979-984.
13. Sochocka, M., K. Zwolińska, and J. Leszek, *The infectious etiology of Alzheimer's disease*. Current neuropharmacology, 2017. **15**(7): p. 996-1009.
14. Meyer, K.C., *Lung infections and aging*. Ageing Research Reviews, 2004. **3**(1): p. 55-67.
15. Forloni, G., et al., *Alzheimer's disease, oligomers, and inflammation*. Journal of Alzheimer's Disease, 2018. **62**(3): p. 1261-1276.

16. Walker, K.A., et al., *Midlife systemic inflammatory markers are associated with late-life brain volume*. The ARIC study, 2017. **89**(22): p. 2262-2270.
17. Delacourte, A. and A. Defossez, *Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments*. Journal of the Neurological Sciences, 1986. **76**(2): p. 173-186.
18. Lee, V.M.Y. and J.Q. Trojanowski, *Neurodegenerative tauopathies: human disease and transgenic mouse models*. Neuron, 1999. **24**(3): p. 507-510.
19. Lee, V.M.Y., M. Goedert, and J.Q. Trojanowski, *Neurodegenerative tauopathies*. Annual Review of Neuroscience, 2001. **24**(1): p. 1121-1159.
20. Näslund, J., et al., *Correlation between elevated levels of amyloid  $\beta$ -Peptide in the brain and cognitive decline*. JAMA, 2000. **283**(12): p. 1571-1577.
21. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1984. **120**(3): p. 885-890.
22. Masters, C.L., et al., *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985. **82**(12): p. 4245-4249.
23. Brion, J.P., *Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease*. European Neurology, 1998. **40**(3): p. 130-140.
24. Wischik, C.M., et al., *Isolation of a fragment of Tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988. **85**(12): p. 4506-4510.
25. Rohn, T.T., *The triggering receptor expressed on myeloid cells 2: "TREM-ming" the inflammatory component associated with Alzheimer's disease*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2013. **2013**: p. 8.
26. Perrin, R.J., A.M. Fagan, and D.M. Holtzman, *Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease*. Nature, 2009. **461**(7266): p. 916-922.
27. Selkoe, D.J. and J. Hardy, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years*. EMBO Mol Med, 2016. **8**(6): p. 595-608.
28. Bateman, R.J., et al., *Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease*. New England Journal of Medicine, 2012. **367**(9): p. 795-804.
29. Dobson, C.M., *Protein misfolding, evolution and disease*. Trends in Biochemical Sciences, 1999. **24**(9): p. 329-332.
30. Dobson, C.M., *Protein folding and misfolding*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 884-890.
31. Kang, J., et al., *The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor*. Nature, 1987. **325**(6106): p. 733-736.

32. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. Science, 2002. **297**(5580): p. 353-6.
33. Hardy, J. and G. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. Science, 1992. **256**(5054): p. 184-185.
34. Shoji, M., et al., *Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing*. Science, 1992. **258**(5079): p. 126-129.
35. Salbaum, J.M. and F.H. Ruddle, *Embryonic expression pattern of amyloid protein precursor suggests a role in differentiation of specific subsets of neurons*. Journal of Experimental Zoology, 1994. **269**(2): p. 116-127.
36. Turner, P.R., et al., *Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory*. Progress in Neurobiology, 2003. **70**(1): p. 1-32.
37. Plummer, S., et al., *The neuroprotective properties of the Amyloid Precursor Protein following traumatic brain injury*. Aging and disease, 2016. **7**(2): p. 163-179.
38. Chasseigneaux, S. and B. Allinquant, *Functions of A $\beta$ , sAPP $\alpha$  and sAPP $\beta$  : similarities and differences*. Journal of Neurochemistry, 2012. **120**(s1): p. 99-108.
39. Seubert, P., et al., *Isolation and quantification of soluble Alzheimer's  $\beta$ -peptide from biological fluids*. Nature, 1992. **359**(6393): p. 325-327.
40. Kumar, D.K.V., et al., *Amyloid- $\beta$  peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease*. Science translational medicine, 2016. **8**(340): p. 340ra72-340ra72.
41. Eimer, W.A., et al., *Alzheimer's disease-associated  $\beta$ -Amyloid is rapidly seeded by herpesviridae to protect against brain infection*. Neuron, 2018. **99**(1): p. 56-63.e3.
42. Gosztyla, M.L., H.M. Brothers, and S.R. Robinson, *Alzheimer's amyloid-beta is an antimicrobial peptide: a review of the evidence*. J Alzheimers Dis, 2018. **62**(4): p. 1495-1506.
43. Qi-Takahara, Y., et al., *Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2005. **25**(2): p. 436-445.
44. Jarrett, J.T., E.P. Berger, and P.T. Lansbury, *The carboxy terminus of the .beta. amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Biochemistry, 1993. **32**(18): p. 4693-4697.
45. Gu, L. and Z. Guo, *Alzheimer's A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides form interlaced amyloid fibrils*. Journal of neurochemistry, 2013. **126**(3): p. 305-311.
46. Iwatsubo, T., et al., *Visualization of A $\beta$ 42-43 and A $\beta$ 40 in senile plaques with end-specific A $\beta$  monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A $\beta$ 42(43)*. Neuron, 1994. **13**(1): p. 45-53.



47. Mayeux, R., et al., *Plasma amyloid  $\beta$ -peptide 1–42 and incipient Alzheimer's disease*. Annals of Neurology, 1999. **46**(3): p. 412-416.
48. Borchelt, D.R., et al., *Familial Alzheimer's disease–linked Presenilin 1 variants elevate  $A\beta$ 1–42/1–40 ratio in vitro and in vivo*. Neuron, 1996. **17**(5): p. 1005-1013.
49. Eckman, C.B., et al., *A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of  $A\beta$ 42(43)*. Human Molecular Genetics, 1997. **6**(12): p. 2087-2089.
50. Nilsson, M.R., *Techniques to study amyloid fibril formation in vitro*. Methods, 2004. **34**(1): p. 151-160.
51. Biancalana, M. and S. Koide, *Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils*. Biochimica et biophysica acta, 2010. **1804**(7): p. 1405-1412.
52. Krebs, M.R.H., E.H.C. Bromley, and A.M. Donald, *The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications*. Journal of Structural Biology, 2005. **149**(1): p. 30-37.
53. Naiki, H., et al., *Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine T*. Analytical Biochemistry, 1989. **177**(2): p. 244-249.
54. Serpell, L.C., *Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2000. **1502**(1): p. 16-30.
55. Gremer, L., et al., *Fibril structure of amyloid- $\beta$ (1–42) by cryo–electron microscopy*. Science, 2017. **358**(6359): p. 116-119.
56. Harrison, R.S., et al., *Amyloid peptides and proteins in review*, in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, S.G. Amara, et al., Editors. 2007, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-77.
57. Wälti, M.A., et al., *Atomic-resolution structure of a disease-relevant  $A\beta$ (1–42) amyloid fibril*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(34): p. E4976-E4984.
58. Lührs, T., et al., *3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(48): p. 17342-17347.
59. Borlikova, G.G., et al., *Alzheimer brain-derived amyloid  $\beta$ -protein impairs synaptic remodeling and memory consolidation*. Neurobiology of aging, 2013. **34**(5): p. 1315-1327.
60. Fändrich, M., M. Schmidt, and N. Grigorieff, *Recent progress in understanding Alzheimer's  $\beta$ -amyloid structures*. Trends in biochemical sciences, 2011. **36**(6): p. 338-345.
61. Williams, T.L. and L.C. Serpell, *Membrane and surface interactions of Alzheimer's  $A\beta$  peptide – insights into the mechanism of cytotoxicity*. The FEBS Journal, 2011. **278**(20): p. 3905-3917.

62. Nelson, P.T., et al., *Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 2012. **71**(5): p. 362-381.
63. Dickson, D.W., *The Pathogenesis of Senile Plaques*. Journal of neuropathology & experimental neurology, 1997. **56**(4): p. 321-339.
64. Esparza, T.J., et al., *Amyloid- $\beta$  oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls*. Annals of neurology, 2013. **73**(1): p. 104-119.
65. Walsh, D.M., et al., *Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 535-539.
66. Shankar, G.M., et al., *Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory*. Nature Medicine, 2008. **14**(8): p. 837-842.
67. Pike, C.J., et al., *In vitro aging of  $\beta$ -amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity*. Brain Research, 1991. **563**(1): p. 311-314.
68. Shankar, G.M., et al., *Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2007. **27**(11): p. 2866-2875.
69. Kaye, R., et al., *Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis*. Science, 2003. **300**(5618): p. 486-489.
70. Lacor, P.N., et al.,  *$A\beta$  oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2007. **27**(4): p. 796-807.
71. Klyubin, I., et al., *Amyloid  $\beta$  protein immunotherapy neutralizes  $A\beta$  oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo*. Nature Medicine, 2005. **11**(5): p. 556-561.
72. O'Malley, Tiernan T., et al.,  *$A\beta$  dimers differ from monomers in structural propensity, aggregation paths and population of synaptotoxic assemblies*. Biochemical Journal, 2014. **461**(3): p. 413-426.
73. Kaye, R., et al., *Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer*. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(7): p. 4230-4237.
74. Gong, Y., et al., *Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric  $A\beta$  ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(18): p. 10417-10422.
75. Vignaud, H., et al., *A structure-toxicity study of  $A\beta$ 42 reveals a new anti-parallel aggregation pathway*. PloS one, 2013. **8**(11): p. e80262-e80262.

76. Liu, C., et al., *Out-of-register  $\beta$ -sheets suggest a pathway to toxic amyloid aggregates*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(51): p. 20913-20918.
77. Tay, W.M., et al., *The Alzheimer's amyloid- $\beta$ (1–42) peptide forms off-pathway oligomers and fibrils that are distinguished structurally by intermolecular organization*. Journal of Molecular Biology, 2013. **425**(14): p. 2494-2508.
78. Stroud, J.C., et al., *Toxic fibrillar oligomers of amyloid- $\beta$  have cross- $\beta$  structure*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(20): p. 7717-7722.
79. Cerf, E., et al., *Antiparallel  $\beta$ -sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid  $\beta$ -peptide*. Biochemical Journal, 2009. **421**(3): p. 415-423.
80. Berthelot, K., C. Cullin, and S. Lecomte, *What does make an amyloid toxic: morphology, structure or interaction with membrane?* Biochimie, 2013. **95**(1): p. 12-9.
81. Celej, María S., et al., *Toxic prefibrillar  $\alpha$ -synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel  $\beta$ -sheet structure*. Biochemical Journal, 2012. **443**(3): p. 719-726.
82. Knaus, K.J., et al., *Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization*. Nature Structural Biology, 2001. **8**(9): p. 770-774.
83. Breydo, L. and V.N. Uversky, *Structural, morphological, and functional diversity of amyloid oligomers*. FEBS Letters, 2015. **589**(19, Part A): p. 2640-2648.
84. Henry, S., et al., *Interaction of  $A\beta$ 1–42 amyloids with lipids promotes “off-pathway” oligomerization and membrane damage*. Biomacromolecules, 2015. **16**(3): p. 944-950.
85. Drubin, D., S. Kobayashi, and M. Kirschner, *Association of Tau protein with microtubules in living cells*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1986. **466**(1): p. 257-268.
86. Ittner, L.M. and J. Götz, *Amyloid- $\beta$  and Tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease*. Nature Reviews Neuroscience, 2011. **12**(2): p. 67-72.
87. Drubin, D.G. and M.W. Kirschner, *Tau protein function in living cells*. The Journal of cell biology, 1986. **103**(6 Pt 2): p. 2739-2746.
88. Avila, J., et al., *Role of Tau protein in both physiological and pathological conditions*. Physiological Reviews, 2004. **84**(2): p. 361-384.
89. Gustke, N., et al., *Domains of Tau protein and interactions with microtubules*. Biochemistry, 1994. **33**(32): p. 9511-9522.
90. Yu, X., et al., *Cross-seeding and conformational selection between three- and four-repeat human Tau proteins*. The Journal of biological chemistry, 2012. **287**(18): p. 14950-14959.
91. Dinkel, P.D., et al., *Variations in filament conformation dictate seeding barrier between three- and four-repeat Tau*. Biochemistry, 2011. **50**(20): p. 4330-4336.

92. Goedert, M., et al., *Multiple isoforms of human microtubule-associated protein Tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease*. Neuron, 1989. **3**(4): p. 519-526.
93. Tapia-Rojas, C., et al., *It's all about Tau*. Progress in Neurobiology, 2019. **175**: p. 54-76.
94. Ait-Bouziad, N., et al., *Discovery and characterization of stable and toxic Tau/phospholipid oligomeric complexes*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1678.
95. Wang, Y. and E. Mandelkow, *Tau in physiology and pathology*. Nature Reviews Neuroscience, 2015. **17**: p. 22.
96. Matsuo, E.S., et al., *Biopsy-derived adult human brain Tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament Tau*. Neuron, 1994. **13**(4): p. 989-1002.
97. Talaga, D., et al., *PIP<sub>2</sub> phospholipid-induced aggregation of Tau filaments probed by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy*. Angew Chem Int Ed Engl, 2018. **57**(48): p. 15738-15742.
98. Schweers, O., et al., *Structural studies of Tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for  $\beta$ -structure*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(39): p. 24290-24297.
99. Jeganathan, S., et al., *The natively unfolded character of Tau and its aggregation to Alzheimer-like Paired Helical Filaments*. Biochemistry, 2008. **47**(40): p. 10526-10539.
100. Uversky, V.N., *What does it mean to be natively unfolded?* European Journal of Biochemistry, 2002. **269**(1): p. 2-12.
101. Li, L., et al., *Structure, stability, and aggregation of Paired Helical Filaments from Tau protein and FTDP-17 mutants probed by tryptophan scanning mutagenesis*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(44): p. 41390-41400.
102. von Bergen, M., et al., *The core of Tau-Paired Helical Filaments studied by Scanning Transmission Electron Microscopy and Limited Proteolysis*. Biochemistry, 2006. **45**(20): p. 6446-6457.
103. von Bergen, M., et al., *Assembly of Tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming  $\beta$  structure*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(10): p. 5129-5134.
104. Mukrasch, M.D., et al., *Sites of Tau important for aggregation populate  $\beta$ -structure and bind to microtubules and polyanions*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(26): p. 24978-24986.
105. Falcon, B., et al., *Tau filaments from multiple cases of sporadic and inherited Alzheimer's disease adopt a common fold*. Acta Neuropathologica, 2018. **136**(5): p. 699-708.

106. Fitzpatrick, A.W.P., et al., *Cryo-EM structures of Tau filaments from Alzheimer's disease*. Nature, 2017. **547**(7662): p. 185-190.
107. Dickson, D.W., et al., *Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans*. Neurobiology of Aging, 1992. **13**(1): p. 179-189.
108. Arriagada, P.V., et al., *Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease*. Neurology, 1992. **42**(3): p. 631-631.
109. De Felice, F.G., et al., *Alzheimer's disease-type neuronal Tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers*. Neurobiology of aging, 2008. **29**(9): p. 1334-1347.
110. Selkoe, D.J. and J. Hardy, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years*. EMBO Molecular Medicine, 2016. **8**(6): p. 595-608.
111. Benilova, I., E. Karran, and B. De Strooper, *The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes*. Nature Neuroscience, 2012. **15**(3): p. 349-357.
112. Butterfield, S.M. and H.A. Lashuel, *Amyloidogenic protein-membrane interactions: mechanistic insight from model systems*. Angewandte Chemie International Edition, 2010. **49**(33): p. 5628-5654.
113. Cebeacauer, M., M. Hof, and M. Amaro, *Impact of GM1 on membrane-mediated aggregation/oligomerization of  $\beta$ -Amyloid: unifying view*. Biophysical Journal, 2017. **113**(6): p. 1194-1199.
114. Eckert, G.P., et al., *Cholesterol Modulates Amyloid  $\beta$ -peptide's Membrane Interactions*. Pharmacopsychiatry, 2003. **36**(S 2): p. 136-143.
115. Puglielli, L., R.E. Tanzi, and D.M. Kovacs, *Alzheimer's disease: the cholesterol connection*. Nature Neuroscience, 2003. **6**(4): p. 345-351.
116. Yu, X. and J. Zheng, *Cholesterol promotes the interaction of Alzheimer  $\beta$ -amyloid monomer with lipid bilayer*. Journal of Molecular Biology, 2012. **421**(4): p. 561-571.
117. Hicks, D., N. Nalivaeva, and A. Turner, *Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling*. Frontiers in Physiology, 2012. **3**(189).
118. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-731.
119. David L. Nelson, M.M.C., *Principles of biochemistry seventh edition*. 2017.
120. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-572.
121. Edidin, M., *Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane*. Trends in Cell Biology, 2001. **11**(12): p. 492-496.
122. Edidin, M., *The state of lipid rafts: from model membranes to cells*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2003. **32**(1): p. 257-283.

123. Simons, K. and W.L.C. Vaz, *Model systems, lipid rafts, and cell membranes*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2004. **33**(1): p. 269-295.
124. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2000. **1**(1): p. 31-39.
125. Simons, K. and M.J. Gerl, *Revitalizing membrane rafts: new tools and insights*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010. **11**(10): p. 688-699.
126. Colin, J., et al., *Membrane raft domains and remodeling in aging brain*. Biochimie, 2016. **130**: p. 178-187.
127. Simons, K. and R. Ehehalt, *Cholesterol, lipid rafts, and disease*. The Journal of Clinical Investigation, 2002. **110**(5): p. 597-603.
128. Ehehalt, R., et al., *Amyloidogenic processing of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor protein depends on lipid rafts*. The Journal of Cell Biology, 2003. **160**(1): p. 113-123.
129. Op Den Kamp, J.A.F., *Chapter 3 The asymmetric architecture of membranes*, in *New Comprehensive Biochemistry*, J.B. Finean and R.H. Michell, Editors. 1981, Elsevier. p. 83-126.
130. Alberts B., J.A., Lewis J., et al., *The Lipid Bilayer*, in *Molecular biology of the cell (4th edition)*. 2002, Garland Science: New York.
131. Yeagle, P.L., *Chapter 2 - The lipids of biological membranes*, in *The Membranes of Cells (Third Edition)*, P.L. Yeagle, Editor. 2016, Academic Press: Boston. p. 27-56.
132. Holthuis, J.C.M., et al., *The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport*. Physiological Reviews, 2001. **81**(4): p. 1689-1723.
133. Basu, I. and C. Mukhopadhyay, *Insights into binding of Cholera toxin to GM1 Containing Membrane*. Langmuir, 2014. **30**(50): p. 15244-15252.
134. Brown, D.A. and E. London, *Structure and sunction of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(23): p. 17221-17224.
135. Filippov, A., G. Orädd, and G. Lindblom, *The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers*. Biophysical journal, 2003. **84**(5): p. 3079-3086.
136. Yeagle, P.L., *Chapter 9 - cholesterol and related sterols: roles in membrane structure and function*, in *The Membranes of Cells (Third Edition)*, P.L. Yeagle, Editor. 2016, Academic Press: Boston. p. 189-218.
137. Ingólfsson, H.I., et al., *Computational lipidomics of the neuronal plasma membrane*. Biophysical Journal, 2017. **113**(10): p. 2271-2280.
138. Dietschy, J.M. and S.D. Turley, *Cholesterol metabolism in the brain*. Current Opinion in Lipidology, 2001. **12**(2): p. 105-112.

139. Di Paolo, G. and T.-W. Kim, *Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond*. Nature Reviews Neuroscience, 2011. **12**(5): p. 284-296.
140. Balazs, D.A. and W. Godbey, *Liposomes for use in gene delivery*. Journal of drug delivery, 2011. **2011**: p. 326497-326497.
141. Israelachvili, J.N., *20 - Soft and biological structures*, in *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)*, J.N. Israelachvili, Editor. 2011, Academic Press: San Diego. p. 535-576.
142. Alecio, M.R., et al., *Use of a fluorescent cholesterol derivative to measure lateral mobility of cholesterol in membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1982. **79**(17): p. 5171-5174.
143. Mouritsen, O.G., *Theoretical models of phospholipid phase transitions*. Chemistry and Physics of Lipids, 1991. **57**(2): p. 179-194.
144. Hjort Ipsen, J., et al., *Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1987. **905**(1): p. 162-172.
145. Milhiet, P.E., M.-C. Giocondi, and C. Le Grimmellec, *AFM imaging of lipid domains in model membranes*. TheScientificWorldJournal, 2003. **3**: p. 59-74.
146. de Almeida, R.F.M., et al., *Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study*. Journal of Molecular Biology, 2005. **346**(4): p. 1109-1120.
147. Kusumi, A., I. Koyama-Honda, and K. Suzuki, *Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts*. Traffic, 2004. **5**(4): p. 213-230.
148. Brameshuber, M., et al., *Imaging of mobile long-lived nanoplatforms in the live cell plasma membrane*. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(53): p. 41765-41771.
149. Yeagle, P.L., *Chapter 8 - Lipid dynamics in membranes*, in *The Membranes of Cells (Third Edition)*, P.L. Yeagle, Editor. 2016, Academic Press: Boston. p. 155-188.
150. Janson, J., et al., *The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles*. Diabetes, 1999. **48**(3): p. 491-498.
151. Yip, C.M. and J. McLaurin, *Amyloid- $\beta$  Peptide Assembly: A Critical Step in Fibrillogenesis and Membrane Disruption*. Biophysical Journal, 2001. **80**(3): p. 1359-1371.
152. Engel, M.F.M., et al., *Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(16): p. 6033-6038.
153. Lal, H.L.R.B.R., *Amyloid  $\beta$  protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology*. The FASEB Journal, 2001. **15**(13): p. 2433-2444.

154. Quist, A., et al., *Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(30): p. 10427-10432.
155. Cheignon, C., et al., *Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease*. Redox biology, 2018. **14**: p. 450-464.
156. Kotler, S.A., et al., *Differences between amyloid- $\beta$  aggregation in solution and on the membrane: insights into elucidation of the mechanistic details of Alzheimer's disease*. Chemical Society Reviews, 2014. **43**(19): p. 6692-6700.
157. Sciacca, M.F.M., et al., *Phosphatidylethanolamine enhances amyloid fiber-dependent membrane fragmentation*. Biochemistry, 2012. **51**(39): p. 7676-7684.
158. Sparr, E., et al., *Islet amyloid polypeptide-induced membrane leakage involves uptake of lipids by forming amyloid fibers*. FEBS Letters, 2004. **577**(1-2): p. 117-120.
159. Shobab, L.A., G.-Y.R. Hsiung, and H.H. Feldman, *Cholesterol in Alzheimer's disease*. The Lancet Neurology, 2005. **4**(12): p. 841-852.
160. Sjögren, M. and K. Blennow, *The link between cholesterol and Alzheimer's disease*. The World Journal of Biological Psychiatry, 2005. **6**(2): p. 85-97.
161. Drolle, E., Ravi M. Gaikwad, and Z. Leonenko, *Nanoscale electrostatic domains in cholesterol-laden lipid membranes create a target for amyloid binding*. Biophysical Journal, 2012. **103**(4): p. L27-L29.
162. Curtain, C.C., et al., *Metal ions, pH, and cholesterol regulate the interactions of Alzheimer's disease Amyloid- $\beta$  peptide with membrane lipid*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(5): p. 2977-2982.
163. Seghezza, S., et al., *Cholesterol drives A $\beta$ (1-42) interaction with lipid rafts in model membranes*. Langmuir, 2014. **30**(46): p. 13934-13941.
164. Di Scala, C., et al., *Interaction of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptides with cholesterol: mechanistic insights into amyloid pore formation*. Biochemistry, 2014. **53**(28): p. 4489-4502.
165. Valdes-Gonzalez, T., J. Inagawa, and T. Ido, *Neuropeptides interact with glycolipid receptors A surface plasmon resonance study*. Peptides, 2001. **22**(7): p. 1099-1106.
166. Fernández-Pérez, E.J., et al., *Role of membrane GMI on early neuronal membrane actions of A $\beta$  during onset of Alzheimer's disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2017. **1863**(12): p. 3105-3116.
167. Matsuzaki, K., *Formation of toxic amyloid fibrils by amyloid  $\beta$ -protein on ganglioside clusters*. International journal of Alzheimer's disease, 2011. **2011**: p. 956104-956104.
168. Yanagisawa, K., *Role of gangliosides in Alzheimer's disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2007. **1768**(8): p. 1943-1951.



169. Wakabayashi, M., et al., *GMI ganglioside-mediated accumulation of amyloid  $\beta$ -protein on cell membranes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **328**(4): p. 1019-1023.
170. Matsuzaki, K., K. Kato, and K. Yanagisawa, *Chapter fourteen - ganglioside-mediated assembly of Amyloid  $\beta$ -protein: roles in Alzheimer's disease*, in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, R.L. Schnaar and P.H.H. Lopez, Editors. 2018, Academic Press. p. 413-434.
171. Cordy, J.M., et al., *The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease (Review)*. Molecular Membrane Biology, 2006. **23**(1): p. 111-122.
172. Vetrivel, K.S. and G. Thinakaran, *Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2010. **1801**(8): p. 860-867.
173. Rushworth, J.V. and N.M. Hooper, *Lipid rafts: linking Alzheimer amyloid- $\beta$  production, aggregation, and toxicity at neuronal membranes*. International Journal of Alzheimer's Disease, 2011. **2011**.
174. Dinkel, P.D., et al., *RNA binds to Tau fibrils and sustains template-assisted growth*. Biochemistry, 2015. **54**(30): p. 4731-4740.
175. Maïza, A., et al., *The role of heparan sulfates in protein aggregation and their potential impact on neurodegeneration*. FEBS Letters, 2018. **592**(23): p. 3806-3818.
176. Shammas, S.L., et al., *A mechanistic model of Tau amyloid aggregation based on direct observation of oligomers*. Nature Communications, 2015. **6**(1): p. 7025.
177. Mari, S.A., et al., *Reversible cation-selective attachment and self-assembly of human Tau on supported brain lipid membranes*. Nano Letters, 2018. **18**(5): p. 3271-3281.
178. Elbaum-Garfinkle, S., T. Ramlall, and E. Rhoades, *The role of the lipid bilayer in Tau aggregation*. Biophysical journal, 2010. **98**(11): p. 2722-2730.
179. Jones, E.M., et al., *Interaction of Tau protein with model lipid membranes induces Tau structural compaction and membrane disruption*. Biochemistry, 2012. **51**(12): p. 2539-2550.
180. Ait-Bouziad, N., et al., *Discovery and characterization of stable and toxic Tau/phospholipid oligomeric complexes*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 1678.
181. Gellermann Gerald, P., et al., *Paired Helical Filaments contain small amounts of cholesterol, phosphatidylcholine and sphingolipids*, in *Biological Chemistry*. 2006. p. 1267.
182. Montes, L.R., et al., *Electroformation of giant unilamellar vesicles from native membranes and organic lipid mixtures for the study of lipid domains under physiological ionic-strength conditions*, in *Liposomes: Methods and Protocols, Volume 2: Biological Membrane Models*, V. Weissig, Editor. 2010, Humana Press: Totowa, NJ. p. 105-114.

183. Denisov, I.G. and S.G. Sligar, *Nanodiscs in membrane biochemistry and biophysics*. Chemical reviews, 2017. **117**(6): p. 4669-4713.
184. McLean, M.A., M.C. Gregory, and S.G. Sligar, *Nanodiscs: a controlled bilayer surface for the study of membrane proteins*. Annual Review of Biophysics, 2018. **47**(1): p. 107-124.
185. Ohashi, R., et al., *Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis*. QJM: An International Journal of Medicine, 2005. **98**(12): p. 845-856.
186. Dörr, J.M., et al., *The styrene–maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research*. European Biophysics Journal, 2016. **45**(1): p. 3-21.
187. Scheidelaar, S., et al., *Molecular model for the solubilization of membranes into nanodisks by styrene maleic Acid copolymers*. Biophysical journal, 2015. **108**(2): p. 279-290.
188. Cuevas Arenas, R., et al., *Influence of lipid bilayer properties on nanodisc formation mediated by styrene/maleic acid copolymers*. Nanoscale, 2016. **8**(32): p. 15016-15026.
189. Knowles, T.J., et al., *Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(22): p. 7484-7485.
190. Tamm, L.K. and H.M. McConnell, *Supported phospholipid bilayers*. Biophysical journal, 1985. **47**(1): p. 105-113.
191. Israelachvili, J.N., *21 - Interactions of biological membranes and structures*, in *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)*, J.N. Israelachvili, Editor. 2011, Academic Press: San Diego. p. 577-616.
192. Castellana, E.T. and P.S. Cremer, *Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design*. Surface Science Reports, 2006. **61**(10): p. 429-444.
193. Cremer, P.S. and S.G. Boxer, *Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports*. The Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(13): p. 2554-2559.
194. Zasadzinski, J., et al., *Langmuir-Blodgett films*. Science, 1994. **263**(5154): p. 1726-1733.
195. Lang, H., C. Duschl, and H. Vogel, *A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces*. Langmuir, 1994. **10**(1): p. 197-210.
196. Heyse, S., et al., *Incorporation of rhodopsin in laterally structured supported membranes: observation of transducin activation with spatially and Time-Resolved Surface Plasmon Resonance*. Biochemistry, 1998. **37**(2): p. 507-522.
197. Tabaei, S.R., et al., *Solvent-assisted lipid self-assembly at hydrophilic surfaces: factors influencing the formation of supported membranes*. Langmuir, 2015. **31**(10): p. 3125-3134.

198. Hohner, A.O., M.P.C. David, and J.O. Rädler, *Controlled solvent-exchange deposition of phospholipid membranes onto solid surfaces*. *Biointerphases*, 2010. **5**(1): p. 1-8.
199. Weirich, K.L., J.N. Israelachvili, and D.K. Fygenson, *Bilayer edges catalyze supported lipid bilayer formation*. *Biophysical journal*, 2010. **98**(1): p. 85-92.
200. Hardy, G.J., R. Nayak, and S. Zauscher, *Model cell membranes: techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2013. **18**(5): p. 448-458.
201. Jass, J., T. Tjärnhage, and G. Puu, *From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study*. *Biophysical journal*, 2000. **79**(6): p. 3153-3163.
202. Attwood, J.S., Y. Choi, and Z. Leonenko, *Preparation of DOPC and DPPC supported planar lipid bilayers for atomic force microscopy and atomic force spectroscopy*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013. **14**(2).
203. Richter, R.P., N. Maury, and A.R. Brisson, *On the effect of the solid support on the interleaflet distribution of lipids in supported lipid bilayers*. *Langmuir*, 2005. **21**(1): p. 299-304.
204. Ostendorf, F., et al., *How flat is an air-cleaved mica surface?* *Nanotechnology*, 2008. **19**(30): p. 305705.
205. Yu, J. and Y. Namba, *Atomic surface roughness*. *Applied Physics Letters*, 1998. **73**(24): p. 3607-3609.
206. Richter, R.P. and A. Brisson, *Characterization of lipid bilayers and protein assemblies supported on rough surfaces by Atomic Force Microscopy*. *Langmuir*, 2003. **19**(5): p. 1632-1640.
207. Pillers, M.A., et al., *Preparation of mica and silicon substrates for DNA origami analysis and experimentation*. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 2015(101): p. e52972-e52972.
208. Richter, R.P. and A. Brisson, *QCM-D on mica for parallel QCM-DAFM studies*. *Langmuir*, 2004. **20**(11): p. 4609-4613.
209. Mandelkow, E.-M. and E. Mandelkow, *Biochemistry and cell biology of Tau protein in neurofibrillary degeneration*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012. **2**(7): p. a006247-a006247.
210. Heerklotz, H. and J. Seelig, *Titration calorimetry of surfactant–membrane partitioning and membrane solubilization*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2000. **1508**(1): p. 69-85.
211. Heerklotz, H., A.D. Tsamaloukas, and S. Keller, *Monitoring detergent-mediated solubilization and reconstitution of lipid membranes by isothermal titration calorimetry*. *Nature Protocols*, 2009. **4**(5): p. 686-697.

212. Heerklotz, H., *Interactions of surfactants with lipid membranes*. Quarterly Reviews of Biophysics, 2008. **41**(3-4): p. 205-264.
213. Lichtenberg, D., H. Ahyayauch, and Félix M. Goñi, *The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers*. Biophysical Journal, 2013. **105**(2): p. 289-299.
214. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic force microscope*. Physical Review Letters, 1986. **56**(9): p. 930-933.
215. Weisenhorn, A.L., et al., *Molecular-resolution images of Langmuir-Blodgett films and DNA by atomic force microscopy*. Langmuir, 1991. **7**(1): p. 8-12.
216. Zasadzinski, J.A., et al., *Atomic force microscopy of hydrated phosphatidylethanolamine bilayers*. Biophysical journal, 1991. **59**(3): p. 755-760.
217. Dufrêne, Y.F. and G.U. Lee, *Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2000. **1509**(1): p. 14-41.
218. Giocondi, M.-C., et al., *Surface topography of membrane domains*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2010. **1798**(4): p. 703-718.
219. H G Hansma, a. and J.H. Hoh, *Biomolecular imaging with the atomic force microscope*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1994. **23**(1): p. 115-140.
220. Picas, L., P.-E. Milhiet, and J. Hernández-Borrell, *Atomic force microscopy: A versatile tool to probe the physical and chemical properties of supported membranes at the nanoscale*. Chemistry and Physics of Lipids, 2012. **165**(8): p. 845-860.
221. Rivoal, J.C. and C. Frétygny, *Microscopie à force atomique*. Techniques de L'ingénieur, 2005.
222. Kaemmer, S., *Introduction to Brukers ScanAsyst and PeakForce Tapping atomic force microscopy Technology*. 2011.
223. Xu, K., et al., *Recent development of PeakForce Tapping mode atomic force microscopy and its applications on nanoscience*, in *Nanotechnology Reviews*. 2018. p. 605.
224. Zhong, Q., et al., *Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy*. Surface Science Letters, 1993. **290**: p. L688-L692.
225. Magonov, S.N., V. Elings, and M.H. Whangbo, *Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy*. Surface Science, 1997. **375**(2): p. L385-L391.
226. Putman, C.A., et al., *Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy*. Biophysical journal, 1994. **67**(4): p. 1749-1753.
227. Dufrêne, Y.F., et al., *Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology*. Nature Nanotechnology, 2017. **12**: p. 295.

228. Pittenger, B.E., Natalia; Su, Chanmin. *Quantitative mechanical property mapping at the nanoscale with PeakForce QNM*, 2019 [cité en Octobre 2019] ; disponible sur : <https://www.bruker.com/>.
229. Lv, Z., et al., *Supported lipid bilayers for atomic force microscopy studies*, in *Nanoscale Imaging: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology, 2018. 1814: p. 129-143.
230. Goldberg, W.I., *Dynamic light scattering*. American Journal of Physics, 1999. **67**(12): p. 1152-1160.
231. Yates, E.V., et al., *Latent analysis of unmodified biomolecules and their complexes in solution with attomole detection sensitivity*. Nature Chemistry, 2015. **7**(10): p. 802-809.
232. Arosio, P., et al., *Microfluidic diffusion analysis of the sizes and interactions of proteins under native solution conditions*. ACS Nano, 2016. **10**(1): p. 333-341.
233. Charmet, J., P. Arosio, and T.P.J. Knowles, *Microfluidics for protein biophysics*. Journal of Molecular Biology, 2018. **430**(5): p. 565-580.
234. Fluidic Analytics, *Fluidity One User Manual*, 2019 [cité en Janvier 2019] ; disponible sur : <https://www.fluidic.com/resources/fluidity-one-user-manual/>.

# Chapitre 2 : Lipid selectivity in detergent extraction from bilayers

Mehdi Azouz, Alexandre Therrien, Cécile Blanchon, Corinne Buré, Caroline Tokarski, Sophie Lecomte, Michel Lafleur.

**Article en préparation**

## 2.1 Abstract

Despite numerous studies on detergent-induced solubilisation of membranes and on the underlying mechanisms associated with this process, very little is known regarding the selectivity of detergents for lipids during their extraction from membranes. To get insight about this phenomenon, solubilisation of model bilayers prepared from binary lipid mixtures by different detergents was examined. Three commonly used detergents were investigated: the non-ionic Triton X-100 (TX), the negatively-charged sodium dodecylsulfate (SDS), and the positively-charged *n*-dodecyltrimethylammonium chloride (DTAC). Three model membranes were used in order to identify if specific intermolecular interactions can lead the lipid selectivity: bilayers made of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), of a binary mixture of POPC and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE), and of a binary mixture of POPC and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG). Therefore, it was possible to describe systems presenting a combination of detergents bearing different charges with bilayers with different polymorphic propensities and charge. First, Isothermal Calorimetry (ITC) titrations were used to build the phase diagrams associated with the investigated systems in order to characterize the conditions leading to vesicles solubilisation. Second, in conditions for which partial solubilisation was observed, the composition of the extracted lipid phase was quantified with Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC/MS) to elucidate whether a lipid selectivity occurred in the solubilisation process. On one hand, it is found that repulsive or attractive electrostatic interactions did not lead to any lipid selectivity. On the other hand, POPE was systematically less extracted than POPC, regardless of the detergent nature. We propose that this lipid selectivity is inherent to the molecular shape of POPE unsuited for micelles curvature properties.

## 2.2 Introduction

Lipid extraction from membranes by amphipathic molecules takes place in crucial steps of several biological processes, and for some of them, lipid selectivity is decisive. For instance, the bovine seminal plasma contains some proteins (e.g. BSP1) that interact with sperm membranes and that cause a selective lipid efflux; BSP1 preferentially extracts phosphatidylcholines and cholesterol from sperm membranes, modulating their lipid composition and raft configuration, a change that is essential for the sperm maturation [1, 2]. Analogously, Apolipoprotein A1 (ApoA1), the most abundant protein in the High-Density Lipoproteins (HDL), has been shown to have a direct participation in lipid efflux from cells and cholesterol plaques [3, 4]. Its capacity to extract cholesterol with some specificity plays a pivotal role in mediating reversed cholesterol transport and therefore, in the control of atherosclerosis [5]. Our understanding relative to the mechanisms by which membrane-interacting species can selectively extract a type of lipid from a complex membrane is very limited.

Membrane lipids generally display a very low critical aggregation concentration and, as a consequence, their efflux from membranes need to be chaperoned by specific molecular species. Surfactants or detergents constitute certainly the most-studied class of simple molecules that can induce lipid extraction from membranes; [6-11] are just a few examples. Detergents are amphipathic yet more water-soluble molecules than lipids, exhibiting a limit of solubility in the micro to the millimolar range [12]. The conical shape of their molecular structure makes them curvophilic [13]. Unlike most phospholipids, which form lamella as a consequence of their cylindrical shape, detergents self-assemble above their critical micellar concentration (CMC) into micelles [14]. The partitioning of detergent monomers into phospholipid bilayers leads to the remodelling of the membranes; when present in sufficient proportions, detergents cause the solubilisation of lipid bilayers and the formation of mixed micelles [6]. Many research efforts have been devoted to understand and describe the mechanisms lying behind the interactions of detergent with model membranes, leading to their fragmentation [13, 15-19]. However, even in the "simple" case of lipid bilayers fragmentation by detergents, the possibility of specific lipids extraction is an aspect that has been practically unexplored.

In the present work, we investigated the phenomenon of membrane solubilisation with 3 commonly used detergents: the non-ionic Triton X-100 (TX), the negatively-charged sodium dodecylsulfate (SDS), and the positively-charged n-dodecyltrimethylammonium chloride

DTAC. Three model membranes were used in order to identify if specific intermolecular interactions can lead the lipid selectivity: bilayers made of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), of a binary mixture of POPC and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE), and of a binary mixture of POPC and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG). These binary mixtures are known to form homogenous bilayers in the fluid phase [20, 21]. Therefore, the work provides the description of systems presenting a combination of detergents bearing different charges with bilayers with different physicochemical properties: polymorphic propensities (POPC is a bilayer-forming lipid whereas POPE forms inverted hexagonal ( $H_{II}$ ) phase above 70 °C) and charge (POPG is an anionic lipid).

As a first step, we established the phase diagrams of the different systems using Isothermal Titration Calorimetry (ITC). From these diagrams, it was possible to identify conditions for which detergents induced partial bilayer solubilisation, leading to the coexistence of detergent-containing bilayers and detergent/phospholipid mixed micelles; lipid specificity of the extraction could be determined in these conditions. In the simplest cases, bilayer solubilisation by detergents follows a three-stage model that was postulated few decades ago [22]. First, the addition of small amounts of surfactant molecules leads to their generally partial partitioning between the lipid bilayers and the aqueous media, where they remain in a monomeric state. Second, once the content of detergent incorporated into the bilayer exceeds a saturation limit, membranes are partly solubilised into submicrometric micellar units that coexist with detergent-saturated lipid bilayers. The onset of mixed micelles formation is identified by a detergent to lipid concentrations ratio  $R_{sat}$  [18]. This value hence marks the saturation of bilayers with surfactants molecules and the beginning of the coexistence range. Further addition of detergent leads to the progressive solubilisation of the lipid bilayers until a complete bilayer fragmentation is achieved. This step is reached at a detergent to lipid ratio called  $R_{sol}$ . Beyond, additional detergent molecules are incorporated into the mixed micelles. The ability of ITC to detect lamella-to-micelle phase transition upon the addition of a detergent makes it a technique of choice for the determination of the lipid-detergent phase boundaries and the built of detergent/lipid phase diagrams [15, 16, 23, 24]. Once the conditions for which bilayers and mixed micelles coexisted were identified, samples corresponding to such coexistence were prepared and a lipid analysis was then performed with LC/MS to compare the composition of the lipid efflux (micelles), of the remaining bilayers, and of the original bilayers. These results allowed us to determine features that control selective detergent-induced lipid extraction from bilayers.



## 2.3 Materials and methods

### 2.3.1 Materials

POPC, POPE, and POPG were purchased from Avanti Polar Lipids. NaCl, SDS and DTAC were purchased from Sigma whereas TX, and tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) were obtained from Acros Organics and Anachemia, respectively. All aqueous solutions were prepared with ultra-pure water (18 M $\Omega$  cm).

### 2.3.2 Preparation of large unilamellar vesicles and detergent suspensions

Individual lipids were mixed to obtain the desired molar ratio and the organic solvent was first evaporated under a stream of nitrogen before being further dried under vacuum overnight. The resulting lipid films were hydrated with a Tris buffer (10 mM), containing 100 mM NaCl, pH 7.4, in order to obtain a lipid concentration of 10 mM. The suspensions were then submitted to five freeze-and-thaw cycles (from liquid nitrogen temperature to 40 °C) to form multilamellar vesicles (MLVs). Large unilamellar vesicles (LUVs) were obtained by extrusion by pressing the suspensions through a polycarbonate membrane (Whatman) with 100-nm pore size (15 times), using a commercial extruder (Avestin). LUVs size, monodispersity and stability were systematically measured with dynamic light scattering (DLS, Malvern Instruments) at room temperature. The lipid concentration of the LUVs suspensions was determined using the Bartlett assay [25]. TX, SDS and DTAC were solubilised in the Tris buffer to a final concentration of 100 mM.

### 2.3.3 Isothermal titration calorimetry

Isothermal titration calorimetry (ITC) experiments were performed using a MicroCal ITC200 calorimeter (GE Corp.). The volumes of the sample cell and the syringe were 206.8  $\mu$ L and 30  $\mu$ L respectively. The reference cell was filled with ultra-pure water (18 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup>).

For the phase diagrams, solubilisation and reconstitution were carried out to determine the position of the phase boundaries coordinates of the onset and the completion of the changes in the architecture of the lipid-detergent self-assemblies. For solubilisation (or reconstitution) experiments, the sample cell was filled with a lipid suspension (or detergent suspension), while the injection syringe was filled with a detergent suspension (or lipid suspension). Typical injection volume was 1  $\mu$ L and at least 2 minutes were left between injections in order to allow the system to completely equilibrate. There was constant stirring (750 rpm) in the sample cell.

The detergent and lipid concentrations were adjusted to clearly distinguish transitions within the thermograms. Phase diagrams were established using three different LUVs concentrations for a single detergent concentration. Experiments were conducted at 28 °C in the case of the titrations with TX, 50 °C for DTAC, and 60 °C for SDS. In order to confirm that the discontinuities in the thermograms corresponded to the onset and the completion of the LUVs solubilisation by the detergent, dynamic light scattering (DLS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments) measurements were carried out on samples with compositions corresponding to the phase frontiers. The data were treated (baseline fitting and peak integration) using the Origin 5.0 software.

### 2.3.4 Lipid efflux analysis

The selectivity of the lipid extraction was assessed using a method described previously [26]. The phospholipid/detergent proportions were selected to be in the mixed-micelle/bilayer coexistence region of the phase diagrams. Briefly, an aliquot of detergent was added to an aliquot of MLVs suspension in a 1.5 mL centrifuge tube – final total volume of 500  $\mu$ L. The samples were thoroughly vortexed and were incubated at least 30 minutes at 28 °C, 50 °C and 60 °C for samples with TX, DTAC and SDS respectively. After the incubation period, the tubes were then centrifuged at 20 800  $\times$  g, at 1 °C, for 15 min. Control samples showed that, without detergent, at least 95 % of the lipids were found in the pellet. Right after centrifugation, the supernatants (~ 490  $\mu$ L) were collected with a syringe and the pellets were resuspended in 490  $\mu$ L of buffer and vortexed. A 10- $\mu$ L aliquot of each fraction was diluted by a factor of 10 000 with HPLC-grade methanol. The lipid speciation (in the supernatants and in the pellets) was determined by LC/MS/MS analysis on a QTRAP 5500 system (Sciex) equipped with LC-20ADXR pumps (Shimadzu) and a PAL HTC-net autosampler (CTC Analysis). Samples were eluted on an Xselect CSM C18 column (3.5  $\mu$ m, 1 x 100 mm, Waters) maintained at room temperature. The typical injection volume was 5  $\mu$ L and the elution flow was set to 0.05 mL/min. An elution gradient was used: Phase A: water/acetonitrile (6:4 (v/v), 0.3 % formic acid); phase B: isopropanol/acetonitrile (9:1 (v/v), 0.3 % formic acid), from 40% to 90% of phase B over 6.5 minutes and then, elution with 90% of phase B. An ESI source was used in positive ionization mode. Nitrogen was used as drying gas and analysis were conducted in MRM mode with a dwell time of 100 ms. Each peak area was determined using the Sciex software integration script. The extraction extent was calculated as followed: extraction % =  $A_s/(A_s + A_p)$ , where  $A_s$  and  $A_p$  represent the lipid peak area from the supernatant and the pellet

respectively for each lipid. Typically, each mixture was prepared as duplicates and injected twice to statistically quantify the extraction.

## 2.4. Results and discussion

### 2.4.1 Determination of the detergent critical micellar concentrations

ITC is an appropriate method to detect the micellar transition of detergents and therefore to determine the CMC [16]. In order to compare this phenomenon with their incorporation into membranes, the CMC were first determined in the same buffer conditions as used for the detergent/lipid solubilisation experiments at 28 °C. The values are presented in **table 2.1** and are in good agreement with previously reported data.

**Table 2.1** - CMC values for each detergent as measured with ITC at 28 °C.

	TX	SDS	DTAC
Measured CMC (mM)	0.27	1.48	8.90
Reported CMC (mM)	0.23 [27]	1.5 [28]	8.37 [29]

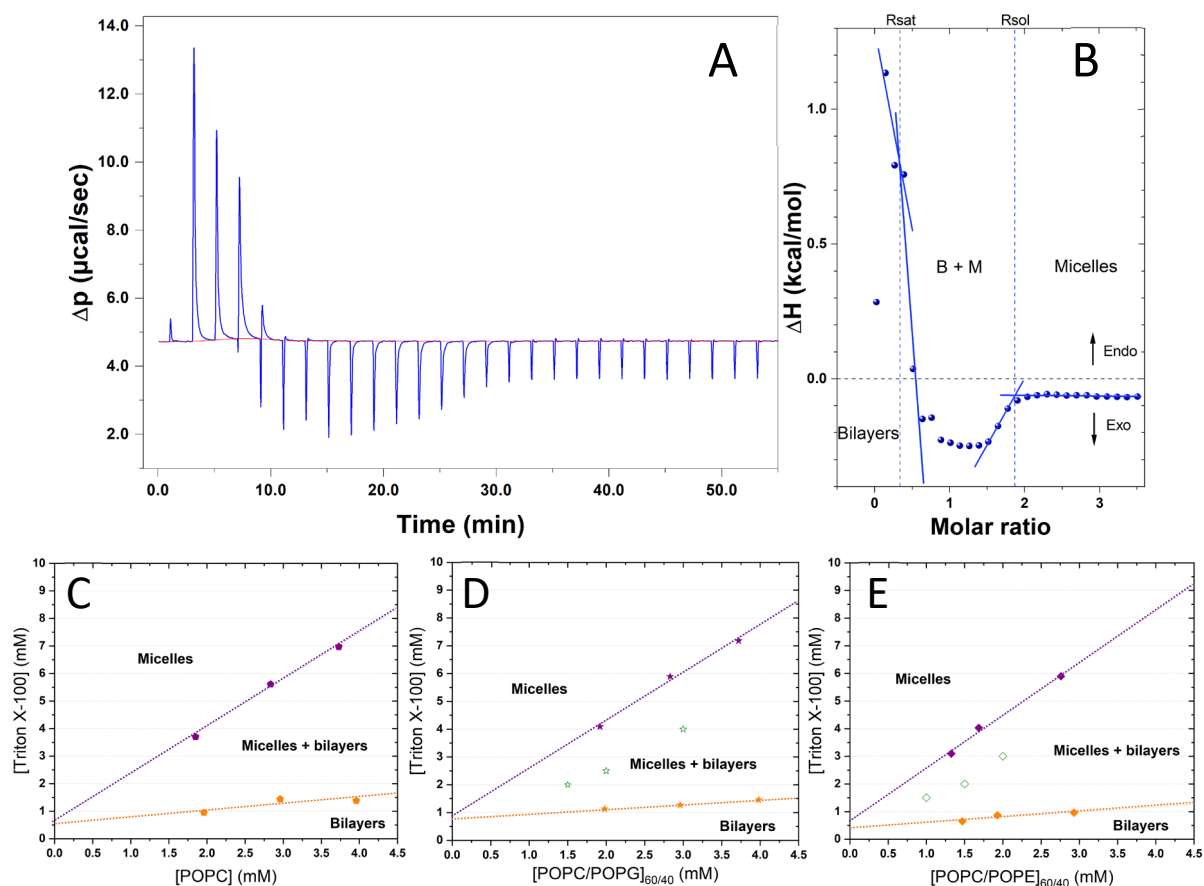
### 2.4.2 Construction of the phase diagrams

Membrane solubilisation titrations were conducted at different temperatures depending on the nature of the detergent. At room temperature, TX undergoes a spontaneous translocation and quickly equilibrates between the two leaflets of a bilayer [30, 31]. As POPE exhibits a phase transition at ~ 25 °C, the experiments were carried out at 28 °C in case of TX to ensure that lipids were homogeneously mixed into a monophasic fluid phase. In contrast with TX, it was demonstrated that, due to their electric charge, ionic detergents such as SDS and DTAC possess a slow flip-flop kinetics and a weak ability to permeate the membrane [28, 31-35]. Raising temperature was shown to favour detergent-induced membrane permeation and avoid complex solubilisation mechanisms [28, 32, 36, 37]. We then performed the solubilisation experiments with DTAC and SDS at 50 °C and 60 °C, respectively. At these temperatures, DLS measurements showed distinct size transitions from vesicles to micelles, confirming the occurrence of the bilayer solubilisation process.

**Figure 2.1** shows the results of a typical ITC experiment with TX. Graphs **A** and **B** are respectively the thermogram and the enthalpogram (integrated enthalpies as a function of the detergent to lipid molar ratio) of the titration of POPC vesicles with TX. The first TX injections

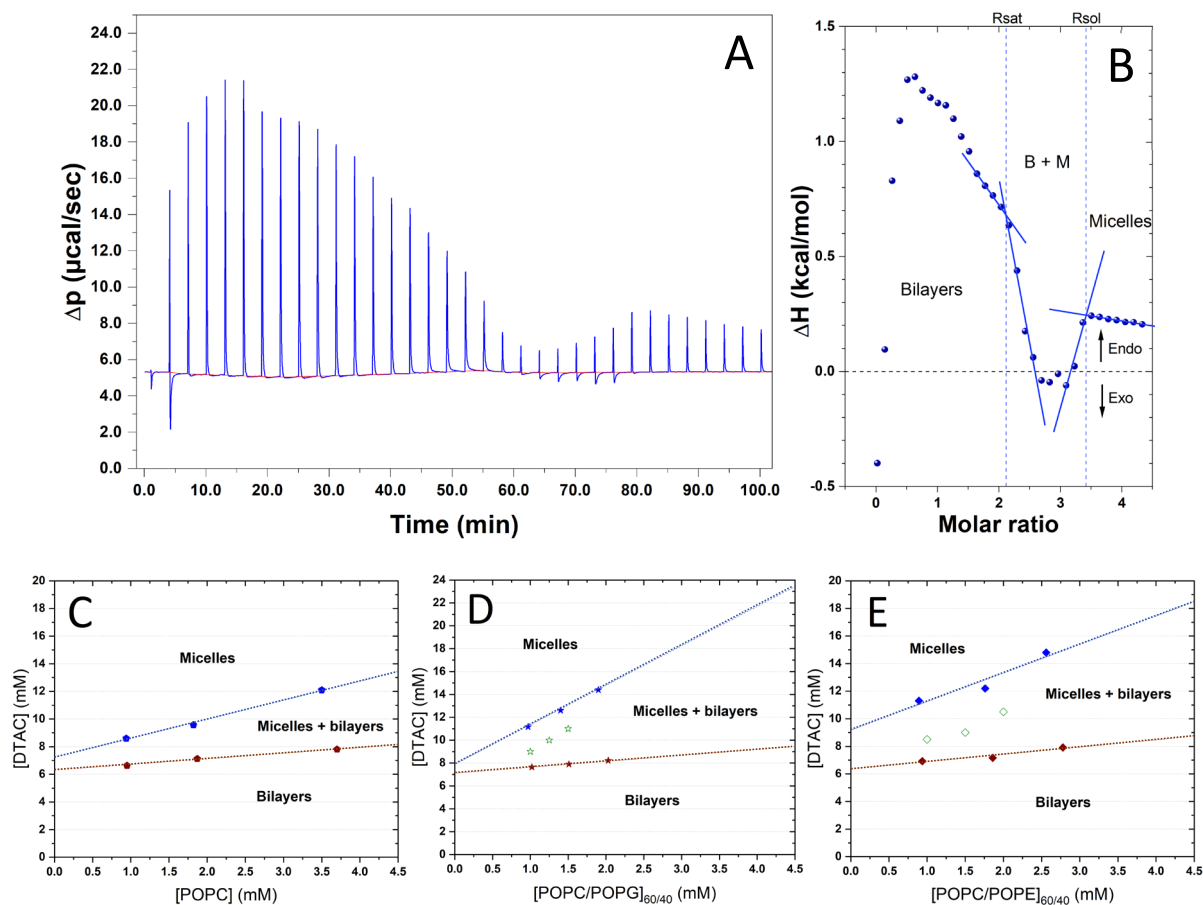
led to endothermic peaks associated with the insertion of the detergent molecules in the bilayers, as previously observed [38]. These peaks resulted from the heat of micelle disintegration, as the detergent concentration in the syringe was above the CMC, and the heat of detergent transfer from the aqueous environment to membranes. When the bilayers reached detergent saturation, they started breaking down to form micelles; the mixed micelle formation was exothermic as previously observed [12, 39]. In this case, this phenomenon was hence accompanied with a change of the enthalpy sign. Thus, a more abrupt drop was observed in the titration heat profiles. The value of  $R_{sat}$ , corresponding to the change of regime, was estimated by the breakpoint associated with the change of slope (an example is shown in **figure 2.1, B**). The abrupt enthalpy decrease was followed by a series of injections for which the heats of reaction were relatively constant, corresponding to the micelle-lamella coexistence range. Once all the vesicles were solubilised in mixed micelles, the titration displayed another steep slope, allowing the identification of  $R_{sol}$  (indicated in **figure 2.1, B**). Subsequently, the heat release stabilized to a relatively small value, mainly associated to the contribution of the heat of dilution of the injected detergent micelles that would fuse with the lipid/detergent mixed micelles. To confirm that the estimated  $R_{sat}$  and  $R_{sol}$  values corresponded to the onset and the completion of the LUVs solubilisation, DLS measurements were carried out in these conditions and validated that these coincided with the appearance of micelles and the disappearance of vesicles, respectively. Typical results for the solubilisation of POPC/POPG and POPC/POPE LUVs by TX are shown in the supplementary material **figure 2S.1**.

In order to construct the composition-phase diagrams, solubilisation titrations were typically carried out with three different lipid concentrations.



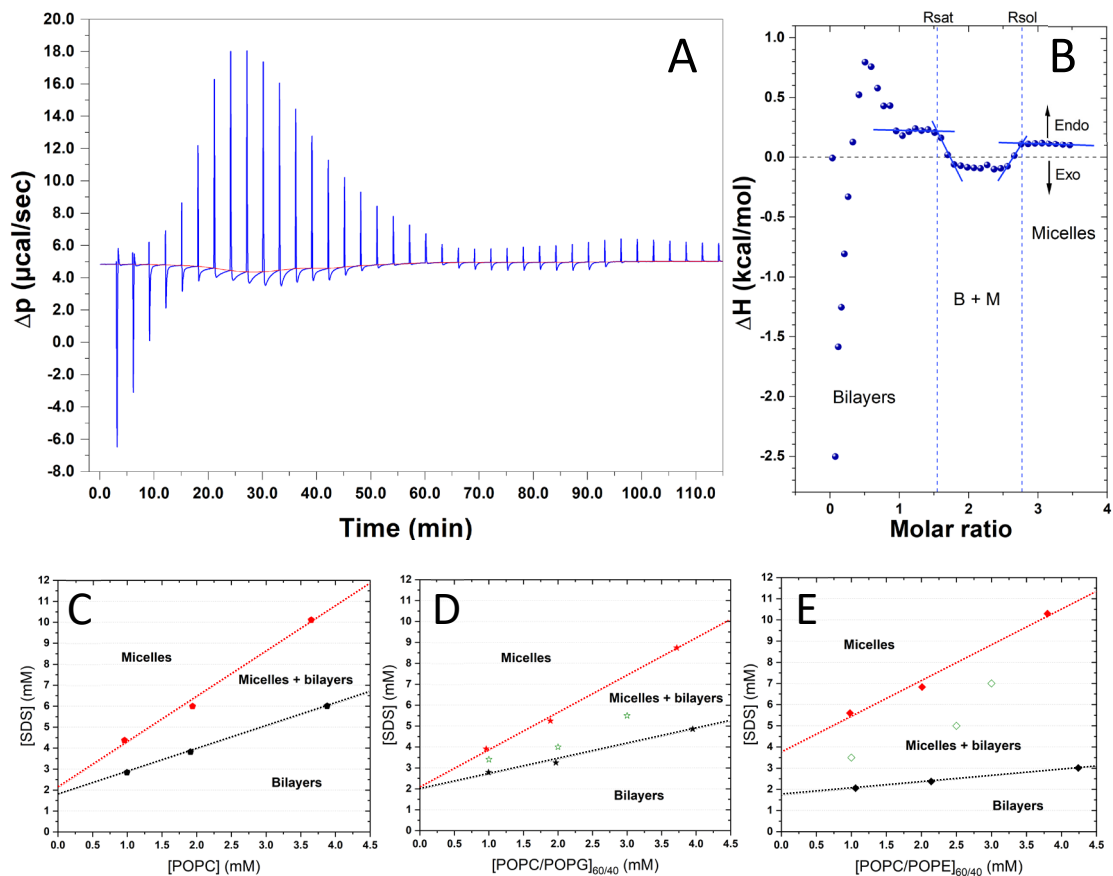
**Figure 2.1** - Solubilisation of POPC vesicles (4 mM) titrated with TX (100 mM) at 28 °C as monitored by ITC. Typical differential heating power ( $\Delta p$ ) profile recorded as a function of time during a solubilisation experiment of POPC LUVs suspension with TX (**A**). Differential enthalpy of reaction ( $\Delta H$ ) as a function of the TX/POPC molar ratios (**B**). Vertical dashed lines represent the range limits of the vesicle/micelle coexistence range. Composition-phase diagrams for POPC/TX (**C**), POPC-POPG/TX (**D**), and POPC-POPE/TX (**E**). The green symbols on the graphs correspond to the selected coordinates for the extraction analysis.

Same experiments were conducted with the lipid systems with DTAC. **Figure 2.2** reports the thermogram (**A**) and associated enthalpogram (**B**) obtained for the solubilisation of POPC LUVs by DTAC. The overall shape of thermograms were similar to those obtained with TX. An analogous data treatment was applied to identify  $R_{sat}$  and  $R_{sol}$ . Typical results with POPC/POPG and POPC/POPE LUVs are reported in the supplementary material **figure 2S.2**.



**Figure 2.2** - Solubilisation of POPC vesicles (4.2 mM) titrated by DTAC (100 mM) at 50 °C as monitored by ITC. Typical differential heating power ( $\Delta p$ ) profile recorded as a function of time during a solubilisation experiment of POPC LUVs by DTAC (A). Differential enthalpy of reaction ( $\Delta H$ ) recorded as a function of the POPC/DTAC molar ratios (B). Vertical dashed lines represent the range limits of the vesicle/micelle coexistence range. Composition-phase diagrams for POPC/DTAC (C), POPC-POPG/DTAC (D) and POPC-POPE/DTAC (E). The green symbols on the graphs correspond to the selected coordinates for extraction analysis.

Finally, we have investigated the solubilisation behaviour of SDS detergent with the three lipid systems. Typical ITC data are provided for POPC LUVs solubilisation with SDS (see supplementary material **figure 2S.3** for solubilisation experiments with POPC/POPG and POPC/POPE). In case of POPC and POPC/POPG LUVs, the thermograms showed a more complex shape that included an additional discontinuity, even giving rise to a second plateau in the case of the titration of POPC LUVs. DLS measurements identified the second plateau as being the coexistence range. In addition, as discussed below, the extrapolation of the bilayer/coexistence limit to a lipid concentration of 0 mM led to a value close to SDS CMC. This different behaviour could be associated with electrostatic interactions associated with the negatively charged SDS.



**Figure 2.3** - Solubilisation of POPC vesicles (4.2 mM) titrated by SDS (100 mM) at 60 °C as monitored by ITC. Typical differential heating power ( $\Delta p$ ) profile recorded as a function of time during a solubilisation experiment of POPC LUVs by SDS (A). Differential enthalpy of reaction ( $\Delta H$ ) recorded as a function of the POPC/SDS molar ratios (B). Vertical dashed lines represent the range limits of the vesicle/micelle coexistence range. Composition-phase diagrams for POPC/SDS (C), POPC-POPG/SDS (D) and POPC-POPE/SDS (E). The green symbols on the graphs correspond to the selected coordinates for extraction analysis.

The slopes of the boundaries,  $R_b^{\text{sat}}$  and  $R_b^{\text{sol}}$ , collected from each phase diagram are reported in **table 2.2**. The values are overall of the same order of magnitude than previously reported similar systems [32].

**Table 2.2** - Phase boundaries associated data for the three compositions with each detergent.

Detergent	T (°C)	Lipid composition	$R_b^{\text{sat}}$	$R_b^{\text{sol}}$
TX	28	POPC	0.25	1.74
		POPC/POPG	0.165	1.72
		POPC/POPE	0.19	1.90
DTAC	50	POPC	0.42	1.38
		POPC/POPG	0.56	2.47
		POPC/POPE	0.54	2.08
SDS	60	POPC	1.20	2.31
		POPC/POPG	0.72	1.77
		POPC/POPE	0.30	1.70

Overall, the phase diagrams revealed similar patterns, displaying the typical ranges associated to the three-stage model. For each phase diagram, The  $R_{sat}$  values decrease in the following order: TX < SDS < DTAC, a trend in good agreement with their respective CMC. The low  $R_{sat}$  value for TX is associated with its strong ability to solubilise membranes [16] while SDS and DTAC are considered as weaker detergents [35]. The CMC of detergents is a property that is supposed to vary with increasing temperatures, a phenomenon related to the hydration properties of water molecules around the detergent molecules. First, increasing the temperature initially results in decreasing the propensity of water to form hydrogen bonds with the detergent headgroup, an effect that tends to favour micellization and decreases the CMC. This process is competing with the breakdown of the water molecules structure that surrounds the hydrophobic chains. This latter phenomenon, unfavouring micellization, increases the CMC and tends to dominate at higher temperature. For DTAC and SDS, used at 50 and 60 °C respectively, we can thus expect the CMC values are higher than that measured at 28 °C. However, it was shown that such differences were not significant [40] and for all 3 detergents, the Y-intercepts of the phase boundaries matched with the values of detergent CMC determined at 28 °C, an expected agreement for these pseudo-binary phase diagrams excluding surfactant monomers [12].

In general, the phase diagrams did not differ much over the three compositions. We could however observe a particularity with the phase behaviour of the POPC/POPE binary mixture with the three detergents in comparison to the other systems. The difference between the  $R_b^{sol}$  and  $R_b^{sat}$  constitutes a relative quantification of the width of the coexistence range. This difference was systematically larger for this binary mixture with each detergent when compared to POPC vesicles. The presence of POPE within the bilayer hence promoted the broadening of the coexistence range.

In contrast the POPC/POPG did not display such particularity except when DTAC was used; this might be attributed to the peculiar electrostatic behaviour of this system.

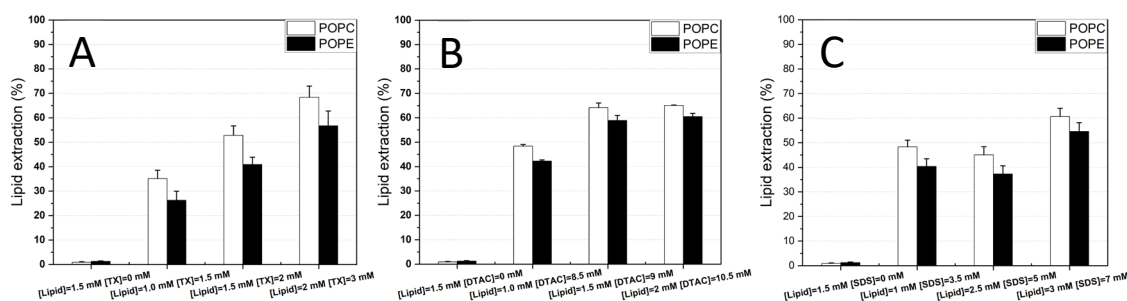
### 2.4.3 Analysis of detergent selectivity for lipids

In order to determine whether there is a lipid selectivity associated with the bilayer solubilisation induced by the different detergents, three lipid/detergent concentrations within the bilayer/micelle coexistence range were selected (the overall solubilisation proportion had to be between 20 and 80% in order to allow lipid specific extraction to be expressed). LUVs and detergent were mixed and, after reaching the equilibrium, the samples were centrifugated to isolate the bilayer fragments from the remaining vesicles. The lipid composition of each



fraction (pellet and supernatant) was determined by LC/MS. As for the ITC measurements, incubations were carried out at 28, 50 and 60 °C for TX, DTAC and SDS respectively.

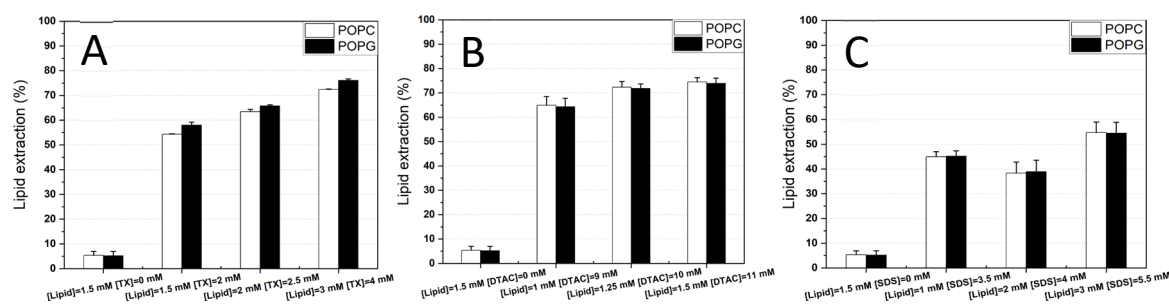
The histograms displayed on **figure 2.4** represent the specific lipid proportions that were extracted from POPC/POPE (60/40 mol/mol) vesicles by TX (**A**), DTAC (**B**) and SDS (**C**). It was observed that POPE was systematically less extracted than POPC with the three detergents; on average, the POPC extracted proportion was 1.2 - 1.3 that of POPE, indicating a preferential extraction by 20 - 30%.



**Figure 2.4** - Specific lipid extraction, as assessed by LC/MS, from POPC/POPE (60/40 mol/mol) vesicles with TX (**A**), with DTAC (**B**), and with SDS (**C**). The lipid and detergent concentrations were previously selected from the phase composition-diagrams (corresponding to the green symbols on **figures 2.1E**, **2.2E** and **2.3E**). Lipid extraction experiments were conducted in the same conditions than ITC: 28 °C for TX, 50 °C for DTAC and 60 °C for SDS. The results from vesicles without detergent have been included as a negative control. The extraction differences were found statistically significant using a t test with a 90 % confidence interval.

The molecular inverted-cone shape of POPE (negative curvature) should impose a considerable curvature strain when incorporated in positive-curvature micelles; this unfavorable contribution to the free energy maybe at the origin of the depletion of POPE in the micelles relative to their proportion in the lamellar phase. Therefore, we propose that POPE was less extracted due to the intrinsic anti-micellar character associated to its molecular shape. Interestingly, similar extraction studies have been made with styrene-maleic acid (SMA) block copolymers as solubilising agents, leading to the formation of nanodiscs; these are known to be small and flat lipid bilayers whose edges are coated by the copolymer chains that act as a scaffold [41]. For these systems, no preferential extraction of POPC over POPE could be observed from homogeneous bilayers [42-44]. It is expected that the flat bilayers of nanodiscs could accommodate more easily the curvophobic POPE molecules; in these structures, the difference of chemical potential for POPC and POPE molecules may be too small to lead to measurable lipid specificity. The lipid selectivity of bilayer solubilisation would hence be dictated, at least partly, by the type of aggregates that are formed.

The results of the lipid specificity of the extraction from POPC/POPG (60/40 mol/mol) vesicles with the different detergents are presented in **figure 2.5**. Overall, the phospholipid extraction proportions were comparable, indicating the absence of lipid selectivity of the detergent in the membrane solubilisation process, despite the charged nature of POPG. This finding hence indicates that, despite the fact that they are recognized as strong interactions, electrostatic interactions do not play a significant role in the solubilisation pattern. It is interesting to note that SMA block copolymers, despite the fact that they carry multiple negative charges at physiological pH, solubilise PG as well as PC species [44].



**Figure 2.5** - Specific lipid extraction, as assessed by LC/MS, from POPC/POPG (60/40 mol/mol) vesicles with TX (A), with DTAC (B), and with SDS (C). The lipid and detergent concentrations were previously selected from the composition-phase diagrams (corresponding to the green symbols on **figures 2.1D**, **2.2D** and **2.3D**). Lipid extraction experiments were conducted in the same conditions than ITC: 28 °C for TX, 50 °C for DTAC and 60 °C for SDS. The results from vesicles without detergent have been included as a negative control. The extraction differences were found not statically significant using a t test with a 90 % confidence interval.

Detergents have often been used to solubilise biological membranes. In some cases, the preferential extraction PC over PE has been reported. For example, a preferential removal of PC over PE from rabbit liver microsomes was reported with TX [10]; this was interpreted as the presence of PC-rich areas in the membranes. Similarly, a poor solubilisation of phosphatidylethanolamine by TX was also reported from mitochondrial membranes [7]. The present findings on model membranes indicate that the results of such extraction processes should be interpreted carefully as the composition of the resulting lipid/detergent micelles reflects indeed the composition of the native membranes but is also influenced by the morphology of the mixed micelles and curvature propensities (shape) of the molecular constituents.

## 2.5 Conclusions

This work provides important insights about the phenomenon of membrane solubilisation by demonstrating that lipid curvature propensities can modulate the process and lead to a selective extraction. Especially, the study proposed an interplay between the type of aggregates formed upon membrane solubilisation and the specificity of the lipid extraction by a solubilising agent. shedding light on the factors, inherent to the lipid composition, that can modulate the process and potentially lead to a selective extraction.

## 2.6 Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interests.

## 2.7 Acknowledgements

We gratefully thank the financial support of the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, and of the Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies (FRQ-NT). M.A. thanks the Faculté des études supérieures et Postdoctorales (FESP) of Université de Montréal, and University of Bordeaux's Initiative d'Excellence (IdEx) for their scholarships. We thank Marie-Christine Tang and Louiza Mahrouche from Université de Montréal for the development of the LC-MS method. We also thank Jianguo Liu (College of Chemical Engineering of China University of Petroleum) for preliminary experiments.

## 2.8 References

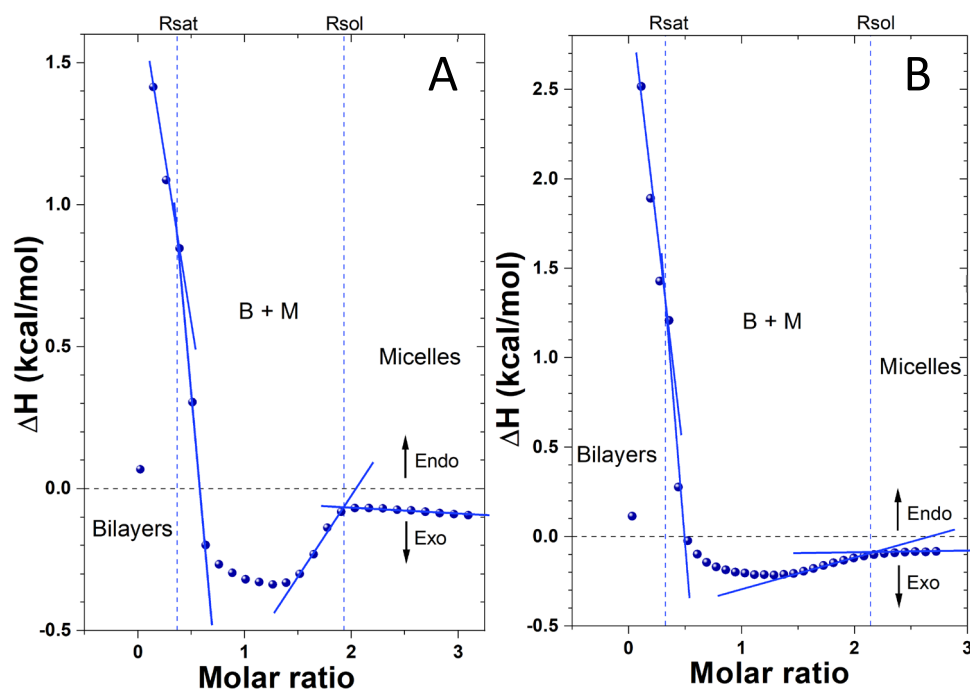
1. Tannert, A., et al., *The bovine seminal plasma protein PDC-109 extracts phosphorylcholine-containing lipids from the outer membrane leaflet*. Eur Biophys J, 2007. **36**(4-5): p. 461-75.
2. Therrien, A., P. Manjunath, and M. Lafleur, *Chemical and physical requirements for lipid extraction by bovine binder of sperm BSP1*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1828**(2): p. 543-51.
3. Boisvert, W.A., A.S. Black, and L.K. Curtiss, *ApoA1 reduces free cholesterol accumulation in atherosclerotic lesions of ApoE-deficient mice transplanted with ApoE-expressing macrophages*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1999. **19**(3): p. 525-530.
4. Remaley, A.T., et al., *Apolipoprotein Specificity for Lipid Efflux by the Human ABCA1 Transporter*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **280**(3): p. 818-823.

5. Sethi, A.A., et al., *Apolipoprotein AI mimetic peptides: possible new agents for the treatment of atherosclerosis*. Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000), 2007. **8**(3): p. 201-212.
6. Jones, M.N., *Surfactants in membrane solubilisation*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **177**(2): p. 137-159.
7. Gurtubay, J.I.G., et al., *Triton X-100 solubilization of mitochondrial inner and outer membranes*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 1980. **12**(1): p. 47-70.
8. Kirkpatrick, F.H., S.E. Gordesky, and G.V. Marinetti, *Differential solubilization of proteins, phospholipids, and cholesterol of erythrocyte membranes by detergents*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1974. **345**(2): p. 154-161.
9. Rodi, P.M., et al., *Comparative study of the interaction of CHAPS and Triton X-100 with the erythrocyte membrane*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(3): p. 859-66.
10. Bayerl, T., et al., *Interaction of nonionic detergents with phospholipids in hepatic microsomes at subsolubilizing concentrations as studied by <sup>31</sup>P-NMR*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1986. **858**(2): p. 285-293.
11. Delaunay, J.L., et al., *Differential solubilization of inner plasma membrane leaflet components by Lubrol WX and Triton X-100*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(1): p. 105-12.
12. Heerklotz, H., *Interactions of surfactants with lipid membranes*. Q Rev Biophys, 2008. **41**(3-4): p. 205-64.
13. Lichtenberg, D., et al., *Detergent solubilization of lipid bilayers: a balance of driving forces*. Trends Biochem Sci, 2013. **38**(2): p. 85-93.
14. Israelachvili, J.N., *20 - Soft and Biological Structures*, in *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)*, J.N. Israelachvili, Editor. 2011, Academic Press: San Diego. p. 535-576.
15. Lichtenberg, D., H. Ahyayauch, and F.M. Goni, *The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers*. Biophys J, 2013. **105**(2): p. 289-99.
16. Heerklotz, H. and J. Seelig, *Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2000. **1508**(1): p. 69-85.
17. Lichtenberg, D., E. Opatowski, and M.M. Kozlov, *Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2000. **1508**(1): p. 1-19.
18. Lichtenberg, D., *Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1985. **821**(3): p. 470-478.
19. Paternostre, M.T., M. Roux, and J.L. Rigaud, *Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase*

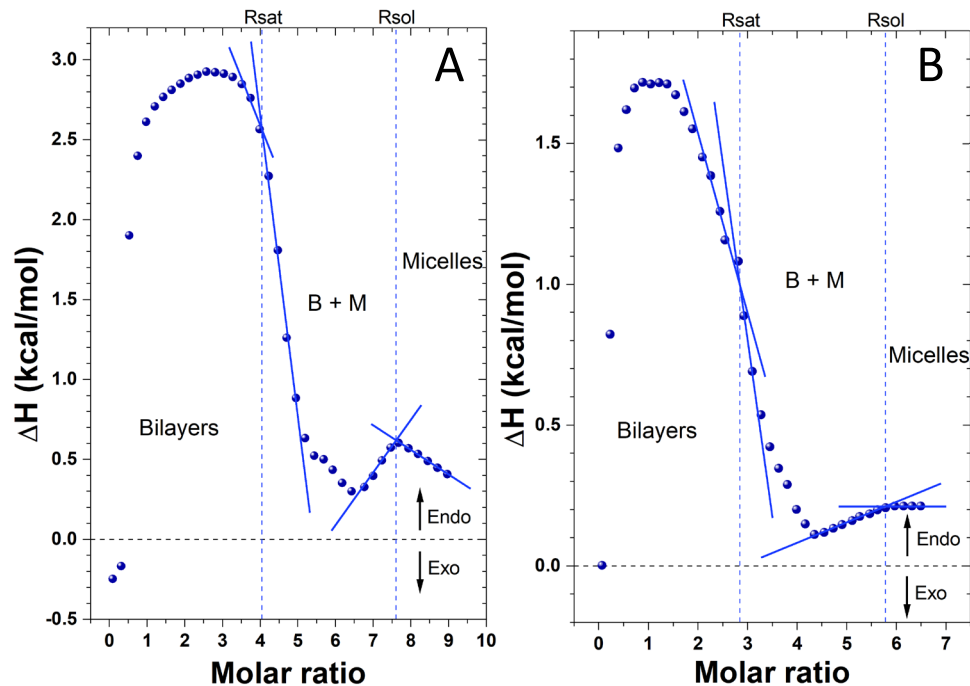
- evaporation) by Triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. *Biochemistry*, 1988. **27**(8): p. 2668-2677.
20. Lafleur, M., P.R. Cullis, and M. Bloom, *Modulation of the orientational order profile of the lipid acyl chain in the La phase*. *European Biophysics Journal*, 1990. **19**(2): p. 55-62.
  21. Marsh, D., *Handbook of lipid bilayers*. Second edition. 2013, Boca Raton: CRC Press.
  22. Helenius, A. and K. Simons, *Solubilization of membranes by detergents*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1975. **415**(1): p. 29-79.
  23. Heerklotz, H., et al., *Thermodynamic characterization of dilute aqueous lipid/detergent mixtures of POPC and C12EO8 by means of Isothermal Titration Calorimetry*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1996. **100**(16): p. 6764-6774.
  24. Keller, M., A. Kerth, and A. Blume, *Thermodynamics of interaction of octyl glucoside with phosphatidylcholine vesicles: partitioning and solubilization as studied by high sensitivity titration calorimetry*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1997. **1326**(2): p. 178-192.
  25. Bartlett, G.R., *Phosphorus Assay in Column Chromatography*. *Journal of Biological Chemistry*, 1959. **234**(3): p. 466-468.
  26. Lafleur, M. and A. Therrien, *Determining efficiency and selectivity of lipid extraction by perturbing agents from model membranes*. *Bio-Protocol*, 2016. **6**(22).
  27. Heerklotz, H. and J. Seelig, *Correlation of membrane/water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration*. *Biophysical journal*, 2000. **78**(5): p. 2435-2440.
  28. Tan, A., et al., *Thermodynamics of Sodium Dodecyl Sulfate partitioning into lipid membranes*. *Biophysical Journal*, 2002. **83**(3): p. 1547-1556.
  29. Sarac, B. and M. Bester-Rogac, *Temperature and salt-induced micellization of dodecyltrimethylammonium chloride in aqueous solution: a thermodynamic study*. *J Colloid Interface Sci*, 2009. **338**(1): p. 216-21.
  30. Alonso, A., et al., *Kinetic studies on the interaction of phosphatidylcholine liposomes with Triton X-100*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1987. **902**(2): p. 237-246.
  31. Sudbrack, T.P., et al., *Observing the solubilization of lipid bilayers by detergents with optical microscopy of GUVs*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2011. **115**(2): p. 269-277.
  32. Keller, S., et al., *Thermodynamics of lipid membrane solubilization by sodium dodecyl sulfate*. *Biophys J*, 2006. **90**(12): p. 4509-21.
  33. Cócera, M., et al., *Kinetic and structural aspects of the adsorption of Sodium Dodecyl Sulfate on phosphatidylcholine liposomes*. *Langmuir*, 2000. **16**(9): p. 4068-4071.

34. Kragh-Hansen, U., M. le Maire, and J.V. Møller, *The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes*. Biophysical journal, 1998. **75**(6): p. 2932-2946.
35. Beck, A., et al., *On the interaction of ionic detergents with lipid membranes. Thermodynamic comparison of n-alkyl- $+N(CH_3)_3$  and n-Alkyl- $SO_4^-$* . The Journal of Physical Chemistry B, 2010. **114**(48): p. 15862-15871.
36. Keller, S., H. Heerklotz, and A. Blume, *Monitoring lipid membrane translocation of Sodium Dodecyl Sulfate by Isothermal Titration Calorimetry*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(4): p. 1279-1286.
37. Fan, H.Y., D. Das, and H. Heerklotz, *“Staying out” rather than “cracking in”: asymmetric membrane insertion of 12:0 lysophosphocholine*. Langmuir, 2016. **32**(44): p. 11655-11663.
38. Heerklotz, H., *The microcalorimetry of lipid membranes*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2004. **16**(15): p. R441-R467.
39. Heerklotz, H., A.D. Tsamaloukas, and S. Keller, *Monitoring detergent-mediated solubilization and reconstitution of lipid membranes by isothermal titration calorimetry*. Nature Protocols, 2009. **4**: p. 686.
40. Tennouga, L., et al., *The micelle formation of cationic and anionic surfactants in aqueous medium: Determination of CMC and thermodynamic parameters at different temperatures*. Journal of Materials and Environmental Science, 2015. **6**(10): p. 2711-2716.
41. Denisov, I.G. and S.G. Sligar, *Nanodiscs in membrane biochemistry and biophysics*. Chem Rev, 2017. **117**(6): p. 4669-4713.
42. Cuevas Arenas, R., et al., *Influence of lipid bilayer properties on nanodisc formation mediated by styrene/maleic acid copolymers*. Nanoscale, 2016. **8**(32): p. 15016-26.
43. Dominguez Pardo, J.J., et al., *Solubilization of lipids and lipid phases by the styrene-maleic acid copolymer*. European Biophysics Journal, 2017. **46**(1): p. 91-101.
44. Scheidelaar, S., et al., *Molecular model for the solubilization of membranes into nanodisks by styrene maleic Acid copolymers*. Biophys J, 2015. **108**(2): p. 279-90.

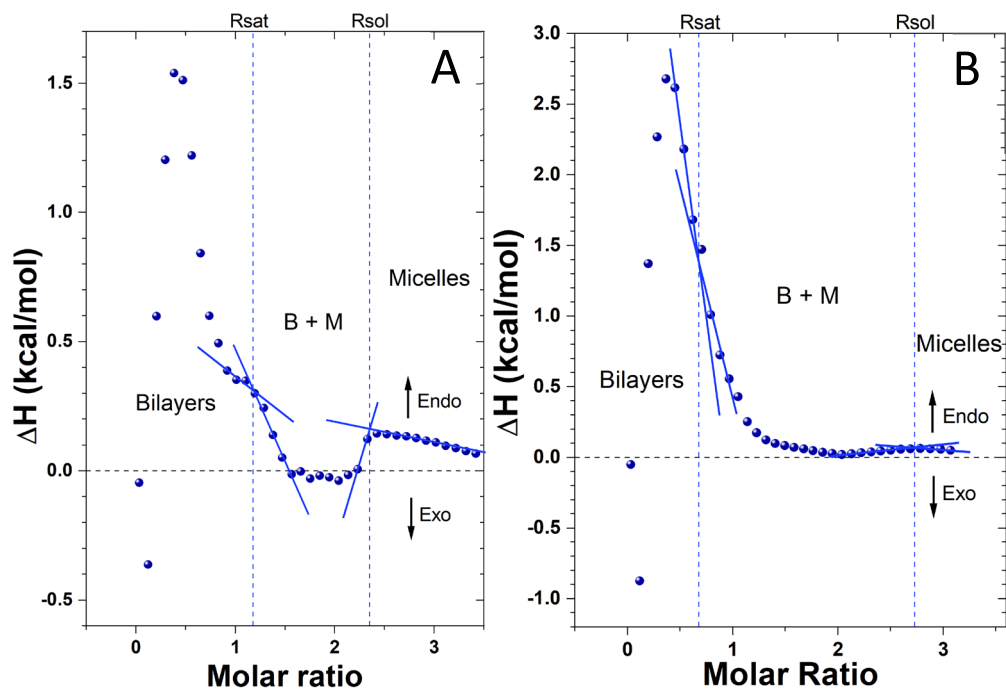
## 2.9 Supplementary material



**Figure 2S.1** - Enthalpograms of solubilisation (A) for POPC/POPG and (B) for POPC/POPE vesicles titrated by TX at 28 °C as monitored by ITC. The dashed lines represent the  $R_{sat}$  and  $R_{sol}$  transitions at which intersect the blue slopes.



**Figure 2S.2** - Enthalpograms of solubilisation (A) for POPC/POPG and (B) for POPC/POPE vesicles titrated by DTAC at 50 °C as monitored by ITC. The dashed lines represent the  $R_{sat}$  and  $R_{sol}$  transitions at which intersect the blue slopes.



**Figure 2S.3** - Enthalpograms of solubilisation (A) for POPC/POPG and (B) for POPC/POPE vesicles titrated by SDS at 60 °C as monitored by ITC. The dashed lines represent the  $R_{sat}$  and  $R_{sol}$  transitions at which intersect the blue slopes.



# Chapitre 3 : Membrane domain modulation of A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomer interactions with supported lipid bilayers : an atomic force microscopy investigation

Mehdi Azouz, Christophe Cullin, Sophie Lecomte, Michel Lafleur.

*Nanoscale*, 2019, 11, 20857-20867

## 3.1 Abstract

Alzheimer's disease is a devastating pathology with an increasing number of affected individuals following the rise of the life expectancy. Amyloid peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> was identified as one of the main culprits of the disease. The peptide has been shown to create major effects on lipid membranes, including membrane fragmentation. The membrane composition has been identified as a factor that plays a pivotal role in regulating peptide/membrane interactions and several results suggest that lipid domains, or rafts, can promote peptide-induced membrane damages. In this work, we examined the effects of lipid segregation on the membrane-perturbing ability of A $\beta$ <sub>1-42</sub> and an oligomeric mutant (G37C), a peptide that shares common features with the suspected toxic intermediates involved in the neurodegeneration process. Atomic Force Microscopy (AFM) was used to determine the impact of these peptides on supported lipid bilayers of various compositions. In 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine/1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine/cholesterol (DOPC/DPPC/cholesterol), and DOPC/Sphingomyelin/cholesterol ternary mixtures, two systems exhibiting liquid-liquid phase separations, it was shown that A $\beta$ <sub>1-42</sub> and G37C exclusively aggregated on liquid-disordered-phase domains, creating large deposits and even causing membrane fragmentation for the latter composition. Cholesterol and ganglioside GM1, the two most documented lipids in the context of Alzheimer's disease are also considered to play a crucial role in promoting detrimental interactions with amyloid peptides. We have shown that, in model 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) membranes, the presence of either cholesterol or GM1 in a proportion of 10 mol%, a content supposed to lead to domain formation, favoured the association of both A $\beta$ <sub>1-42</sub> and G37C, leading to a harmful membrane fragmentation. The AFM results establish that the presence of domains favoured membrane perturbations induced by the amyloid peptides. It is proposed that lipid packing defects at the domain interface could act as adsorption and nucleation site for the amyloid peptides. The more extensive bilayer perturbations induced by G37C compared to A $\beta$ <sub>1-42</sub> supports the hypothesis indicating oligomers that cannot mature to the fibril state can present a considerable toxicity.

## 3.2 Introduction

Since its discovery, more than a century ago (1906), the neurodegenerative pathology, named after the German psychiatrist Alois Alzheimer who first diagnosed it [1], still arouses many grey areas and despite the great advances made through the last decades regarding our understanding of its etiopathogenesis, Alzheimer's Disease (AD) keeps its share of unanswered questions.

Despite the recent progress in clinical trials and due to the complex molecular mechanisms occurring on long-term scale within the brain of individuals suffering from the dementia, effective therapeutic treatments are still non-existent to date [2].

The 42 amino-acid long amyloid peptide  $A\beta_{1-42}$  has been clearly identified as one of the trigger agents that play a role in the memory impairment and the other tragic syndromes associated with the disease. The fibres resulting from the self-assembly of  $A\beta_{1-42}$  aggregate to form the senile plaques, one of the hallmarks of the pathology. As the major component of this plaques [3],  $A\beta_{1-42}$  is considered as a biological key player in AD [1]. Several studies have revealed that deleterious effects on membranes were not associated with the peptide itself nor to the mature fibres but mostly provided by intermediate species formed during (on-pathway) or independently from (off-pathway) the fibrillation process [4-6]. These soluble intermediates, considered as oligomeric species [2, 7-9], are then under the spotlight of researchers but their characteristics and toxicity are still under debate due to their intrinsic heterogeneity and transient properties that make them difficult to isolate, and properly characterize [10, 11].

An important body of evidence has highlighted the importance of  $A\beta_{1-42}$ /membrane interactions and the crucial role that play lipid bilayers regarding fibrillogenesis and toxicity [8, 12-14]. As the peptide is released in the exoplasm right after the successive cleavages of the transmembrane Amyloid Precursor Protein (APP) by  $\gamma$  and  $\beta$ -secretases [2, 15],  $A\beta_{1-42}$  is found near the plasma membrane and likely interacts with the lipid bilayer [8]. Due to the highly complex nature of cell membranes related to the great variety of their lipids [16], the mechanisms at the molecular scale are not yet elucidated.

To decipher the role and the specificity of lipids, investigations on model membranes interacting with  $A\beta$  have become pivotal. Several studies examined the impact of  $A\beta$  amyloid peptides on the integrity of lipid bilayers and they show that the induced perturbations are modulated by several parameters including the peptide segment, the lipid composition, and the lipid phase [14, 17-20]. The nature of these perturbations is diverse. The peptides can form aggregates [17-19, 21], protofibrils/fibrils [13, 18], or ion-channel-like structures [22, 23]. In

some cases, the amyloid peptides were reported to have a detergent-like action forming defects in bilayers [18, 21], or even holes resulting from the excision of membrane patches [13]; such disrupting phenomena, that can be hypothesized as a pathway through which A $\beta$  can exert toxicity, are referred as membrane disruption or fragmentation in the present work.

One of the most recurrent propositions in the context of AD is the involvement of phase separated domains. Co-existence of liquid-ordered (lo) and liquid-disordered (ld) domains [24], (sometimes referred to as rafts) were proposed to play a crucial role in A $\beta$  production [15], oligomerisation and membrane-induced damages [9].

In this study, we used Atomic Force Microscopy (AFM) to investigate the bilayer-perturbation ability of A $\beta_{1-42}$  on simple model membranes to decipher the role of membrane domains. We used supported lipid bilayers (SLB) with 5 different compositions, all based on PC (phosphatidylcholine). In addition of pure POPC bilayers, we used two classic ternary mixtures that exhibit phase separations visible by AFM : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine/1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine/cholesterol (DOPC/DPPC/cholesterol) and DOPC/sphingomyelin/cholesterol (DOPC/SM/cholesterol).

We also examined the impact of the amyloid peptide on POPC bilayers containing GM1 or cholesterol. Among the multiple lipids found in the neuronal plasma membranes, gangliosides, GM1 in particular, have been under investigation as they are believed to be raft components that decisively promote A $\beta$  interactions with membranes [25-30]. The glycosphingolipid forms enriched domains (clusters) that are proposed to seed A $\beta$  aggregation hence catalysing the membrane-supported formation of oligomers and eventually fibres [27, 31], and therefore initiating AD development [26]. Cholesterol is also intensively studied in the context of AD. As several aspects regarding the development of AD, the hypothesis about the role of cholesterol are inconsistent. Previous works have reported that the cholesterol-induced stiffening of membranes could induce a protective effect by making the penetration of A $\beta$  peptides into the bilayer more difficult [32-34]. Conversely, cholesterol has been proposed to be a causative factor in AD, by promoting A $\beta$  peptide production from APP [35], A $\beta$  insertion into membranes [19] and subsequent misfolding [20] or ion transport [36]. The characterization by AFM of these 5 systems in the same conditions provides insights about how the membrane composition can modulate the interactions with A $\beta_{1-42}$  peptide.

In parallel, we led a comparative study on the same systems with a mutant that displayed interesting properties in previous studies [5, 37]. Exploring single mutation variations of A $\beta_{1-42}$  can be fruitful to understand the origin of the peptide toxicity. The G37C mutant (comprising

a cysteine instead of <sup>37</sup>Glycine) is of particular interest due the stable oligomers it forms. The ~14-mer species stabilized with disulphide bridges from the cysteines can be isolated and purified. This mutant keeps its oligomeric morphology in oxidative conditions but also displays an increased anti-parallel  $\beta$ -sheet content [38], hence structurally reflecting the suspected toxic intermediates involved in the disease [26, 39]. A high degree of toxicity has been observed in eukaryotic cellular system [40]. G37C hence constitutes an ideal oligomeric and toxic model that can be used on model membrane without being interfered with the polymorphism of other species that are formed during the self-assembly process of  $A\beta_{1-42}$ . Leading a comparative study with the wild-type form of  $A\beta_{1-42}$  can help us understand how the morphology governs the toxicity.

### 3.3 Materials and methods

#### 3.3.1 Materials

POPC, DOPC, DPPC, cholesterol, porcine brain SM and ovine brain ganglioside GM1 were purchased as powders from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and used without further purification.  $A\beta_{1-42}$  and the mutant G37C were expressed in yeast and produced in *E. coli*, then purified as described elsewhere [4, 40]. The respective concentrations of  $A\beta_{1-42}$  and G37C were assessed using Bradford assays. The purity of the peptides was analysed by size exclusion chromatography and mass spectrometry. The aliquots were finally frozen and stored at -80 °C until use.

High-purity water (18.2 M $\Omega$  cm) was obtained from a Milli-Q gradient system (Millipore). Ruby muscovite mica (ASTM grade 2, B&M Mica Co.) was used as bilayer support surface for the AFM.

#### 3.3.2 ThT fluorescence spectroscopy

Since  $A\beta_{1-42}$  is prone to self-aggregation, the preparation of the peptide is a crucial step and must ensure that it is initially monomeric and not already partially aggregated. Each  $A\beta_{1-42}$  aliquot was then systematically incubated with thioflavine T (ThT) (20  $\mu$ M) in buffer (Tris (10 mM), NaCl (140 mM), pH adjusted to 7.4) to ensure that peptides were initially in a non-aggregated state (peptide concentration used = 5  $\mu$ M). The same experiment was conducted with G37C to verify it remained in its stable oligomeric form without showing any fibrillation over 48 h. The fluorescence assays were carried out in a 96-well black plate (Tecan Infinite M200 microplate reader), at 25 °C using a  $\lambda_{\text{excitation}}$  of 440 nm and a  $\lambda_{\text{emission}}$  of 480 nm.

### 3.3.3 Preparation of small unilamellar vesicles

Individual lipid solutions were prepared in a benzene/methanol mixture (9/1 (v/v)) and appropriate volumes were mixed to obtain the desired molar ratio. The mixtures were then lyophilised for at least 16 h to completely remove the solvents. The lipid powders were hydrated with buffer (Tris (10 mM), NaCl (140 mM), pH 7.4) to obtain a lipid concentration of 2 mg/mL. Each sample was thoroughly vortexed and the resulting multilamellar vesicles (MLVs) were sonicated in a bath (Branson Ultrasonics) at 50 °C for 60 minutes to obtain a clear suspension of small unilamellar vesicles (SUVs). Dynamic Light Scattering (Malvern Instruments) indicated that the diameter of the SUVs was typically between 30 and 80 nm. The suspensions were then filtered using a polyethersulfone filter with 200-nm pores and stored at 4 °C for few weeks. Note that in case of GM1 containing-vesicles, CaCl<sub>2</sub> (5 mM) was added to the buffer to enable SUVs deposition onto the mica surface.

### 3.3.4 Preparation of supported lipid bilayers

50 µL of a lipid suspension were deposited on a freshly cleaved mica disk (6 mm diameter) previously heated at 50 °C to favour SUVs fusion onto the hydrophilic surface. The sample was covered to minimize evaporation and left to slowly cool down for 30 minutes. The disk with the SLB was then rinsed 5 times using Milli-Q water to remove remaining vesicles. After the last rinse, 100 µL of Milli-Q water were added to the SLB.

### 3.3.5 Peptide addition

Peptides aliquots were kept in liquid nitrogen prior to their use. They were then left to melt at room temperature before being injected in the sample. The peptide concentration of these stock solutions was typically ~60 µM. A volume of water hydrating the SLB was replaced by an aliquot of peptide stock solution in order to obtain a peptide concentration of 5 µM in the total incubation volume of 100 µL.

### 3.3.6 Atomic force microscopy

Atomic force microscopy (AFM) imaging of SLB was performed using PeakForce Quantitative Nano-Mechanics (PF-QNM) mode on an Icon Fast-Scan system (Bruker) in liquid conditions at room temperature (20 °C). Nitride coated silicon cantilevers (ScanAsyst Fluid, Bruker) with a resonance frequency of 150 kHz, a nominal spring constant of 0.7 N/m and a tip radius of 20 nm were used for this work. The images, analysed and processed with Nanoscope Analysis (Bruker), were acquired with a scan rate of ~1 Hz and a force kept as low as possible

(< 1 nN). They were recorded by sequentially scanning the same three areas of the sample at different times, with a resolution of 512 x 512 lines and optimized gains over a 12-hour period for each experiment. SLB thickness were determined with the cross-section tool of the software by measuring the difference in height between the mica and the top of the membranes. Special care was dedicated to avoid potential dehydration of the bilayers. During the incubation and when not scanning, the samples were covered with a Petri dish cover to minimize evaporation. In addition, Milli-Q water was added when necessary to maintain a constant volume. For each system, experiments were carried out at least three times to ensure the reproducibility of the observed effects.

## 3.4. Results

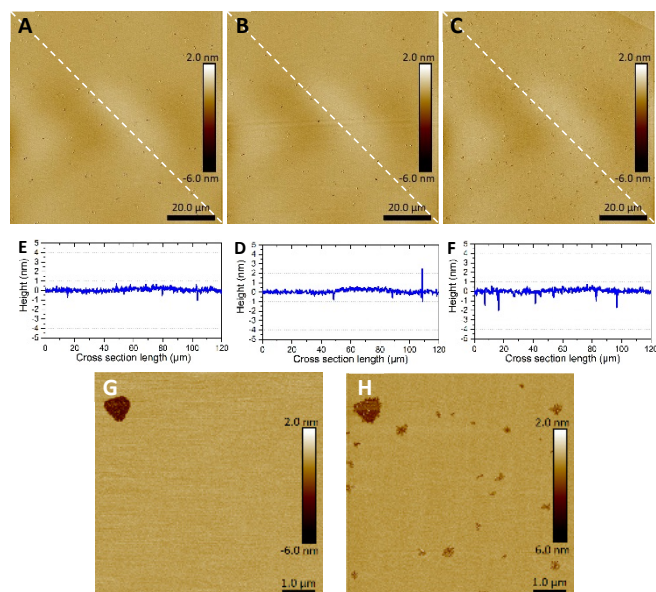
ThT fluorescence measurements were first carried out to ascertain the kinetics associated with the self-assembly of A $\beta$ <sub>1-42</sub> in solution including the end of the nucleation phase associated with the onset of the elongation phase, when the oligomeric intermediates start forming [39] (see supplementary material, **figure 3S.1**). For A $\beta$ <sub>1-42</sub>, this onset occurred after 6 to 8 hours. A plateau was reached after ~12 hours, indicating the end of the elongation phase (e. g. the completion of fibril formation). Therefore, during our experiments, 12-hour incubations were carried out to ensure oligomeric-species formation and to observe their effects on SLB. The dye fluorescence did not exhibit any response in the case of the oligomers, in agreement with the previous study [38] confirming the absence of fibril formation.

### 3.4.1 Effects of the peptides on pure POPC bilayers

The first series of experiments were conducted on POPC bilayers as canonical zwitterionic, homogeneous, 1d-phase membranes ( $T_M = -2$  °C). POPC bilayers were incubated with A $\beta$ <sub>1-42</sub> and AFM images were recorded at different times: 0, 2 h and 12 h after the peptide addition (**figure 3.1**). SLB prepared from vesicles fusion generally show small defects that tend to get smaller and even disappear (see supplementary material, **figure 3S.2**) due to a phenomenon of coalescence intrinsic to vesicle-fusion-formed SLB on mica [41]. In our study, these defects were useful to confirm the presence of a bilayer and measure its thickness. POPC bilayers was estimated to be  $4.3 \pm 0.4$  nm thick.

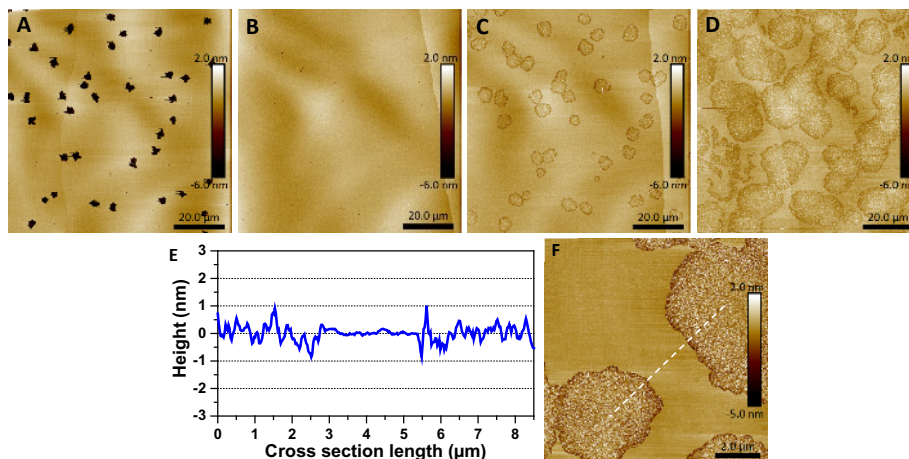
The incubation of POPC SLB with A $\beta$ <sub>1-42</sub> showed a mild effect on the bilayer structure (**figure 3.1**). The formation of few submicrometric holes was observed after a 12-hour incubation (**figure 3.1, H**). Neither aggregates nor fibrils were observed on the bilayer during

the incubation period. These limited changes are in agreement with the poor affinity of the peptide for pure zwitterionic membranes that was previously reported [5, 42, 43].



**Figure 3.1** - AFM images ( $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ ) of a pure POPC bilayer before (A), after 2 h (B) and 12 h (C) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Graph D, E and F are the cross sections (bilayer depth vs. lateral distance) corresponding to the dashed line on image A, B and C respectively. Images G and H ( $7 \times 7 \mu\text{m}^2$ ) were recorded before peptide addition and after 12 h of incubation respectively.

Similar experiments were carried out with G37C (figure 3.2). Within a 2-hour incubation, the oligomer started accumulating onto the bilayer (figure 3.2, C). This deposition was not random. Image A represents the SLB soon after its formation from SUVs fusion and exhibits residual defects that are a few microns wide. Due to coalescence, these holes vanished within an hour, leaving a continuous and uniform bilayer (image B). When images A and C are compared, one can observe a very good correlation between the spots where G37C started aggregating, and the location of the defects in the initial bilayer (image A). After a 12-hour incubation, a substantial deposition occurred and the aggregates started to coalesce as they appear to grow essentially in the plane of the bilayer. A very rough topography was observed in the zones where the peptide aggregated; it could be up to 1 nm higher or 1 nm lower than the level of an intact part of the membranes (graph E).



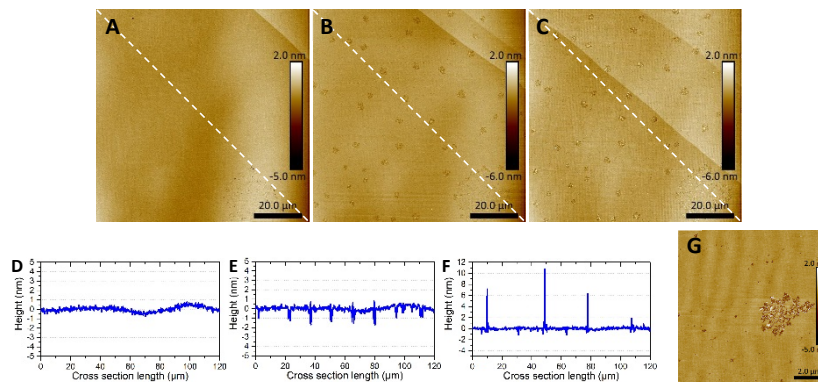
**Figure 3.2** - AFM images ( $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ ) of a pure POPC bilayer 1 h before (A), right before peptide addition (B), after 2 h (C) and after 12 h (D) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of G37C. Graph E is the cross section corresponding to the dashed line on image F ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ), recorded after 4 hours of incubation with the peptide.

### 3.4.2 Effects of the peptides on POPC/cholesterol bilayers (90/10)

We prepared POPC bilayers containing 10 mol% cholesterol and conducted the same experiments with both peptides to investigate the effect of the sterol. In this proportion, cholesterol is supposed to give rise to a fluid-fluid phase separation with the coexistence of lo and ld phases at room temperature, according to the phase diagram of the mixture [44]. The SLB did not exhibit topographically visible domains (**figure 3.3, A**). The cholesterol-containing membrane was thicker ( $4.5 \pm 0.4 \text{ nm}$ ) than the pure POPC SLB.

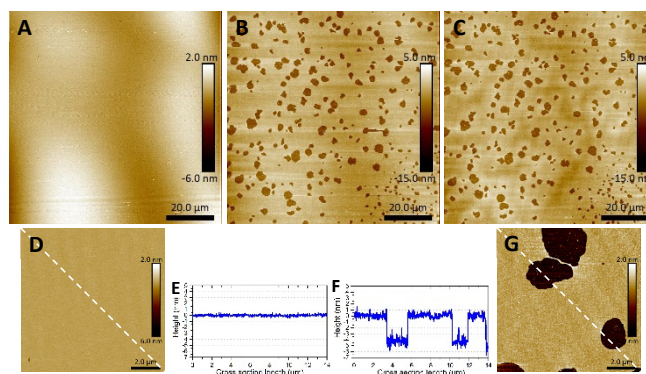
As pure POPC membranes, the SLB exhibited residual defects that resorbed over an hour (some are still visible on the right bottom corner on image A in **figure 3.3**). After a 2-hour incubation with  $A\beta_{1-42}$  (image B), we could observe the apparition of several large holes randomly distributed in the bilayer. The cross section on graph D indicates that these holes were  $1.4 \pm 0.2 \text{ nm}$  deep, which corresponds to the thickness of a lipid leaflet. No fibre deposition could be observed on the bilayers but the peptide appeared to slightly accumulate in the bilayer defects (Graph F and image G). These aggregates could reach a height of several nanometres.





**Figure 3.3** - AFM images ( $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC/cholesterol bilayer before peptide addition (A), after 2 h (B) and after 12 h (C) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Graphs D, E and F are the cross sections corresponding to the dashed line on images A, B and C respectively. Image G is a  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  image of one of the created defects.

The effects of G37C on POPC/cholesterol bilayers, as depicted on **figure 3.4**, were more pronounced compared to those of  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Image B, **figure 3.4** was recorded after a 2-hour incubation and shows that the oligomer extracted 20 to 25 % of the lipids from the surface. This membrane fragmentation was actually immediately observable (less than 10 minutes) after the addition of the peptide. No significant evolution over time was recorded within 12 h. It was concluded that G37C extracted some lipids on a very short time scale. The resulting holes were  $4.3 \pm 0.5 \text{ nm}$  deep (see cross-section D), which corresponds to the thickness of the bilayer.



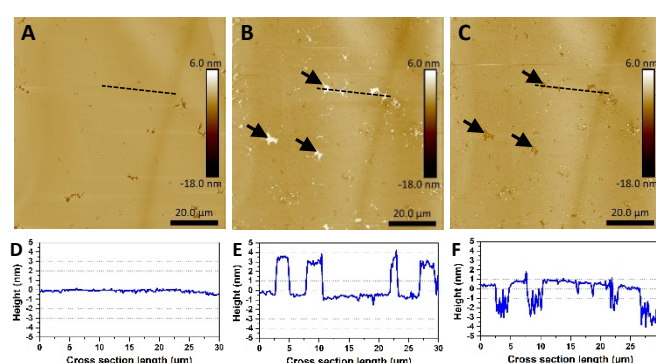
**Figure 3.4** - AFM images ( $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC/cholesterol bilayer before (A), after 2 h (B) and after 12 h (C) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of G37C. Images D and G ( $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}^2$ ) correspond to the bilayer morphology before peptide addition and after 2 h of incubation. The cross sections corresponding to the dashed line on images D and G are represented on graphs E and F.

### 3.4.3 Effects of the peptides on POPC/GM1 bilayers (90/10)

To highlight GM1 potential role on membrane/peptide interactions, similar experiments were carried out with POPC bilayers containing 10 mol% of the glycosphingolipid. This proportion is supposed to give rise to the formation of clusters [45]. The membrane exhibited a greater thickness ( $5.4 \pm 0.6 \text{ nm}$ ) than the previously studied systems, likely due to the sugar

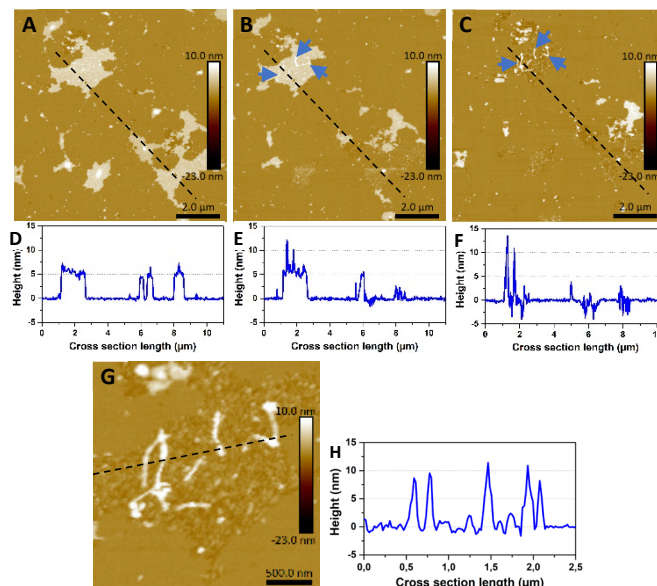
head group. Globally, the cross section did not reveal the presence of topographically visible domains.

After liposomes fusion on the surface, homogenous bilayers with a few remaining defects were obtained (**figure 3.5, A**). Within one-hour incubation with  $A\beta_{1-42}$ , flat aggregates that were 3 to 6-nm thick started to appear on the bilayer (see the black arrows on image **B** and the cross section on graph **E**). After 4 hours, the deposits gradually detached from the membrane, removing parts of the bilayer section that were beneath (see the black arrows on image **C** and the cross section on graph **F**). The resulting holes were  $3.9 \pm 0.7$  nm deep, a value corresponding to the entire bilayer thickness.



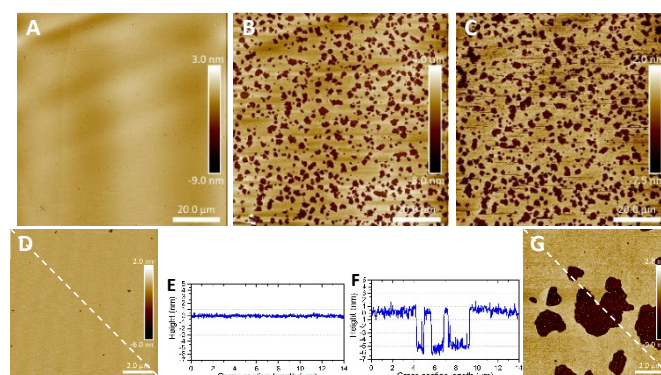
**Figure 3.5** - AFM images ( $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC/GM1 bilayer before (**A**), after 2 h (**B**) and after 12 h (**C**) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of  $A\beta_{1-42}$ . The black arrows point to deposits and the holes subsequently formed. Graphs **D**, **E** and **F** are the cross sections corresponding to the dashed lines on images **A**, **B** and **C** respectively.

On **figure 3.6**, images **A**, **B** and **C** represent  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  pictures on one of the deposits formed at the lipid bilayer surface. First, the formation of relatively flat aggregates that were  $\sim 5$ -nm thick (Image **A**) occurred. Some small thicker deposits could be observed within the flat aggregates. Subsequently, we could observe the progressive formation of small fibrils on these deposits (see the blue arrows on **E** and **F** and the associated cross sections). Initially, these fibrils appeared to be included in the aggregates (Image **B**) and, subsequently, the aggregates seemed to leave the bilayers (as observed in images **B** and **C** in **figure 3.5**), leaving the fibrils on a rough surface. The height of the fibrils was  $\sim 10$  nm (graph **H**). Images with a higher magnification are provided in the supplementary material (**figure 3S.3**).



**Figure 3.6** - AFM images ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) of  $\text{A}\beta_{1-42}$  aggregates on the POPC/GM1 bilayer after 2 h (A), 4 h (B) and 8 h (C) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of the peptide. The blue arrows show the fibrils formed on the aggregates. Graphs D, E and F are the cross sections corresponding to the dashed lines on image A, B and C respectively. Image G ( $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$ ) displays the fibrils. Graph H corresponds to the dashed line on image G.

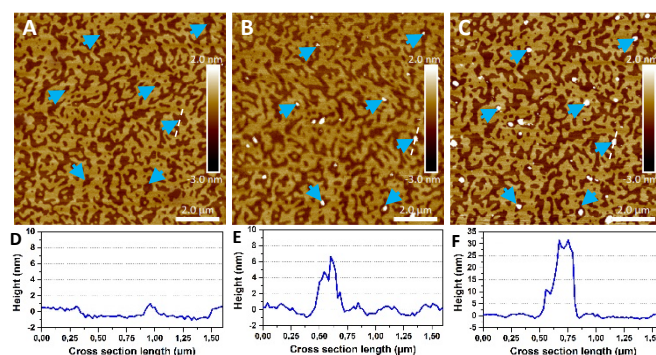
As observed with cholesterol-containing membranes, the effects of the oligomer G37C on membranes containing GM1 were pronounced and rapidly appeared (**figure 3.7**). About 30 to 35 % of the bilayer was removed after the addition of the oligomer as shown on image B; the lipid fragmentation was actually observed immediately after the addition of the peptide (less than 10 minutes). The cross section of the bilayer associated with the bilayer after a 12-hour incubation (graph D) indicated that micron-sized patches of entire bilayer were removed from the surface as holes that were  $3.5 \pm 0.6 \text{ nm}$  deep were created.



**Figure 3.7** - AFM images ( $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC/GM1 bilayer before (A), after 2 h (B) and after 12 h (C) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of G37C. Images D and G ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) were recorded before peptide addition and after 2 h of incubation in the centre of the zone scanned on images A and B respectively. The cross sections corresponding to the dashed line on D and G are represented on graphs E and F.

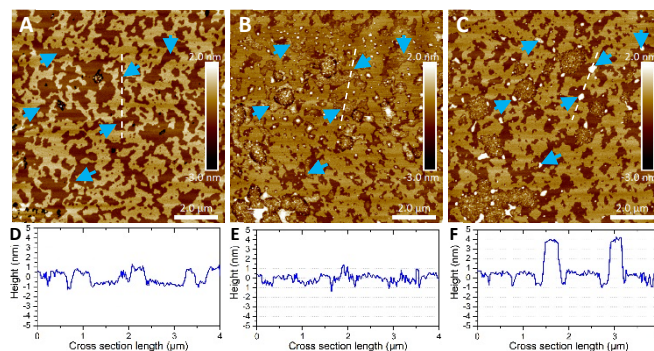
### 3.4.4 Effects of the peptides on DOPC/DPPC/cholesterol bilayers

In order to examine the influence of phase separations on the amyloid peptides interactions with bilayers, we investigated the effects of A $\beta$ <sub>1-42</sub> and G37C on DPPC/DOPC/cholesterol (6:4:4) bilayers. In agreement with the reported phase diagram [46], this lipid mixture exhibited a clear fluid-fluid phase separation (**figures 3.8** and **3.9**) with a height difference between the lo (DPPC-rich, clearer phase on the image) and ld phases (DOPC-rich, darker phase) of  $1.0 \pm 0.1$  nm. The ld-phase lipid bilayer was  $4.2 \pm 0.4$  nm thick. The addition of A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptide led to the quick formation of globular aggregates onto the bilayer (as seen as white spots on images B and C on **figure 3.8**, images **B** and **C**). These self-assemblies appeared to be specifically formed on the thinner (ld) domains (see blue arrows). The aggregate diameter reached 15 to 35 nm within 2 hours and did not show further increase over 12 hours. Lipid organization was almost not impacted by the presence of the peptide as ld and lo phases kept relatively similar shapes.



**Figure 3.8** - AFM images of a DPPC/DOPC/cholesterol bilayer before (**A**), right after addition (**B**) and after a 2-hour incubation with of A $\beta$ <sub>1-42</sub> (5  $\mu$ M) (**C**). Images are  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  to clearly distinguish the phase separation. On image **C**, the blue arrows point to different zones where the peptide formed aggregates. The locations of the arrows were reproduced on images **A** and **B**. Graphs **D**, **E** and **F** represent the cross sections corresponding to the dashed line on images **A**, **B** and **C** respectively.

Right after the addition of G37C (**figure 3.9, B**), we could observe a progressive adsorption of the peptide on the ld phase; the darker e. g. thinner (ld) regions were gradually covered by the peptide as they started to thicken after the peptide addition. Subsequently, the aggregation of the deposited peptide appeared to take place (image **C**), forming aggregates that were 4 to 5 nm thick. They did not grow after a 2-hour incubation. These particles appeared to form specifically on the ld domains, similarly to A $\beta$ <sub>1-42</sub>. In contrast with A $\beta$ <sub>1-42</sub> however, the deposition of G37C appeared to cause a significant reshaping of the domains.

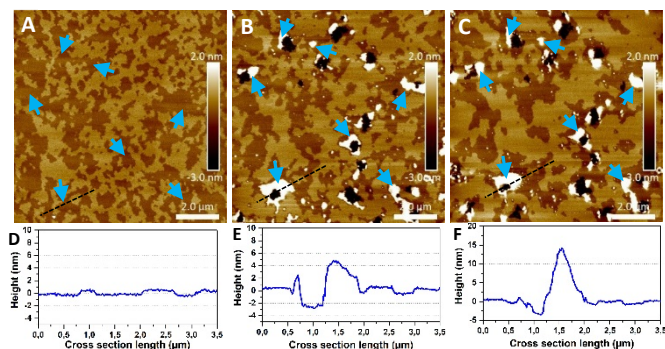


**Figure 3.9** - AFM images ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) of a DPPC/DOPC/cholesterol bilayer before (A), right after addition (B) and after 2 h (C) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of G37C. On image C, the blue arrows point to different zones where the peptide deposited and then formed aggregates. The locations of the arrows were reproduced on images A and B. Graphs D, E and F represent the cross sections corresponding to the dashed line on images A, B and C respectively.

### 3.4.5 Effects of the peptides on DOPC/SM/cholesterol bilayers

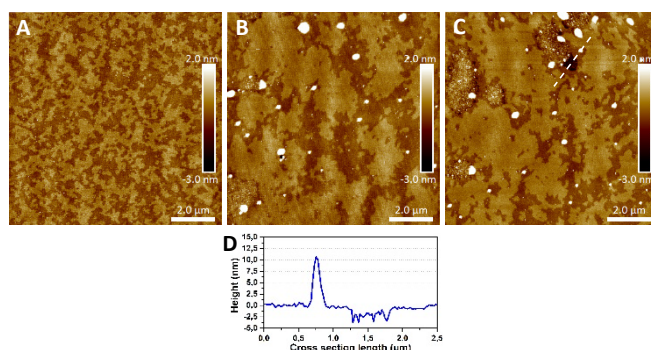
SM has been selected as a high- $T_m$  lipid to obtain a phase separation within lipid bilayers since lipid domains are known to be enriched in sphingomyelin [24, 47]. Moreover, this lipid species is present in brain cell membranes, especially in the outer leaflet [16]. In order to extend our conclusions on the selectivity of the amyloid peptides for fluid domains, we determined their impact on a DOPC/SM/cholesterol (1:1:1) bilayer mixture. In agreement with the phase diagram of the system [48], this ternary mixture also exhibits a phase separation with  $l_d$  domains rich in DOPC and  $l_o$  domains rich in both SM and cholesterol [49]; these domains could clearly be observed by AFM (**figure 3.10, A**) and look similar to the images previously obtained [50]. The thickness of the thinner domains was  $4.6 \pm 0.5 \text{ nm}$  and the height difference between the domains was  $1.1 \pm 0.2 \text{ nm}$ , a value similar to that observed for the DPPC/DOPC/cholesterol mixture.

The addition of  $A\beta_{1-42}$  rapidly led to important effects on the bilayer as shown on **figure 3.10**. First, the peptide rapidly formed aggregates. These self-assemblies also appeared to specifically target the  $l_d$ -phase (thinner) domains. These aggregates were  $\sim 5\text{-nm}$  thick after 10 minutes and reached 15 nm after a 2-hour incubation. Interestingly, the peptide also created holes in the vicinity of the aggregates. These holes were about 3 nm deep. Although  $A\beta_{1-42}$  provoked an important reorganization of the lipid domains, we can nonetheless recognize the shape of few domains and clearly state the affinity of the peptide for the thinner (DOPC-rich) phase (see blue arrows on images A, B and C).



**Figure 3.10** - AFM images ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) of a DOPC/SM/cholesterol bilayer before (A), after addition (10 minutes, B) and after 2-hour incubation with  $5 \mu\text{M}$  of  $\text{A}\beta_{1-42}$  peptide. On image C, the blue arrows point to different zones where the peptide deposited and then formed aggregates. The locations of the arrows were reproduced on images A and B. Graphs D, E and F are the cross sections corresponding to the dashed lines on images A, B and C respectively.

The addition of G37C to DOPC/SM/cholesterol bilayers led to a rapid aggregation of the peptide on the bilayer; **figure 3.11, B** shows the resulting globular aggregates, which have a height of  $\sim 15$  nm. These aggregates appeared within 10 minutes. It was not clear whether specific domains were targeted as the shape of the domains drastically changed upon the G37C addition in that case if we compare images B and C on **figure 3.11**. However, it can be clearly seen that the aggregates were exclusively located on the thinner domains of the bilayer. Besides the important reshaping of the domains, the mutant induced the formation of holes in the bilayer as *ld*-phase patches in the vicinity of the aggregates seemed to be extracted. This effect was similar to that observed with  $\text{A}\beta_{1-42}$  on DOPC/SM/cholesterol bilayers but, in the case of G37C, the kinetics appeared to be slower. No further changes could be observed for longer incubation time, up to 12 hours.



**Figure 3.11** - AFM images ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) of a DOPC/SM/cholesterol bilayer before (A), shortly after addition (10 minutes, B), and after 2 h (C) of incubation with  $5 \mu\text{M}$  of G37C. Graph D is the cross section corresponding to the dashed line on image C.

### 3.5 Discussion

In this study, the presence of domains was identified as a critical parameter modulating the impact of  $\text{A}\beta_{1-42}$  and G37C peptides on membranes as it appears to enhance the ability of

the peptides to interact with and to perturb lipid membranes. The ternary mixtures used in this investigation (DOPC/DPPC/cholesterol, and DOPC/SM/cholesterol) were specifically chosen as they display a clear phase separation observable using AFM and they do not include GM1. For the two mixtures, a height difference of approximately 1.0 nm was recorded between the domains, a value indicative of lo/l<sub>d</sub> phase coexistence. It is concluded that A $\beta$ <sub>1-42</sub> and G37C specifically accumulated as globular aggregates on l<sub>d</sub>-phase domains in both mixtures.

Hydrophobic interactions between the C-terminal of the peptide and the bilayer core have been previously suggested to lead this interaction [51-53]. The penetration of a part of the peptide in bilayers would be sensitive to the packing density of the lipids and would favour the association of the peptide with l<sub>d</sub>-phase domains. As all the phospholipids involved in the investigated ternary mixtures bear the same zwitterionic PC head group, the lipid chain packing is then the most likely factor dictating the preferential association of the peptides onto the l<sub>d</sub>-phase domains.

This preferred association of the amyloid peptides with the disordered phase is in agreement with a study reporting the preferential binding of A $\beta$ <sub>1-42</sub> to the non-raft l<sub>d</sub> domains of a similar phase-separated mixture [54]; in that study, bilayers were prepared with egg PC, sphingomyelin, GM1 and cholesterol. This specific affinity of the peptide for l<sub>d</sub>-phase domains was attributed to the stiffening effect of cholesterol-enriched l<sub>o</sub>-phase domains. Similarly, A $\beta$ <sub>1-42</sub> was shown to have a greater propensity to associate with cholesterol-depleted domains compared to the cholesterol-enriched ones in DOPC bilayers containing 20 mol% of cholesterol [19]. In that study, the preferred association was attributed to the greater electrostatic interactions; the peptide is negatively charged (-2.8) at physiological pH and the thinner cholesterol-depleted nanodomains showed a higher electrostatic potential than the cholesterol-enriched ones, as assessed by frequency-modulated Kelvin probe force microscopy.

Interestingly, these results contrast with the homogenous l<sub>d</sub>-phase POPC SLB for which no peptide deposition or impact could be observed with A $\beta$ <sub>1-42</sub> (**figure 3.1**). This is consistent with the poor peptide binding reported with pure DOPC bilayers [19]. Similarly, a Plasmon Waveguide Resonance (PWR) study showed that the interactions of A $\beta$ <sub>1-42</sub>, and G37C were relatively weak, non-specific, and reversible with DOPC SBL [5]. Such weak interactions with PC membranes are also consistent with the absence of calcein leakage observed from pure zwitterionic POPC with A $\beta$ <sub>1-42</sub> [42] and from DOPC liposomes incubated with the A $\beta$ <sub>1-42</sub> and G37C [5]. Therefore, it is concluded that A $\beta$ <sub>1-42</sub> displays only a limited interaction with homogeneous fluid PC membranes.

The specific targeting of the more disordered domains of phase-separated bilayers and the very limited absence of peptide adsorption on uniform ld-phase bilayer strongly suggest that the domain boundaries play a pivotal role in the interactions of the peptide with these membranes. It is established that lipid packing at domain interface presents defects, which are, for example, responsible for bilayer enhanced permeability. These characteristics are favourable for peptide/protein insertion as previously observed, for example, for HIV-gp4 1 [55], Rac1 [56] and a Bax-derived peptide [57]. SLB formed with sphingomyelin, cholesterol, and GM1 on mica displayed triangular-shaped domains and it was found that the edges of these led to the rapid aggregation of A $\beta$ <sub>1-40</sub> [58]. It is likely that lipid packing at the interface of these triangular domains is somehow perturbed and would be consistent with the hypothesis of amyloid peptides sensitively sensing bilayer defects. The impact of A $\beta$ <sub>1-42</sub> on the kinetics of domain formation in PC/SM/cholesterol/GM1 mixtures indicated that the amyloid peptide changed the line tension of lo/ld-phase interface [54], another finding supporting this hypothesis. In an analogous manner, it was shown that A $\beta$ <sub>1-42</sub> has a greater propensity to associate with bilayers and form fibrils when POPC forms SUVs than when it forms LUVs (large unilamellar vesicles) [53]. This different behaviour was associated with the inhomogeneous packing defects that exist in SUV bilayers because of the small radius of curvature. Actually, induction of aggregation/fibrillation by bilayer defects associated with bilayer curvature is also proposed for human islet amyloid polypeptide and may be a common phenomenon [59].

The favoured interactions of the amyloid peptides with regions having a disturbed lipid packing is supported by the behaviour of the G37C with pure POPC SLB; this mutant appeared to aggregate specifically on cured defects of POPC SLB (**figure 3.2**). As the cross section indicated, the oligomer aggregates showed a limited height ( $\pm 1$  nm over or below the bilayer level), suggesting a penetration of the oligomeric assemblies in the bilayer. The defects, resulting of the SUVs fusion, could no longer be observed by the AFM tip prior to the peptide addition but the lipid packing seems sufficiently different from the rest of the bilayer to act as aggregation sites. These defects were most likely cured by lateral lipid diffusion and it is proposed that lipids in these spots remained somehow less densely packed; these “healed” defects would then provide peptide anchoring sites that would be energetically more favourable.

The presence of cholesterol or GM1 in POPC SLB led to substantial bilayer perturbations induced by the amyloid peptides. In parallel, the AFM images displayed rather homogenous SLB prior to the addition of peptides. Despite the fact that these binary mixtures did not display a topographically visible phase separation, several studies indicate the formation



of small clusters or domains in these membranes. lo-ld phase separations have been proposed to occur for cholesterol proportion above 5-8 mol % [60-62]; such domains would have submicron scale length [63]. Similarly, different experimental techniques and molecular dynamics simulations have concluded that GM1 forms small clusters in PC matrix even at very low concentration [26, 64-67]. The perturbed lipid packing between these clusters and the rest of the fluid bilayer could lead to adsorption sites for the amyloid peptides. The presence of cholesterol in bilayers enhances the membrane affinity for the A $\beta$ <sub>1-42</sub> amyloid peptide [68]. Similarly, the presence of dense clusters of GM1 has been shown to strongly favour the association and the assembly of A $\beta$  peptides onto the membrane [26, 69, 70]. At this point, it is not possible to establish whether the peculiar order of the lipids surrounding these clusters plays a role in the peptide association to bilayers. Other contributions could be responsible or involved in the association of the amyloid peptides with the membranes. For example, hydrophobic interactions and hydrogen bonding between the peptide and the sugar hydroxyl groups of the glycolipid have been shown to be key contributions in the A $\beta$ <sub>1-42</sub> association to GM1 clusters [25, 26, 71, 72].

Bilayers promote the aggregation of the amyloid peptides and the structure of the resulting assemblies appears to be very dependent on the composition of the membrane. A $\beta$ <sub>1-42</sub> formed flat and thick aggregates that ultimately formed fibrils with POPC/GM1 bilayers whereas it formed globular aggregates with DPPC/DOPC/cholesterol bilayers and flat aggregates with irregular shape with DOPC/SM/cholesterol bilayers. Similarly, G37C formed flower-like aggregates with rough surfaces with POPC bilayers, globular aggregates with the ternary mixtures and would essentially lead to lipid extraction with POPC/cholesterol and POPC/GM1 bilayers. Clearly, the nature of the lipid bilayer dictates the structure of the bound peptide and its orientation relative to the bilayer. The way that the bound peptide is exposed to the solution then leads to different types of self-assemblies. This finding is consistent with the diverse aggregate structures observed in the presence of lipid, some leading to fibril formation, some not, the latter being referred to as off-pathway [73]. Moreover, lipid packing differences have been shown to lead to different aggregation of A $\beta$ <sub>1-40</sub>, PC SUVs leading to amyloid fibrils whereas PC LUVs leading to the formation of amorphous-like fibrils [59]. The structure of the aggregates appears to be sensitive to several parameters and small changes; for example SLB prepared from a mixture of SM, cholesterol, and GM1 induced the formation of A $\beta$ <sub>1-40</sub> fibrils when these bilayers were formed on mica surfaces, but to globular agglomerates when a SiO<sub>2</sub> substrate was used [58].

The evolution of the A $\beta$ <sub>1-42</sub> aggregates and the impacts on bilayers are also very sensitive to the composition of the membrane. With the POPC/GM1 system, the peptide formed flat aggregates that led to fibril formation. With DPPC/DOPC/chol bilayers, globular aggregates were formed with very little bilayer disruption. In DOPC/SM/chol system, there was also the formation of globular aggregates and these appeared to lead to lipid extraction, leaving large holes in the bilayers. Therefore, the structure and the orientation relative to the bilayer of the adsorbed peptides is likely different, depending on the bilayer composition. The membrane fragmentation appears to be associated with the accumulation and aggregation of the peptide onto the SLB. Such destabilization might have been provoked by the peptide insertion into the bilayer as previously suggested [14] or by an asymmetric pressure of the aggregates on the external leaflet, a phenomenon known as a carpeting effect [8, 74]. As the peptide aggregation took place essentially on the Id domains, it is likely that these domains are those more susceptible to fragmentation.

Except in the case of A $\beta$ <sub>1-42</sub> in the presence of POPC/GM1 bilayers, we did not find evidence of fibrils formation on the bilayers. It must be also pointed out that in the case of bilayers made of POPC/cholesterol or POPC/GM1, G37C induces a rapid bilayer fragmentation (less than 10 minutes). These observations suggest that membrane disruption can occur independently from the fibrillation process. This finding contributes to establish a pathway for membrane fragmentation. It supports the formation of « off-pathway» aggregates; these are described as oligomers whose structure does not lead to fibrillation. These oligomers however can interact with membranes and cause severe damages. Alternatively, it was proposed that membrane fragmentation occurs as a two-step process [75]: initially small-sized peptide oligomers would form in membranes (and alter the bilayer permeability) and subsequently, fibrillogenesis would cause lipid extraction from bilayers by a detergent-like mechanism. As no fibrils were detected while large holes were observed in the SLB, and that readily self-assembled G37C oligomer caused very rapid bilayer fragmentation, lipid extraction is likely associated with oligomers whose structure and/or bilayer orientation do not lead necessarily to fibrillation.

In the presence of POPC/GM1 bilayers, the deposition of the A $\beta$ <sub>1-42</sub> first led to the formation of relatively flat aggregates. Subsequently, these seemed to act as a platform for the progressive formation of fibrils. The fibrils observed on the bilayers had a thickness of ~10 nm, a range that is consistent with previously reported amyloid fibre size formed on membranes [76]. As this distinctive behaviour was observed with GM1-containing SLB, it is proposed that fibrils formation was catalysed by the presence of the glycolipid. It should be pointed out that the fibril formation was observed 4 h after the addition of the peptide to the bilayers while the

onset of fibril elongation in buffer occurred after 6 to 8 hours. This catalysing effect associated with the presence of GM1 clusters is consistent with previous finding on similar systems [77]. The local concentration of the peptide appeared to be a key event to seed the aggregation. Interestingly, the AFM results display a direct visual connection between the fibril formation and the membrane disrupting effects. Studies have reported the ability of GM1 to mediate the misfolding of the peptide from  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -sheet structure [26, 43, 78-80], a structural process that triggers the formation of fibrils [70, 78]. For POPC/GM1 bilayers, the aggregation process appeared to lead to both membrane disruption and fibrillogenesis. At this point, it is impossible to assess whether the fibrils were involved in the membrane fragmentation or if they resulted from a parallel pathway.

In general, G37C induced more extensive perturbations of bilayers than  $A\beta_{1-42}$ . For example, the extent of lipid extraction from POPC/cholesterol bilayers was greater (20-25 % for G37C compared to 5-10 % for  $A\beta_{1-42}$ ). Similarly, G37C could aggregate on pure POPC bilayers whereas the wild-type showed only a weak interaction. It also provoked an important reshaping of phase separated system which suggests that the peptide has a strong ability to perturb membranes. Along the same line, the kinetics of G37C impact on the bilayer morphology was typically faster than with the wild-type for the investigated bilayer compositions. These amplified detrimental effects correlate with the important degree of toxicity of the mutant in yeast [4]. The single-mutation mutant, which does not form fibrils, clearly shows that oligomers that cannot mature to the fibril state can induce severe membrane fragmentation.

### 3.6 Conclusions

In summary, this study indicates that  $A\beta_{1-42}$  and G37C interactions with membranes and the resulting damages are strongly modulated by the presence of lipid domains in the membranes. Therefore, their detrimental effects on membranes depend on the lipid composition; peptide aggregations and bilayer fragmentation were observed in membranes containing no GM1, indicating that this lipid may enhance the amyloid peptide affinity but is not essential for the interaction of these amyloid peptides with bilayers. As already proposed for SUV, lipid packing defects at the domain interface could act as adsorption and nucleation site for the amyloid peptides. Different types of aggregates can form, some leading to important membrane fragmentation, some that do not. Bilayer fragmentation is indeed a phenomenon that would be detrimental to cellular membranes. The pivotal role of membrane domains on the

membrane perturbations induced by the amyloid peptides reinforces the concept of the prime role of lipid rafts in the progression of the Alzheimer's disease [47]. As the bilayer composition has a decisive impact on the interactions of A $\beta$ <sub>1-42</sub> with membranes, the modification of neuronal membrane composition through ageing may play a key role in the development and the evolution of the neurodegenerative pathology. By inducing damages on membranes, the amyloid peptides may cause the loss of neuronal cell integrity and viability and therefore be involved in the general cerebral atrophy observed in the brain of individual suffering from the dementia.

### 3.7 Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interests.

### 3.8 Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), through its excellence network program supporting the Québec Centre for Advanced Materials, Université de Bordeaux's Initiative d'Excellence (IdEx) and Mitacs Globalink. We particularly thank Patricia Moraille from the Laboratoire de Caractérisation des Matériaux (LCM) of Université de Montréal for her technical support and assistance with AFM experiments. We thank Nad'a Lepejova-Caudy from the CBMN for the peptide production and purification.

### 3.9 References

1. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*. Physiological Reviews, 2001. **81**(2): p. 741-766.
2. Selkoe, D.J. and J. Hardy, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years*. EMBO Molecular Medicine, 2016. **8**(6): p. 595-608.
3. Iwatsubo, T., et al., *Visualization of Ab<sub>42</sub>(43) and Ab<sub>40</sub> in senile plaques with end-specific Ab; monoclonals: evidence that an initially deposited species is Ab<sub>42</sub>(43)*. Neuron, 1994. **13**(1): p. 45-53.
4. Vignaud, H., et al., *A structure-toxicity study of Ass<sub>42</sub> reveals a new anti-parallel aggregation pathway*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80262.
5. Henry, S., et al., *Interaction of A $\beta$ <sub>1-42</sub> amyloids with lipids promotes "off-pathway" oligomerization and membrane damage*. Biomacromolecules, 2015. **16**(3): p. 944-950.

6. Kaye, R., et al., *Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis*. Science, 2003. **300**(5618): p. 486-9.
7. Haass, C. and D.J. Selkoe, *Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**: p. 101.
8. Williams, T.L. and L.C. Serpell, *Membrane and surface interactions of Alzheimer's  $A\beta$  peptide-insights into the mechanism of cytotoxicity*. FEBS Journal, 2011. **278**(20): p. 3905-17.
9. Rushworth, J.V. and N.M. Hooper, *Lipid rafts: linking Alzheimer's Amyloid- $\beta$  production, aggregation, and toxicity at neuronal membranes*. International Journal of Alzheimer's Disease, 2010. **2011**: p. 603052.
10. Morel, B., et al., *Dynamic micellar oligomers of amyloid  $\beta$  peptides play a crucial role in their aggregation mechanisms*. Phys Chem Chem Phys, 2018. **20**(31): p. 20597-20614.
11. Butterfield, S.M. and H.A. Lashuel, *Amyloidogenic protein-membrane interactions: mechanistic insight from model systems*. Angewandte Chemie International Edition, 2010. **49**(33): p. 5628-54.
12. Ambroggio, E.E., et al., *Surface behavior and lipid interaction of Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide 1-42: a membrane-disrupting peptide*. Biophysical Journal, 2005. **88**(4): p. 2706-13.
13. Yip, C.M., A.A. Darabie, and J. McLaurin,  *$A\beta$ 42-peptide assembly on lipid bilayers*. Journal of Molecular Biology, 2002. **318**(1): p. 97-107.
14. Yip, C.M. and J. McLaurin, *Amyloid- $\beta$  Peptide Assembly: A Critical Step in Fibrillogenesis and Membrane Disruption*. Biophysical Journal, 2001. **80**(3): p. 1359-1371.
15. Taylor, D.R. and N.M. Hooper, *Role of lipid rafts in the processing of the pathogenic prion and Alzheimer's amyloid-beta proteins*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2007. **18**(5): p. 638-48.
16. Ingolfsson, H.I., et al., *Computational lipidomics of the neuronal plasma membrane*. Biophysical Journal, 2017. **113**(10): p. 2271-2280.
17. Choucair, A., et al., *Preferential accumulation of  $A\beta$ (1-42) on gel phase domains of lipid bilayers: An AFM and fluorescence study*. Biochimica et Biophysica Acta, 2007. **1768**(1): p. 146-154.
18. Sheikh, K., et al., *Differing modes of interaction between monomeric  $A\beta$  (1-40) peptides and model lipid membranes: an AFM study*. Chemistry and Physics of Lipids, 2012. **165**(2): p. 142-50.
19. Drolle, E., R.M. Gaikwad, and Z. Leonenko, *Nanoscale electrostatic domains in cholesterol-laden lipid membranes create a target for amyloid binding*. Biophysical Journal, 2012. **103**(4): p. L27-9.

20. Yip, C.M., et al., *Cholesterol, a modulator of membrane-associated  $\alpha\beta$ -fibrillogenesis and neurotoxicity* | Edited by A. Klug. *Journal of Molecular Biology*, 2001. **311**(4): p. 723-734.
21. Drolle, E., et al., *Changes in lipid membranes may trigger amyloid toxicity in Alzheimer's disease*. *PLoS One*, 2017. **12**(8): p. e0182194.
22. Quist, A., et al., *Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. **102**(30): p. 10427-32.
23. Di Scala, C., et al., *Mechanism of cholesterol-assisted oligomeric channel formation by a short Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide*. *Journal of Neurochemistry*, 2014. **128**(1): p. 186-95.
24. Sezgin, E., et al., *The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017. **18**(6): p. 361-374.
25. Matsuzaki, K., *Formation of toxic amyloid fibrils by Amyloid  $\beta$ -protein on ganglioside clusters*. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011. **2011**: p. 956104.
26. Matsuzaki, K., *How do membranes initiate Alzheimer's Disease? Formation of toxic amyloid fibrils by the amyloid beta-protein on ganglioside clusters*. *Accounts of Chemical Research*, 2014. **47**(8): p. 2397-404.
27. Matsuzaki, K., K. Kato, and K. Yanagisawa,  *$A\beta$  polymerization through interaction with membrane gangliosides*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010. **1801**(8): p. 868-77.
28. Cebecauer, M., M. Hof, and M. Amaro, *Impact of GM1 on Membrane-Mediated Aggregation/Oligomerization of  $\beta$ -Amyloid: Unifying View*. *Biophysical Journal*, 2017. **113**(6): p. 1194-1199.
29. Chi, E.Y., S.L. Frey, and K.Y.C. Lee, *Ganglioside GM1-Mediated Amyloid- $\beta$  Fibrillogenesis and Membrane Disruption*. *Biochemistry*, 2007. **46**(7): p. 1913-1924.
30. Vahed, M., et al., *Analysis of physicochemical interaction of  $A\beta$ 40 with a GM1 ganglioside-containing lipid membrane*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2018. **122**(14): p. 3771-3781.
31. Yanagisawa, K., *Role of gangliosides in Alzheimer's disease*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007. **1768**(8): p. 1943-51.
32. Curtain, C.C., et al., *Metal ions, pH, and cholesterol regulate the interactions of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptide with membrane lipid*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(5): p. 2977-82.
33. Wong, P.T., et al., *Amyloid- $\beta$  Membrane Binding and Permeabilization are Distinct Processes Influenced Separately by Membrane Charge and Fluidity*. *Journal of Molecular Biology*, 2009. **386**(1): p. 81-96.

34. Dante, S., T. Hauss, and N.A. Dencher, *Cholesterol inhibits the insertion of the Alzheimer's peptide A $\beta$  (25-35) in lipid bilayers*. *European Biophysics Journal*, 2006. **35**(6): p. 523-31.
35. Beel, A.J., et al., *Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships?* *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010. **1801**(8): p. 975-82.
36. Di Scala, C., et al., *Interaction of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptides with cholesterol: mechanistic insights into amyloid pore formation*. *Biochemistry*, 2014. **53**(28): p. 4489-502.
37. Henry, S., et al., *Interaction of A $\beta$ 1-42 peptide or their variant with model membrane of different composition probed by infrared nanospectroscopy*. *Nanoscale*, 2018. **10**(3): p. 936-940.
38. Bobo, C., et al., *Synthetic toxic A $\beta$ 1-42 oligomers can assemble in different morphologies*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2017. **1861**(5 Pt A): p. 1168-1176.
39. Sarroukh, R., et al., *ATR-FTIR: a "rejuvenated" tool to investigate amyloid proteins*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013. **1828**(10): p. 2328-38.
40. D'Angelo, F., et al., *A yeast model for amyloid- $\beta$  aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity*. *Disease Models & Mechanisms*, 2013. **6**(1): p. 206-16.
41. Reviakine, I. and A. Brisson, *Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy*. *Langmuir*, 2000. **16**(4): p. 1806-1815.
42. McLaurin, J. and A. Chakrabartty, *Membrane disruption by Alzheimer  $\beta$ -Amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides: implication for neurotoxicity*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(43): p. 26482-26489.
43. Matsuzaki, K. and C. Horikiri, *Interactions of Amyloid  $\beta$ -Peptide (1-40) with Ganglioside-Containing Membranes*. *Biochemistry*, 1999. **38**(13): p. 4137-4142.
44. Reyes Mateo, C., A. Ulises Acuña, and J.C. Brochon, *Liquid-crystalline phases of cholesterol/lipid bilayers as revealed by the fluorescence of trans-parinaric acid*. *Biophysical Journal*, 1995. **68**(3): p. 978-987.
45. Shi, J., et al., *GMI clustering inhibits cholera toxin binding in Supported Phospholipid Membranes*. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. **129**(18): p. 5954-5961.
46. Marsh, D., *Cholesterol-induced fluid membrane domains: a compendium of lipid-raft ternary phase diagrams*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009. **1788**(10): p. 2114-23.
47. Hicks, D.A., N.N. Nalivaeva, and A.J. Turner, *Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling*. *Frontiers in Physiology*, 2012. **3**: p. 189.

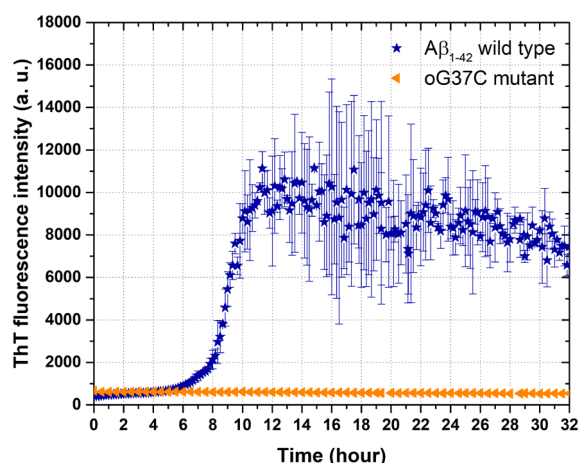
48. Pontani, L.-L., et al., *Immiscible lipids control the morphology of patchy emulsions*. *Soft Matter*, 2013. **9**(29): p. 7150.
49. van Duyl, B.Y., et al., *Sphingomyelin is much more effective than saturated phosphatidylcholine in excluding unsaturated phosphatidylcholine from domains formed with cholesterol*. *FEBS Letters*, 2003. **547**(1-3): p. 101-106.
50. Sacchi, M., et al., *Effect of neurosteroids on a model lipid bilayer including cholesterol: An atomic force microscopy study*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015. **1848**(5): p. 1258-67.
51. Zhao, J., et al., *Molecular dynamics simulations of low-ordered Alzheimer  $\beta$ -amyloid oligomers from dimer to hexamer on self-assembled monolayers*. *Langmuir*, 2011. **27**(24): p. 14876-87.
52. Lockhart, C. and D.K. Klimov, *Alzheimer's  $A\beta$ 10-40 peptide binds and penetrates DMPC bilayer: an isobaric-isothermal replica exchange molecular dynamics study*. *J Phys Chem B*, 2014. **118**(10): p. 2638-48.
53. Kinoshita, M., et al., *Model membrane size-dependent amyloidogenesis of Alzheimer's amyloid- $\beta$  peptides*. *Phys Chem Chem Phys*, 2017. **19**(24): p. 16257-16266.
54. Staneva, G., et al., *The Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptide affects the size-dynamics of raft-mimicking *Lo* domains in GM1-containing lipid bilayers*. *Soft Matter*, 2018. **14**(47): p. 9609-9618.
55. Yang, S.-T., V. Kiessling, and L.K. Tamm, *Line tension at lipid phase boundaries as driving force for HIV fusion peptide-mediated fusion*. *Nature communications*, 2016. **7**: p. 11401-11401.
56. Moissoglu, K., et al., *Regulation of Rac1 translocation and activation by membrane domains and their boundaries*. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 11): p. 2565-76.
57. Garcia-Saez, A.J., et al., *Pore formation by a Bax-derived peptide: effect on the line tension of the membrane probed by AFM*. *Biophys J*, 2007. **93**(1): p. 103-12.
58. Mao, Y., et al., *Surface-induced phase separation of a sphingomyelin/cholesterol/ganglioside GM1-planar bilayer on mica surfaces and microdomain molecular conformation that accelerates  $A\beta$  oligomerization*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1798**(6): p. 1090-9.
59. Terakawa, M.S., et al., *Impact of membrane curvature on amyloid aggregation*. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2018.
60. Pata, V. and N. Dan, *Effect of membrane characteristics on phase separation and domain formation in cholesterol-lipid mixtures*. *Biophysical Journal*, 2005. **88**(2): p. 916-924.
61. Hjort Ipsen, J., et al., *Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987. **905**(1): p. 162-172.



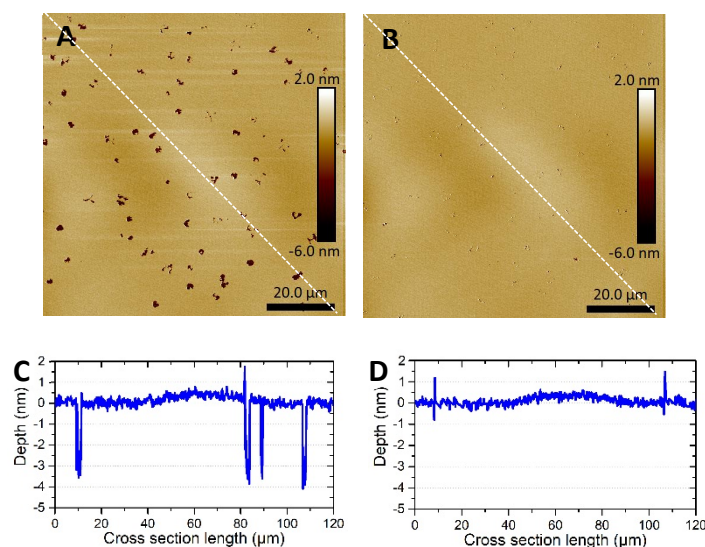
62. Veatch, S.L. and S.L. Keller, *Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol*. Biophysical Journal, 2003. **85**(5): p. 3074-3083.
63. Veatch, S.L. and S.L. Keller, *Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes*. Biochimica et Biophysica Acta, 2005. **1746**(3): p. 172-85.
64. Patel, D.S., et al., *Influence of ganglioside GM1 concentration on lipid clustering and membrane properties and curvature*. Biophysical Journal, 2016. **111**(9): p. 1987-1999.
65. Sagle, L.B., et al., *Single plasmonic nanoparticle tracking studies of solid supported bilayers with ganglioside lipids*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(38): p. 15832-9.
66. Marushchak, D., et al., *Self-aggregation-an intrinsic property of GM1 in lipid bilayers*. Mol Membr Biol, 2007. **24**(2): p. 102-12.
67. Sachl, R., et al., *On multivalent receptor activity of GM1 in cholesterol containing membranes*. Biochimica et Biophysica Acta, 2015. **1853**(4): p. 850-7.
68. Subasinghe, S., et al., *Cholesterol is necessary both for the toxic effect of A $\beta$  peptides on vascular smooth muscle cells and for A $\beta$  binding to vascular smooth muscle cell membranes*. Journal of Neurochemistry, 2003. **84**(3): p. 471-479.
69. Matsubara, T., et al., *Density of GM1 in nanoclusters is a critical factor in the formation of a spherical assembly of amyloid  $\beta$ -protein on synaptic plasma membranes*. Langmuir, 2013. **29**(7): p. 2258-64.
70. Ogawa, M., et al., *Ganglioside-mediated aggregation of amyloid beta-proteins (A $\beta$ ): comparison between A $\beta$ -(1-42) and A $\beta$ -(1-40)*. J Neurochem, 2011. **116**(5): p. 851-7.
71. Hoshino, T., et al., *Binding and aggregation mechanism of amyloid beta-peptides onto the GM1 ganglioside-containing lipid membrane*. Journal of Physical Chemistry B, 2013. **117**(27): p. 8085-94.
72. Ikeda, K. and K. Matsuzaki, *Driving force of binding of amyloid beta-protein to lipid bilayers*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **370**(3): p. 525-9.
73. Rangachari, V., et al., *Cause and consequence of A $\beta$  - Lipid interactions in Alzheimer disease pathogenesis*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2018.
74. Shai, Y., *Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1999. **1462**(1): p. 55-70.
75. Sciacca, M.F., et al., *Two-step mechanism of membrane disruption by A $\beta$  through membrane fragmentation and pore formation*. Biophys J, 2012. **103**(4): p. 702-10.

76. Okada, T., et al., *Formation of toxic A $\beta$ (1–40) fibrils on GM1 ganglioside-containing membranes mimicking lipid rafts: polymorphisms in A $\beta$ (1–40) fibrils*. Journal of Molecular Biology, 2008. **382**(4): p. 1066-1074.
77. Choo-Smith, L.-P.i., et al., *Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of A $\beta$ -(1–40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(37): p. 22987-22990.
78. Kakio, A., et al., *Interactions of Amyloid  $\beta$ -protein with various gangliosides in raft-like membranes: importance of GM1 ganglioside-bound form as an endogenous seed for Alzheimer amyloid*. Biochemistry, 2002. **41**(23): p. 7385-7390.
79. Okada, T., et al., *Formation of toxic fibrils of Alzheimer's amyloid beta-protein-(1-40) by monosialoganglioside GM1, a neuronal membrane component*. J Mol Biol, 2007. **371**(2): p. 481-9.
80. Okada, Y., et al., *Toxic amyloid tape: a novel mixed antiparallel/parallel beta-sheet structure formed by Amyloid beta-protein on GM1 clusters*. ACS Chem Neurosci, 2019. **10**(1): p. 563-572.

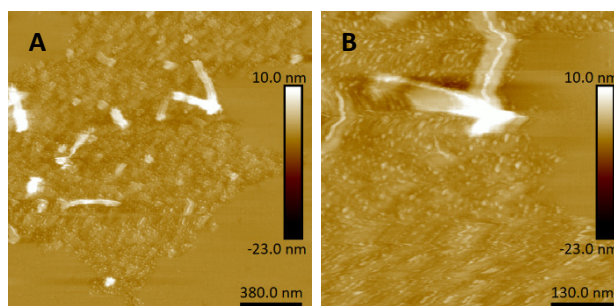
### 3.10 Supplementary material



**Figure 3S.1** - Thioflavin T fluorescence intensity variation as a function of time for  $A\beta_{1-42}$  (blue stars) and G37C peptides (orange triangles). Concentration was  $5 \mu\text{M}$  in a total volume of  $100 \mu\text{L}$  of buffer.



**Figure 3S.2** - AFM images ( $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ ): coalescence phenomenon as illustrated on the disappearance of defects on a POPC bilayer (A) and after 1 h (B), recorded on the same zone. Graphs C and D represent the cross sections corresponding to the dashed lines on images A and B respectively.



**Figure 3S.3** - AFM images of the fibrils formed on the POPC/GM1 bilayer; magnifications are  $1.9 \times 1.9 \mu\text{m}^2$  (A) and  $650 \times 650 \text{nm}^2$  (B).

# Chapitre 4 : Tau protein fragment K18 peptide interactions with membranes : the role of lipids

Mehdi Azouz, Cécile Feuillie, Christophe Cullin, Michaël Molinari, Michel Lafleur, Sophie Lecomte

## Article en préparation

### 4.1 Abstract

In Alzheimer's disease (AD), neurofibrillary tangles, which result from the aggregation of the tubulin associated unit protein (Tau), constitute one of the hallmarks of the devastating pathology. The development of such aggregates and their deposition in the brain seem to correlate with the onset of neurodegeneration processes. Tau holds a vital role in maintaining neuron integrity and the dysfunction of the protein, resulting from its misfolding and subsequent aggregation into paired helical filaments that further form the tangles, is consistent with neuronal loss and cognitive decline. The aggregation of the protein then seems to be a causative factor of the neurodegeneration associated with AD. The hypothesis of an involvement of the membrane in modulating the misfolding and assembly of Tau into paired helical filaments attracts increasing interests. To provide more insight about how lipids can modulate the interactions with Tau, we have conducted a comprehensive atomic force microscopy (AFM) study involving supported lipid bilayers of controlled compositions with the microtubule-binding construct K18. We have investigated how zwitterionic and negatively charged phospholipids can drive the interaction. We observed deleterious solubilisation effects on fluid zwitterionic membranes and the inability of K18 to fragment gel phases. We also highlighted the role of negative lipids in the aggregation of the peptide and visualized the particular ability of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) in inducing K18 fibrillation on membranes.

## 4.2 Introduction

The tubulin associated unit, classically abbreviated Tau, is a protein that binds to the microtubules in the axon to ensure their stability, a decisive function that maintains the cytoskeleton integrity and the viability of neuron cells [1, 2]. The physiological impairment of this binding, suspected to be induced by pathological modifications of the protein native state, is involved in a wide range of neurodegenerative disorders called tauopathies, one of the most common of which being Alzheimer's disease (AD) [3, 4]. Neurofibrillary tangles (NFT) are intracellular aggregates that constitute one of the hallmarks of the latter pathology [3]. Prior to forming highly structured NFT, Tau self-assembles into intertwined strands, forming fibrils that constitute assemblies called paired helical filaments (PHF) and through which the protein expresses an amyloid propensity [5, 6]. The aggregation of Tau into PHF is a process that is suspected to prevent the protein association to the microtubules, a phenomenon that would eventually lead to the collapsing and death of neurons. Due to the hyperphosphorylated state of Tau within PHF, a molecular modification of the protein has been suspected to impair this association [7, 8]. Yet, it remains unclear whether the aggregation pattern stems from the phosphorylation process.

Unlike its amyloid counterpart A $\beta$ , which aggregates spontaneously *in vitro* [9], Tau needs a co-factor to self-assemble and form fibres [10, 11]. A $\beta$  aggregation and accumulation in the brain is less temporally correlated to changes in cognition contrarily to Tau, which appears more consistent with the manifestation of the AD pathological traits [12, 13]. Hence, getting insights into the mechanistic process of Tau aggregation *in vitro* is of paramount importance to better understand the mechanisms that might induce neuron loss and result in cognitive decline [14]. The protein is a flexible and highly soluble molecule that is intrinsically disordered in its native form [15, 16], even when bound to the microtubule surface [17]. Yet, the self-assembly process leading to the formation of amyloid fibrils and further to the PHF requires an intrinsic folding of the protein that eventually generates the characteristic cross  $\beta$  structured of amyloid fibres [18].

Negatively charged molecules in the form of anionic or polyanionic agents have demonstrated the ability to trigger Tau aggregation; these include RNA [19] and sulphated glycosaminoglycans such as heparin sulfate [20], two components that have been found in the NFT [20]. However, the structure of the fibres formed *in vitro* with such agents differ from that formed *in vivo* [21].

In the aggregation process of the protein, the microtubule binding domain, which contains 3 to 4 repeat units (R1, R3, R4 and/or R2), plays a decisive role as it has been shown to induce the nucleation and constitutes the core of the PHF in AD [22, 23]. A conformational change from random coil to  $\beta$ -sheet has been locally observed in R2 and R3 repetition units, which indicates that the amyloid propensity of the protein most likely stems from its microtubule-binding domain. In particular, two short portions of 6 amino acids within the R2 and R3 repeat units have been identified as initiators of the folding [24, 25]. Many studies have hence been focusing on K18 and K19, two repeat domain constructs that constitute Tau binding domain to microtubules, rather than on the protein itself [26, 27]. The propensity of these peptides to aggregate is even more favourable than longer protein isoforms [28] and then constitute central candidates to investigate. K18 is a 12-kDa peptide which sequence constitutes, with the flanking proline rich regions of Tau, the full microtubule binding domain (**figure 4.1, A**) [29]. It has a supplementary repeat unit compared to K19 and this difference substantially increases its binding affinity to the microtubules [30] and its aggregation propensity [16].

Recently, the hypothesis of an interaction of Tau with membranes has been attracting increasing interests as the protein has been shown to interact with the membrane of neurons [31-33]. *In vitro*, phospholipids have demonstrated the ability to initiate the aggregation [27, 34-36] and fibrillation [37] of Tau or K18. Furthermore, there is evidences of lipids in the fibres formed *in vivo* [38] and *in vitro* [37]. As Tau is an intracellular protein, current studies focus on lipids found in the inner leaflet of the membranes and with which the protein most likely interacts [34, 35]. Electrostatic interactions are coined to be pivotal in triggering Tau fibres formation as only anionic molecules were shown to be efficient [39].

Yet overall, interactions with lipids have not been studied in detail, and there is still a lack of knowledge regarding how the nature of lipids modulates their interaction with the protein, and the underlying molecular modes of action.

In this work, atomic force microscopy (AFM) was used to investigate the interactions of K18 with supported lipid bilayers (SLB) of different compositions. This approach is well suited for monitoring the peptide interactions with membranes and for visualizing *in situ* effects of such phenomena with high lateral and vertical resolutions, in physiological conditions [40, 41]. We show that K18 peptide can have detrimental effects on zwitterionic membranes as we observed important SLB desorption, a phenomenon that can be interpreted as a membrane solubilization upon incubation with the peptide. Interestingly, the peptide seems sensitive to the lipid packing density as only liquid disordered (ld) phases were significantly solubilised.

Evidences of K18 aggregation on SLB were only observed in presence of the negatively charged lipids 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (POPS) and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol-4',5'-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) included in 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) bilayers. Interestingly, fibrillation was only observed with PIP<sub>2</sub>-containing SLB; this result suggests that fibrillation is a membrane-supported phenomenon. This work highlights lipid compositional factors that can lead to membrane damaging effects and membrane-induced K18 fibrillation.

## 4.3 Materials and methods

### 4.3.1 Materials

POPC, POPS, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), PIP<sub>2</sub> (isolated from porcine brain) and cholesterol were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). The phospholipids were received as organic solutions (chloroform and chloroform/methanol/water for PIP<sub>2</sub> (20:9:1 vol/vol)) while cholesterol was obtained as a powder. 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Hepes), sodium citrate tribasic dihydrate, calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) sodium chloride (NaCl) and heparin sulfate were obtained from Sigma (Steinheim, Germany). Aqueous solutions were all prepared with ultra-pure water (18 MΩ cm).

### 4.3.2 Peptide production

pNG2 K18 (kindly provided by Pr. E. Mandelkow) was used to transform *Escherichia coli* C41(DE3) (F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)). Several transformants were grown on 120 mL LB + 1% dextrose, 100 mg/L ampicillin. When the culture reached an optical density OD<sub>650</sub> = 0.52, 10 mL was added to 990 mL of ZYM 5052 medium (1% N-Z-amine, 0.5% yeast extract, 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5% glycerol, 0.05% dextrose, 0.2% lactose) containing 100 mg/L ampicillin and incubated overnight at 37 °C.

After centrifugation, cell pellets were suspended in 50 mL of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) pH 6.8 (20 mM), NaCl (500 mM), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 1 mM) phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 1mM), benzamidine (2 mM) and dithiothreitol (DTT, 5 mM), sonicated four times (1 min cycles on ice; output 5, 50 % duty cycle) and then heated at 80 °C for 20 min. After centrifugation (30 min at 15 000 g), the supernatant was then dialyzed for at least 16 h at 4 °C against cation exchange buffer A (20 mM MES, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, pH 6.8) with a Spectra/Por Dialysis Membrane (MWCO 3.5 kDa). The

dialysate was then cleared (30 min, 15 000g), filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  membrane and apply onto an HiTrap SP (GE Healthcare) equilibrated with the cation exchange buffer A. After washing with 25 mL of the same buffer, the protein was eluted with 25 mL of Buffer B (MES 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, pH 6.8) and the 5 mL fractions containing most of K18 were pooled and concentrated by ultrafiltration devices (e.g., Ultrafree, Millipore 5 kDa MWCO) to a final volume of 0.5 to 1 mL. Finally, the peptide concentrate was applied onto a gel filtration column (Superdex-75) equilibrated in 100 mM Ammonium acetate containing 2-mercaptoethanol (0.1 %). The fractions containing the pure peptide were pooled, aliquoted and lyophilized.

### 4.3.3 Preparation of the lipid suspensions

Appropriate volumes of individual lipid solutions were mixed to obtain the desired molar ratio. Organic solvents were then evaporated under a gentle stream of nitrogen to form lipid films. In case of the mixtures with PIP<sub>2</sub>, evaporation was carried out at 50 °C to ensure the miscibility of the lipids. To remove residual solvent traces, the lipid films were further dried in vacuum at room temperature overnight. They were then dissolved into a Hepes buffer (20 mM, 140 mM NaCl, pH 7.4). For PIP<sub>2</sub> mixtures with POPC, a citrate buffer (20 mM, 140 mM NaCl, pH 3) was employed. The final concentration of the suspensions was  $\sim 1$  mg/mL and each suspension was thoroughly agitated at 50 °C for 30 minutes. The resulting multilamellar vesicle suspensions (MLVs) were then submitted to 3 freeze and thaw cycles and sonicated in a bath (Fisher Scientific, Illkirch, France) at 50 °C until the suspensions reached clarity. The resulting suspensions of Small Unilamellar Vesicles (SUVs) were then filtered using a polyethersulfone filter with 200-nm pores and stored in Eppendorf tubes at 4 °C for no longer than 2 weeks.

### 4.3.4 Preparation of the supported lipid bilayers and addition of K18

A volume of 80  $\mu\text{L}$  of a SUVs suspension was deposited onto freshly cleaved 10 mm muscovite mica disks (Agar Scientific, Stansted, UK) previously heated to 75 °C and left to slowly cool down for 30 minutes to allow for vesicle deposition. The remaining volume was removed and the disk was rinsed several times with buffer (20 mM Hepes, 140 mM NaCl, pH 7.4). In case of the POPC/POPS mixture (4:1), a volume of 20  $\mu\text{L}$  of a CaCl<sub>2</sub> solution (1 mM) was first deposited onto the mica disk before adding the SUVs suspension. For the POPC/PIP<sub>2</sub> mixture (5:1), rinsing with the Hepes buffer was preceded by a 30-minute incubation in a mildly acid citrate buffer (20 mM, 140 mM NaCl, pH 4.5). For imaging convenience, the total volume of incubation was set to 100  $\mu\text{L}$ .



Once the SLB was characterized by AFM, an aliquot of K18 solution was added after having removed an equivalent volume of buffer to set the peptide total concentration to 1  $\mu\text{M}$ .

### 4.3.5 Atomic force microscopy

Peak Force Tapping Quantitative Nano-Mechanicals (PFT-QNM) mode was used to perform AFM imaging of the different SLB on an Icon FastScan system (Bruker, Santa Barbara, CA) in liquid conditions at room temperature (20 °C). Nitride coated silicon cantilevers (ScanAsyst Fluid+, Bruker) with a resonance frequency of 150 kHz, a nominal spring constant of 0.7 N/m and a tip radius of 10 nm were used for this work and were calibrated for each experiment. Images were acquired with a scan rate of  $\sim 1.0 - 1.5$  Hz, with a force kept as low as possible (typically 0.5 nN or lower) and were recorded by scanning the same selected areas at different times. Resolution was set to 512 x 512 pixels and imaging gains were automatically optimized by the software. Images were analysed and processed with the Nanoscope Analysis software (Bruker). SLB thickness were determined with the cross-section tool by measuring the difference in height between the mica and the top of the membranes, typically at residual defects in the SLB. Special care was dedicated to avoid potential dehydration of the bilayers. When not scanning, the samples were covered with a petri dish to minimize evaporation. When necessary, Hepes buffer was added to maintain a relatively constant incubation volume and avoid potential variations of peptide concentration. For each sample, three different zones of the surface were selected and scanned several times with gradually higher magnification before and during the incubation. Experiments were repeated to ensure the reproducibility of the observed effects. For each composition, three different SLB were prepared from a same SUV suspension and 2 to 3 AFM images were recorded at the desired incubation duration.

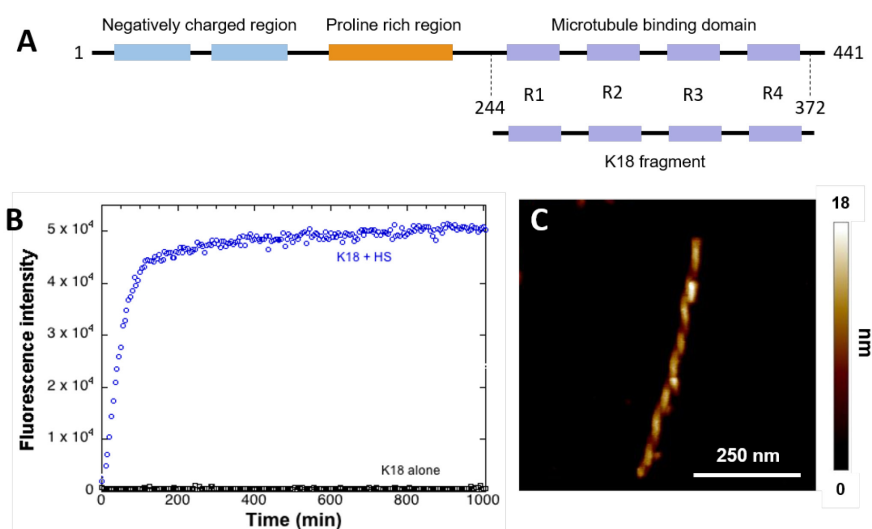
### 4.3.6 Fluorescence assays

Fluorescence assays were carried out in standard 96-well flat bottom and low binding black plates (Greiner, Frickenhausen, Germany) on a Clariostar microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany), at 30 °C using wavelengths of 440 nm and 480 nm for Thioflavine T (ThT) excitation and emission respectively. Final concentrations were as follows: 20  $\mu\text{M}$  ThT,  $\sim 10$   $\mu\text{M}$  K18, and 4  $\mu\text{M}$  heparin sulphate when present.

## 4.4 Results

As a control, fluorescence assays were carried out in presence of heparin sulfate to verify the fibrillation of K18 prior to experiments in the presence of lipids. This anionic

polysaccharide has been shown to induce the assembly of K18 after a subsequent binding to the R2 and R3 repeat units [24]. Incubation with heparin gave rise to the formation of long amyloid fibres as assessed with ThT fluorescence assays (**figure 4.1, B**). In absence of heparin sulfate, the peptide did not form fibres.

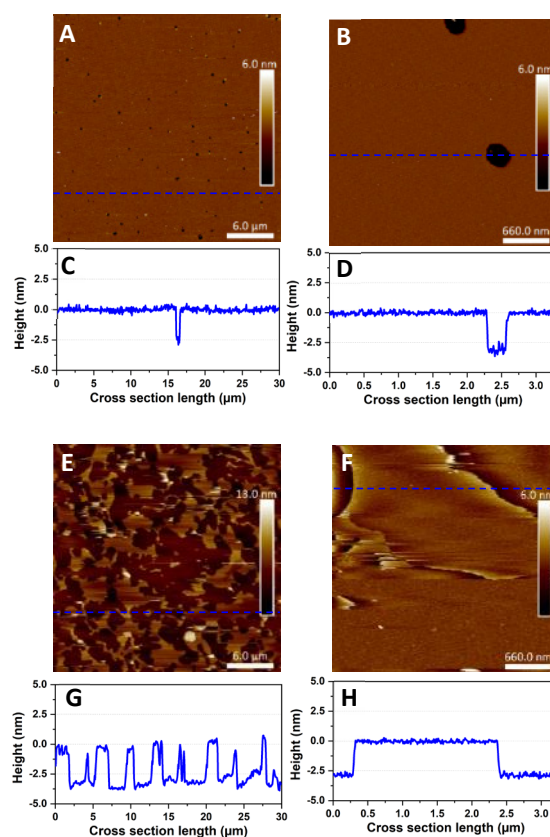


**Figure 4.1** - Structure of full-length Tau (A). Graph B represents ThT fluorescence assay curves obtained with K18 without (black) and in the presence (blue) of heparin sulfate (HS). C is a 600 x 600  $\mu\text{m}^2$  AFM image of the K18 fibers formed in presence of heparin sulfate as a cofactor.

The fibres (**figure 4.1, C**) were observed in liquid by AFM and demonstrated a helical structure that is reminiscent of the PHF [42]. However, it was recently shown that the conformation of the protein in the fibres formed *in vivo* was different from that formed *in vitro* with the use of such polyanions [21]. This suggests there might exist other fibrillation pathways and arouses a need for further investigations like the implication of membrane lipids.

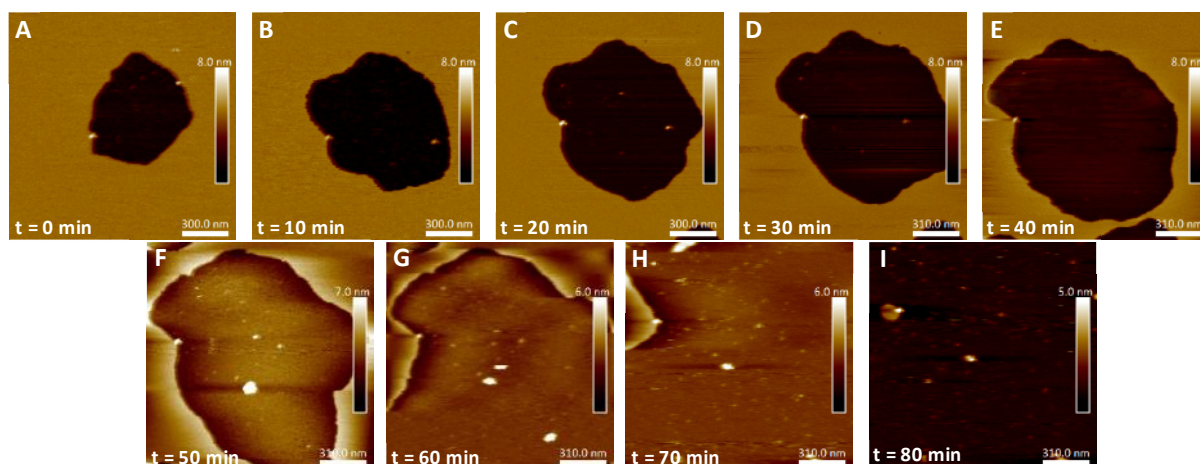
#### 4.4.1 Effects of K18 on SLB containing zwitterionic lipids

First, pure POPC bilayers were used as this zwitterionic lipid constitutes the main lipid in mammal membranes. They act as a matrix for the lipids of interest in this work. It was thus mandatory to study how of K18 responds to the presence of a pure POPC SLB. The deposition of the SUVs led to the formation of a uniform SLB with a thickness of  $3.6 \pm 0.2$  nm as shown of **figure 4.2**. Surprisingly, the peptide has provoked a significant disrupting effects, with the solubilisation of most of the SLB as visible from the cross sections (**figure 4.2, G and F**).



**Figure 4.2** - Effect of K18 on POPC SLB. AFM images of a pure POPC SLB before the addition of the peptide (**A** and **B**) and images of the exact same locations after a 2-hour incubation with 1  $\mu\text{M}$  of K18 (**E** and **F**). Left column: 30 x 30  $\mu\text{m}^2$  and right column: 3.3 x 3.3  $\mu\text{m}^2$ . Graphs **C**, **D**, **G** and **H** are the cross-sections corresponding to the blue dashed lines on **A**, **B**, **E** and **F** respectively.

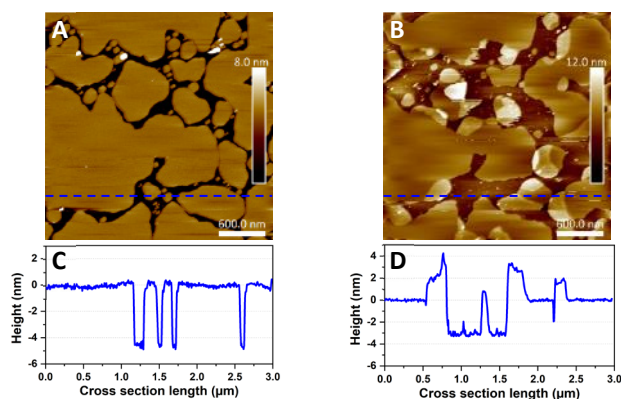
To get details about how the peptide exerted its detrimental effects on membranes, we repeated the experiment with a lower incubation peptide concentration (100 nM instead of 1  $\mu\text{M}$ ). When focusing on static features of the SLB such as a residual defect, we could notice that the peptide started solubilizing the membrane from the edges as depicted on the AFM images on **figure 4.3**.



**Figure 4.3** - AFM images ( $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC SLB incubated with 100 nM of K18. Image **A** represents a residual defect in the SLB before the peptide addition. Images **B** to **I** were recorded every 10 minutes after the addition of K18.

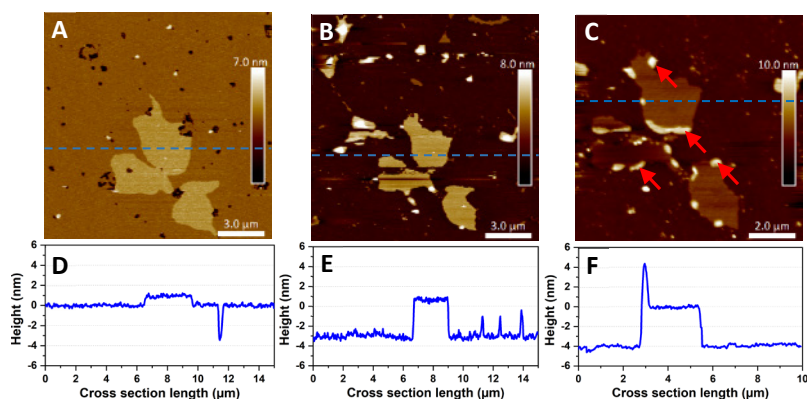
Interestingly, it appears that the peptide did not show any form of aggregation on the mica surface as it could have been expected with such positively charged peptides. Yet, the injection of the peptide on bare mica has shown that the peptide accumulates on the solid surface (see supplementary material **figure 4S.1**). This suggests that K18 preferentially interacts with lipids when a SLB is on the solid surface. To evaluate the origin of such preferential interactions with lipids, experiments were repeated in a salt-free buffer. The deleterious solubilisation effects induced by K18 remained identical suggesting that these interactions might not be associated to electrostatic interactions.

In order to explore the influence of different membranes properties, we prepared a SLB in the gel phase to determine how K18 may interact with a highly ordered membrane. The prepared monophasic DPPC membrane was  $4.5 \pm 0.1$  nm thick, a value in good agreement with the longer extension of the acyl chains in the gel phase. It consisted of several gel-phase lamellar domains covering most of the mica surface. After 2 hours of incubation, K18 demonstrated a very limited ability to solubilise gel-phase SLB, as shown on **figure 4.4**. We could however notice an increase of the SLB thickness at the edges of the bilayer domains. When compared with the results presented above with POPC fluid bilayers, it is proposed that this thickening is due to the accumulation of the peptide at the bilayer edges (on or under the membranes). Except for a few patches that were ripped out of the surface of mica, the SLB was mostly insensitive to the detrimental solubilisation effects induced by the peptide over time, in contrast with the POPC SLB.



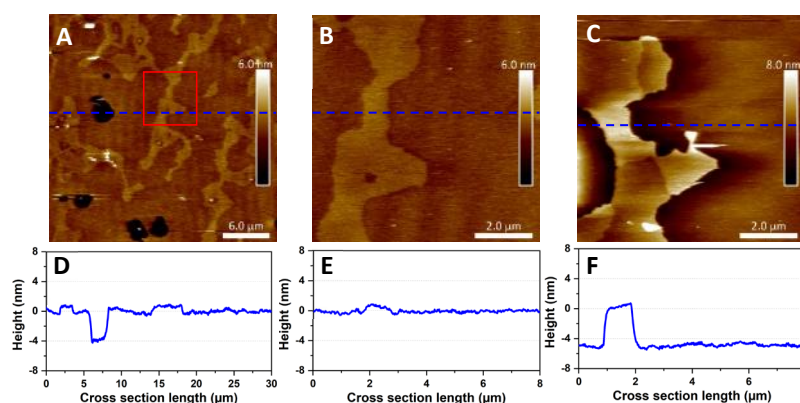
**Figure 4.4** - AFM images ( $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ ) of a DPPC supported lipid bilayer before (**A**) and after a 2-hour incubation with  $1 \mu\text{M}$  K18 (**B**). Graphs **C** and **D** represent the cross-sections corresponding to the blue dashed lines on **A** and **B** respectively.

We characterized the impact of the presence of gel/fluid lipid domains on the activity of K18, using biphasic SLB made of an equimolar mixture of DOPC and DPPC, a mixture that show lateral phase separation at room temperature [41], as observed on **figure 4.5, A**. The thinner  $\text{Ld}$  phase (DOPC-rich) exhibited a thickness of  $3.6 \pm 0.2 \text{ nm}$  while the thicker gel phase (DPPC-rich) domains were  $4.6 \pm 0.3 \text{ nm}$  thick, a thickness complying with the pure DPPC SLB that were previously studied. After a 2-hour incubation with K18 (**figure 4.5, B**), we observed a substantial solubilisation of the  $\text{Ld}$ -phase fraction of the SLB while the gel phase domains seemed to remain intact over this time window. After a 6-hour incubation, an increased thickness of the SLB edges by several nanometres was observed, similarly to the previous results obtained with the DPPC monophasic gel-phase bilayers. The thickening for the DOPC/DPPC system occurred hours after that of DPPC bilayers; this difference may be attributed to a lower concentration of free K18 in solution as some of the peptide could be associated with lipid fragments resulting from the substantial extraction of the  $\text{Ld}$  phase domains.



**Figure 4.5** - AFM images of a DOPC/DPPC bilayer (1:1). Images **A** and **B** ( $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ ) show the SLB before and after 2 hours with K18 ( $1 \mu\text{M}$ ). Image **C** displays the same area after 6 hours incubation at a higher magnification ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ). The red arrows point to thicker part of the DPPC-rich domains subsequent to the possible peptide insertion. Graphs **D**, **E** and **F** are the cross-sections corresponding to the blue dashed lines on **A**, **B**, and **C** respectively.

Cholesterol is a major component of the plasma membrane, representing up to 50 % of the lipids in neural membranes [43]. In addition, it is known to greatly modulate the properties of membranes, in particular the lipid packing and order, as well as the membrane permeability [44]; it leads to the formation of the liquid ordered ( $l_o$ ) phase. We have investigated the effects of the peptide on a ternary mixture including the sterol. DOPC/DPPC/cholesterol (1:1:1) mixture gives also rise to phase separation and the formation of  $l_d$  and  $l_o$  domains, a feature that can be biologically relevant. The SLB formed with this ternary mixture, displayed on **figure 4.6, A and B**, was  $4.0 \pm 0.2$  nm thick and displayed a height difference of  $0.9 \pm 0.1$  nm between the  $l_d$  and  $l_o$  domains, comparable features to previous reports [45]. After incubation with K18, the  $l_d$  phase was extracted from the surface, leaving the  $l_o$  phase virtually intact (**figure 4.6, C**). The nature and the kinetics of the effects were comparable to those observed with DOPC/DPPC binary system, suggesting that K18 detrimental effects on are not influenced by the presence of the sterol.

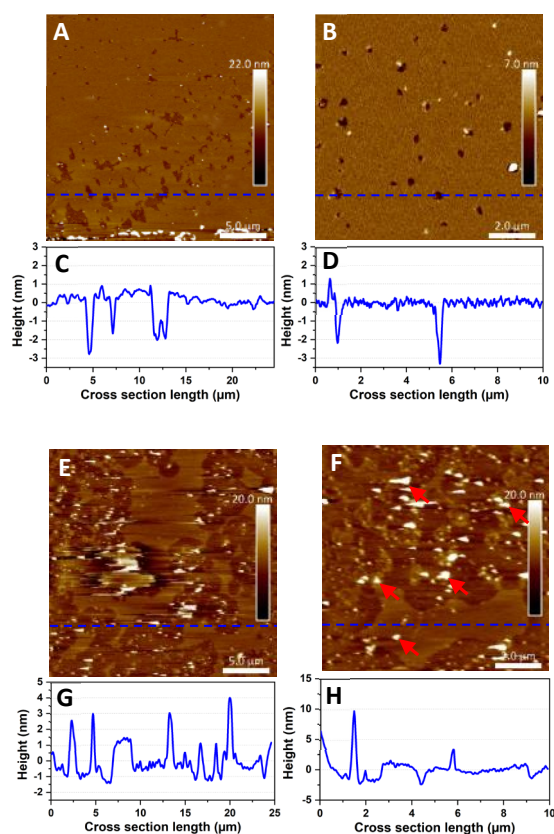


**Figure 4.6** - AFM images of a DOPC/DPPC/cholesterol bilayer (1:1:1). Image **A** ( $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ ) displays the SLB and image **B** represents the  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  area framed on **A**. Image **C** is the same area, recorded after a 2-hour incubation with K18 ( $1 \mu\text{M}$ ).

#### 4.4.2 Effects of K18 on SLB containing anionic lipids

Phosphatidylserines are important components of the inner leaflet of the plasma membrane, representing about 10 to 20 mol% of its lipid composition. These lipids are also proposed to be involved in the apoptosis [43]. We determined the impact of K18 on POPC/POPS (4:1) bilayers. The effective deposition of a supported negatively charged lipid bilayer generally requires the use of  $\text{Ca}^{2+}$  to screen the negative mica surface [46]. However, calcium ions are known to bridge negatively charged lipid polar heads, restricting membrane diffusion [47]. Moreover, it was demonstrated that the presence of such divalent cations could induce the formation of laterally separated domains in SLB, a phenomenon that was shown to be dependent on the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration [48, 49]. To limit the influence of  $\text{Ca}^{2+}$ , the POPC/POPS (4:1) SUVs were prepared in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free Hepes buffer and a small volume ( $20 \mu\text{L}$ ) of  $\text{Ca}^{2+}$  solution ( $5 \text{ mM}$ ) was added independently to recover the mica surface, in prior to add the SUV suspension. The disc was then washed several times with buffer. As observed on **figure 4.7**, a monophasic, and  $3.2 \pm 0.3 \text{ nm}$  thick, SLB was obtained. No evidence of domains was detected suggesting the mixture was homogeneous.

The addition of K18 led to an important solubilisation of the bilayer and concurrently to the formation of large aggregates of very heterogeneous thicknesses (see red arrows on **figure 4.7, F**). These aggregates are tentatively hypothesised to be aggregates formed by the peptide or a mixture of K18 and lipids.

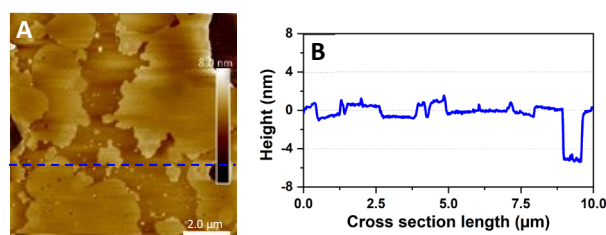


**Figure 4.7** - AFM images of a POPC/POPS bilayer (4:1). Images **A** ( $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ ) and **B** ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) show the SLB before incubation while images **E** and **F** represent the same locations after a 2-hour incubation with  $1 \mu\text{M}$  K18. The red arrows on **F** point at several aggregates that formed upon incubation. Graphs **C**, **D**, **G** and **H** are the cross-sections corresponding to the blue dashed lines on **A**, **B**, **E** and **F** respectively.

PIP<sub>2</sub> is another important anionic lipid, essentially located in the inner leaflet of the eukaryotic cell membrane, which play a fundamental role in regulatory functions [50] and interacts specifically with intracellular proteins [51]. Recently, the ability of PIP<sub>2</sub> to promote K18 peptide fibrillation has been shown *in vitro*; the lipid was found to be a cofactor and a coaggregating agent [37]. As for the previous composition, the formation of SLB with PIP<sub>2</sub>-containing vesicles required a slightly different protocol. The phospholipid bears 3 negative charges at physiological pH, which should lead to important electrostatic repulsions with the mica surface. It has been shown that acidic buffer conditions were efficient for the formation of SLB of comparable compositions on negatively charged surfaces such as silicon [52]. The SUVs suspension was then prepared in a citrate buffer adjusted to pH 3 in order to protonate the phosphate groups of the PIP<sub>2</sub> headgroup and favour the vesicle deposition. After the deposition, the disk was rinsed with pH 7.4 buffer to carry out the incubation with K18 in more physiological conditions. Interestingly, as seen on **figure 4.8**, the lipid mixture formed a continuous SLB that exhibited an important phase separation. The cross section measurements

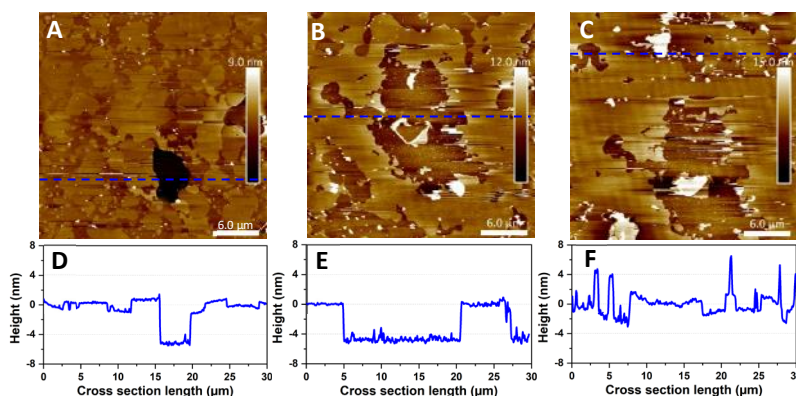


indicated that the mean SLB thickness was  $4.8 \pm 0.3$  nm and a level difference of  $1.3 \pm 0.2$  nm between the phases. Since PIP<sub>2</sub> has demonstrated the ability to form clusters *in vitro* [53, 54] and due to its more voluminous headgroup, we assumed the thicker domains to be enriched in phosphatidylinositol.



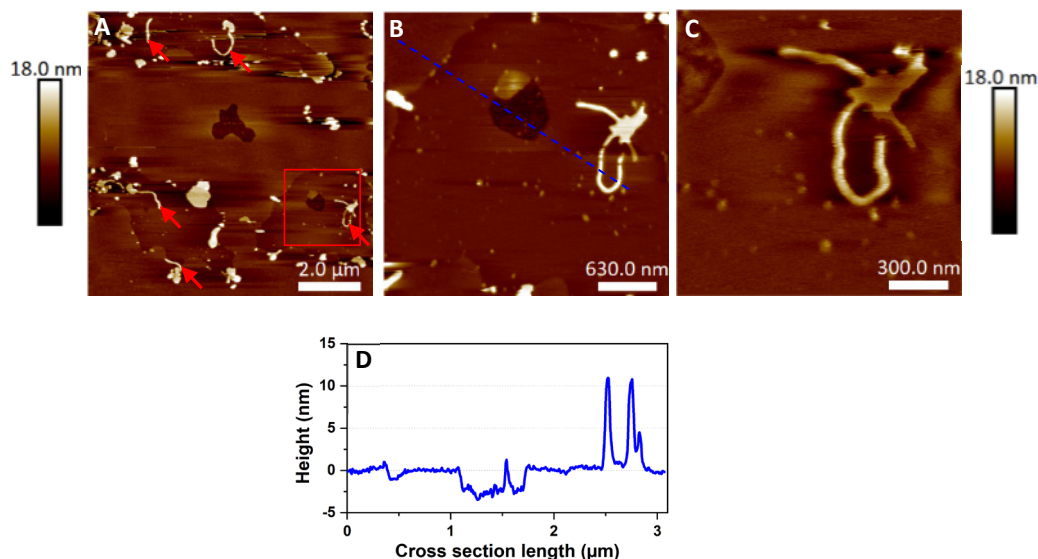
**Figure 4.8** - AFM image ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC/PIP<sub>2</sub> bilayer (4:1). **B** is the cross section associated to the blue dashed line on image **A**.

When added, K18 induced an important disruption of the SLB but also a significant reorganization of the domains as the morphology of the lipid domains dramatically changed after a 2-hour incubation with K18 (**figure 4.9**). Parts of the membrane were fragmented as it can be observed on the cross sections.



**Figure 4.9** - AFM images ( $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ ) of a POPC/PIP<sub>2</sub> (4:1). Images **A**, **B** and **C** represent the SLB before, after 2 hours and after 4 hours incubation with K18 ( $1 \mu\text{M}$ ). Graphs **D**, **E** and **F** are the cross-sections corresponding to the blue dashed lines on **A**, **B**, **C** respectively.

Interestingly, after a 6-hour incubation, the formation of fibrils was observed on the SLB (**figure 4.10**). The fibres seemed to have grown from aggregates on membranes as seen on **figure 4.10**, **B** and **C**. The thickness of the fibres was estimated to  $10.3 \pm 0.5$  nm ( $n = 6$ ).



**Figure 4.10** - AFM images of the POPC/PIP<sub>2</sub> after a 6 h incubation with K18 (1 μM). Image **A** (10 x 10 μm<sup>2</sup>) shows filiform structures, pointed out with red arrows. **B** is a zoomed image (3.1 x 3.1 μm<sup>2</sup>) corresponding to the red frame on **A**. Image **C** is a higher magnification (900 x 900 nm<sup>2</sup>) of the fibres. Graph **D** is the cross-section corresponding to the blue dashed line on **B**.

## 4.5 Discussion

In this work, we performed a study of Tau fragment K18 behaviour in presence of SLB with various compositions to get insights about how the nature of membrane lipids may drive the interactions with the peptide. Our results clearly show that K18 behaviour is dependent of the SLB lipid composition.

### 4.5.1 K18 solubilizes zwitterionic fluid phases in SLB

On monophasic and diphasic membranes made of zwitterionic lipids, the interaction of K18 with the SLB has been shown to be detrimental, leading to an important membrane solubilisation of the fluid phases. This effect was typically observed on all compositions containing lipid *ld* phase (formed by POPC or DOPC). The solubilisation of the fluid phase in phospholipid membranes appeared to be initiated at the edges of the membrane domains, as a progressive lateral solubilisation of the SLB from residual defects was observed. The presence of cholesterol, known to increase the packing density of bilayers by condensing the hydrocarbon chains within the fluid phase [44], did not prevent the disruption by the peptide. This disruption might result from the lateral insertion of K18 and could explain the increased thickness observed with the DPPC domains. Due to the higher packing density of lipids in both gel and *lo* phases, the peptide somehow could not induce enough disruption to solubilise the membranes. The Young's modulus mapping of the DPPC monophasic SLB (see supplementary

material **figure 4S.2**) showed that these “swollen edges” were softer than the rest of the membrane corroborating a disrupting effect.

Edges in SLB are often considered to constitute favourable anchoring sites for proteins of peptides. The insertion of alkaline phosphatase was for instance observed at the edges of gel-phase patches in DOPC-SM bilayers [55], leading to increased thickness. We have also reported similar behaviour in previous studies with A $\beta$ <sub>1-42</sub> amyloid peptide oligomers when interacting with POPC membranes [45], as well as more complex membranes composed of POPC, sphingomyelin, cholesterol and GM1 [56]. Interestingly, these phenomena involving SLB edges targeting are reminiscent of the actions of antimicrobial amphipathic peptides that display comparable propensities to solubilising membranes [57, 58]. In a comprehensive study, Henderson *et al.* observed the common property of such antimicrobial peptides to solubilise membranes from the edges of zwitterionic SLB, a phenomenon leading to the lowering of the line tension [59].

No evidence of peptide accumulation was highlighted on or near zwitterionic lipid membranes. This observation suggests that the potential formation of mixed K18/lipid complexes would be released in solution, a hypothesis previously proposed for other amyloid peptides [45, 56]. The analysis of the supernatant after incubation did not reveal any evidence of fibres. This observation correlates with the absence of ThT fluorescence that have been reported with zwitterionic vesicles incubated with K18 [37]. Compared to the different mechanisms of membrane disruption that have been proposed, the disrupting effects appears to be associated with a detergent-like model [60].

#### 4.5.2 Negatively charged lipids promote K18 aggregation onto the SLB

To explore the potential electrostatic affinity of K18 with lipids, we used two binary systems with different compositions, focusing on two negatively charged lipids from the inner leaflet of the neuronal membrane: POPS and PIP<sub>2</sub>. K18 contains 5 histidine and 19 lysine residues within its sequence [24]. At physiological pH, histidines are neutral but lysines bear a positive charge that are pivotal for the binding activity of Tau protein to the microtubules [30, 61]. The net charge of K18 was measured to be +9 at pH 7 [16].

In case of the POPS-containing SLB, the injection of K18 induced a solubilization of the membrane but also led to the formation of visible aggregates on the surface. In contrast to previously investigated systems, this was the first evidence of K18 aggregation and deposition on a SLB. Recently, it was proposed that such aggregation of K18 was occurring when a critical concentration of peptide was reached, based on results obtained from anionic vesicles

containing POPS [27] or from fatty acid micelles [35]. The ability of anionic agents to promote Tau protein aggregation is thought to stem from the neutralization of the positive charges contained within the microtubule associated domain. The negatively charged surface of the SLB containing the phosphatidylserine was shown to be a factor inducing K18 aggregation, which corroborates the importance of electrostatic interactions for promoting an increase concentration of K18 and favouring its aggregation. A recent AFM study also demonstrates the importance of electrostatic interactions as the association of Tau protein on SLB prepared from total brain extract was shown to be a sodium cation-dependent process [36]. The binding of K18 onto such mixed SLB was proposed to be assigned to POPS [34]. Interestingly this study also reported the disruption of POPS-containing vesicles leading to the formation of K18/lipid complexes. No fibrillation was reported in any of these, similarly to our observations.

In contrast with POPS, our observations reveal that PIP<sub>2</sub>-containing SLB not only initiated the aggregation of K18 but also promoted the formation of fibres, a process that was clearly membrane-supported. It was however difficult to identify if the fibrils have formed on a particular phase of the binary mixture system as the incubation with the peptide greatly affected the morphology of the domains. In any case, the fibres seemed to have grown from membrane-supported aggregates, which then appeared to act as nucleation sites. The peculiar ability of PIP<sub>2</sub> to form clusters with positively charged peptides have been reported in membranes [54]. This could support the hypothesis of PIP<sub>2</sub> seeding sites that might have promoted fibril growth.

A previously study using tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS) demonstrated that PIP<sub>2</sub> was incorporated into fibres [37]. The fibres formed in our system over less than 6 hours of incubation exhibited a thickness of ~ 10 nm. This value slightly differs from the diameters of amyloid fibrils obtained with PIP<sub>2</sub>-induced fibrillation in solution, which were in the 3-7 nm range. Heparin-induced Tau filaments have been reported to have 15- or 20-nm diameters, for straight or twisted filaments respectively [20].

In our study, the fibrillation was only observed for PIP<sub>2</sub>-containing SLBs, which highlights the importance of lipid composition in the fibrillation process. This finding also demonstrates the necessity to use more biologically relevant systems for biophysical studies of Tau fibrillation as the observed fibres morphologically differ from the heparin-induced filaments usually used in biophysical studies. This is in good agreement with recent studies, which have shown, by NMR, that the structure of heparin-induced filaments differ from filaments extracted from a diseased patient [21, 62] and, by TERS, that PIP<sub>2</sub>-induced fibres are rich in  $\beta$ -sheet contrarily to heparin-induced aggregation products [37].

## 4.6 Conclusions and perspectives

We have demonstrated, using AFM, that K18 detains a membrane detergent-like solubilizing ability and that the lipid composition was modulating the peptide behaviour. Detrimental phenomena have shown to be driven by the edges of the SLB and to disrupt specifically *l<sub>d</sub>* phases. Our results show that the aggregation or fibrillation is not a prerequisite for K18 to exert a deleterious action on model membranes such as SLB. This study also demonstrates the ability of membrane containing acidic lipids to promote the microtubule-binding domain aggregation and highlights the decisive role of PIP<sub>2</sub> to induce the formation of fibres.

Further work needs to be carried out to identify the nature of the lipid phase that have initiated the formation of fibres by the peptide as this phenomenon has shown not to occur homogeneously on the SLB membrane but rather to specifically happen on the lipid fluid phase. A combination of AFM and confocal microscopy using phase-sensitive fluorescent dyes could provide information relative to this aspect. It would be interesting to examine if the fibrillation is dependent on electrostatic interactions, by reproducing the experiments without salt for instance. Electrostatic forces did not seem to drive the membrane disruption induced by K18 but their influence on the aggregation of the peptide needs to be ascertained in order to elucidate the mechanism by which membranes containing acidic lipids promote the phenomenon.

Additional experiments should also be carried out on aggregates resulting from POPS-containing membranes in order to detail their morphology.

## 4.7 Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## 4.8 Acknowledgements

The authors are grateful to Alain Brisson for fruitful conversations regarding lipid bilayers formation. M.A. is thankful to the Faculté des études supérieures et post-doctorales (FESP) of Université de Montréal. M.A. also gratefully acknowledges the financial support of the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), through its excellence network program supporting the Québec Centre for Advanced Materials and Université de Bordeaux's Initiative d'Excellence (IdEx).

## 4.9 References

1. Drubin, D.G. and M.W. Kirschner, *Tau protein function in living cells*. The Journal of cell biology, 1986. **103**(6 Pt 2): p. 2739-2746.
2. Avila, J., et al., *Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions*. Physiological Reviews, 2004. **84**(2): p. 361-384.
3. Lee, V.M.Y. and J.Q. Trojanowski, *Neurodegenerative tauopathies: human disease and transgenic mouse models*. Neuron, 1999. **24**(3): p. 507-510.
4. Lee, V.M.Y., M. Goedert, and J.Q. Trojanowski, *Neurodegenerative tauopathies*. Annual Review of Neuroscience, 2001. **24**(1): p. 1121-1159.
5. Delacourte, A. and A. Defossez, *Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments*. Journal of the Neurological Sciences, 1986. **76**(2): p. 173-186.
6. Mandelkow, E.-M. and E. Mandelkow, *Biochemistry and cell biology of Tau protein in neurofibrillary degeneration*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2012. **2**(7): p. a006247-a006247.
7. Gustke, N., et al., *Domains of Tau protein and interactions with microtubules*. Biochemistry, 1994. **33**(32): p. 9511-9522.
8. Matsuo, E.S., et al., *Biopsy-derived adult human brain Tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament Tau*. Neuron, 1994. **13**(4): p. 989-1002.
9. Tiiman, A., et al., *In vitro fibrillization of Alzheimer's amyloid- $\beta$  peptide (1-42)*. AIP Advances, 2015. **5**(9): p. 092401.
10. Friedhoff, P., et al., *Structure of Tau protein and assembly into paired helical filaments*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2000. **1502**(1): p. 122-132.
11. Fichou, Y., et al., *Cofactors are essential constituents of stable and seeding-active Tau fibrils*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. **115**(52): p. 13234-13239.
12. Bancher, C., et al., *Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients*. Neuroscience Letters, 1993. **162**(1): p. 179-182.
13. Kepp, K.P., *Ten challenges of the amyloid hypothesis of Alzheimer's Disease*. J Alzheimers Dis, 2017. **55**(2): p. 447-457.
14. Giannakopoulos, P., et al., *Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease*. Neurology, 2003. **60**(9): p. 1495-1500.

15. Schweers, O., et al., *Structural studies of Tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(39): p. 24290-24297.
16. Jeganathan, S., et al., *The natively unfolded character of Tau and its aggregation to Alzheimer-like Paired Helical Filaments*. Biochemistry, 2008. **47**(40): p. 10526-10539.
17. Santarella, R.A., et al., *Surface-decoration of microtubules by human Tau*. Journal of Molecular Biology, 2004. **339**(3): p. 539-553.
18. Nelson, R., et al., *Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 773-778.
19. Kampers, T., et al., *RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein Tau into Alzheimer-like paired helical filaments*. FEBS Letters, 1996. **399**(3): p. 344-349.
20. Goedert, M., et al., *Assembly of microtubule-associated protein Tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans*. Nature, 1996. **383**(6600): p. 550-553.
21. Fichou, Y., et al., *Heparin-induced Tau filaments are structurally heterogeneous and differ from Alzheimer's disease filaments*. Chemical Communications, 2018. **54**(36): p. 4573-4576.
22. Wischik, C.M., et al., *Isolation of a fragment of Tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988. **85**(12): p. 4506-4510.
23. Novak, M., J. Kabat, and C.M. Wischik, *Molecular characterization of the minimal protease resistant Tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament*. The EMBO journal, 1993. **12**(1): p. 365-370.
24. Mukrasch, M.D., et al., *Sites of Tau important for aggregation populate  $\beta$ -structure and bind to microtubules and polyanions*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(26): p. 24978-24986.
25. Inoue, M., et al., *Phosphorylation regulates fibrillation of an aggregation core peptide in the second repeat of microtubule-binding domain of human Tau*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2014. **22**(22): p. 6471-6480.
26. Yu, X., et al., *Cross-seeding and conformational selection between three- and four-repeat human Tau proteins*. The Journal of biological chemistry, 2012. **287**(18): p. 14950-14959.
27. Elbaum-Garfinkle, S., T. Ramlall, and E. Rhoades, *The role of the lipid bilayer in Tau aggregation*. Biophysical journal, 2010. **98**(11): p. 2722-2730.
28. Ambadipudi, S., et al., *Liquid-liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein Tau*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 275.

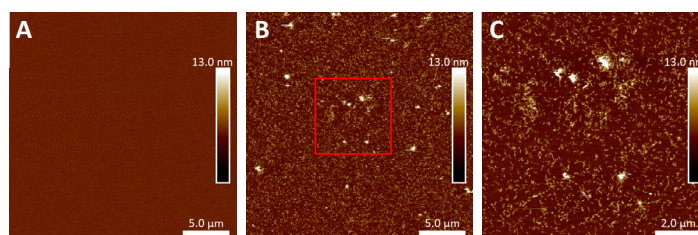
29. Lee, G., R.L. Neve, and K.S. Kosik, *The microtubule binding domain of Tau protein*. Neuron, 1989. **2**(6): p. 1615-1624.
30. Goode, B.L., et al., *Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat Tau isoforms: implications for normal Tau function and the onset of neurodegenerative disease*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(49): p. 38182-38189.
31. Maas, T., J. Eidenmüller, and R. Brandt, *Interaction of Tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in Paired Helical Filaments*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(21): p. 15733-15740.
32. Lira-De León K.I., D.A.-H.M.A., Campos-Peña V., Meraz-Ríos M.A, *Plasma membrane-associated PHF-core could be the trigger for Tau aggregation in Alzheimer's disease*. Current Hypotheses and Research Milestones in Alzheimer's Disease, ed. Springer. 2009, Boston, MA.
33. Brandt, R., J. Léger, and G. Lee, *Interaction of Tau with the neural plasma membrane mediated by Tau's amino-terminal projection domain*. The Journal of cell biology, 1995. **131**(5): p. 1327-1340.
34. Ait-Bouziad, N., et al., *Discovery and characterization of stable and toxic Tau/phospholipid oligomeric complexes*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 1678.
35. Chirita, C.N., M. Necula, and J. Kuret, *Anionic micelles and vesicles induce Tau fibrillization in vitro*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(28): p. 25644-25650.
36. Mari, S.A., et al., *Reversible cation-selective attachment and self-assembly of human Tau on supported brain lipid membranes*. Nano Letters, 2018. **18**(5): p. 3271-3281.
37. Talaga, D., et al., *PIP2 phospholipid-induced aggregation of Tau filaments probed by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy*. Angew Chem Int Ed Engl, 2018. **57**(48): p. 15738-15742.
38. Gellermann Gerald, P., et al., *Paired Helical Filaments contain small amounts of cholesterol, phosphatidylcholine and sphingolipids*, in *Biological Chemistry*. 2006. p. 1267.
39. Kuret, J., et al., *Evaluating triggers and enhancers of Tau fibrillization*. Microscopy Research and Technique, 2005. **67**(3-4): p. 141-155.
40. Dufrière, Y.F. and G.U. Lee, *Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2000. **1509**(1): p. 14-41.
41. Giocondi, M.-C., et al., *Surface topography of membrane domains*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2010. **1798**(4): p. 703-718.
42. Wischik, C.M., et al., *Subunit structure of paired helical filaments in Alzheimer's disease*. The Journal of cell biology, 1985. **100**(6): p. 1905-1912.
43. Ingólfsson, H.I., et al., *Computational lipidomics of the neuronal plasma membrane*. Biophysical Journal, 2017. **113**(10): p. 2271-2280.



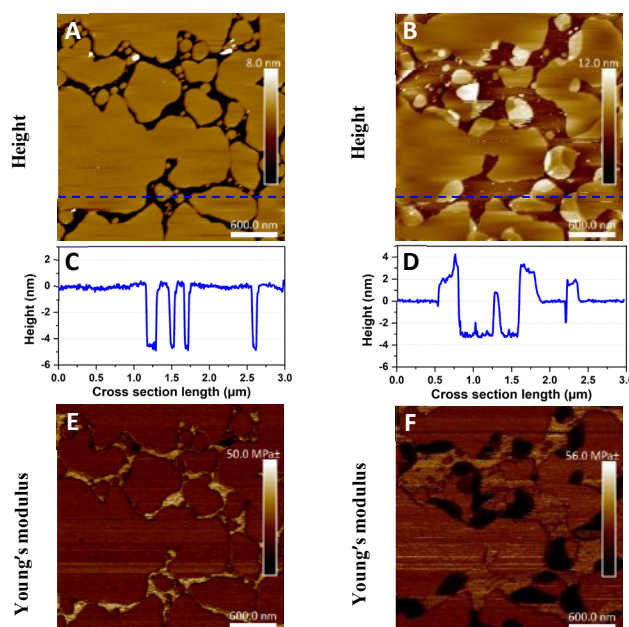
44. Yeagle, P.L., *Chapter 9 - cholesterol and related sterols: roles in membrane structure and function*, in *The Membranes of Cells (Third Edition)*, P.L. Yeagle, Editor. 2016, Academic Press: Boston. p. 189-218.
45. Azouz, M., et al., *Membrane domains modulate A $\beta$ 1-42 oligomer interactions with Supported Lipid Bilayers: an Atomic Force Microscopy investigation*. *Nanoscale*, 2019.
46. Richter, R.P., R. Bérat, and A.R. Brisson, *Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view*. *Langmuir*, 2006. **22**(8): p. 3497-3505.
47. Slochower, D.R., et al., *Counterion-mediated pattern formation in membranes containing anionic lipids*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2014. **208**: p. 177-188.
48. Menke, M., V. Gerke, and C. Steinem, *Phosphatidylserine membrane domain clustering induced by Annexin A2/S100A10 heterotetramer*. *Biochemistry*, 2005. **44**(46): p. 15296-15303.
49. Faiß, S., et al., *Formation of irreversibly bound annexin A1 protein domains on POPC/POPS solid supported membranes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2008. **1778**(7): p. 1601-1610.
50. Di Paolo, G. and P. De Camilli, *Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics*. *Nature*, 2006. **443**(7112): p. 651-657.
51. Bertin, A., et al., *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization*. *Journal of molecular biology*, 2010. **404**(4): p. 711-731.
52. Braunger, J.A., et al., *Solid supported membranes doped with PIP2: influence of ionic strength and pH on bilayer formation and membrane organization*. *Langmuir*, 2013. **29**(46): p. 14204-14213.
53. Wen, Y., V.M. Vogt, and G.W. Feigenson, *Multivalent cation-bridged PI(4,5)P2 clusters form at very low concentrations*. *Biophysical Journal*, 2018. **114**(11): p. 2630-2639.
54. Brown, D.A., *PIP2 clustering: from model membranes to cells*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2015. **192**: p. 33-40.
55. Milhiet, P.-E., et al., *Spontaneous insertion and partitioning of alkaline phosphatase into model lipid rafts*. *EMBO reports*, 2002. **3**(5): p. 485-490.
56. Ewald, M., et al., *High speed atomic force microscopy to investigate the interactions between toxic A $\beta$ 1-42 peptides and model membranes in real time: impact of the membrane composition*. *Nanoscale*, 2019. **11**(15): p. 7229-7238.
57. Lam, K.L.H., et al., *Mechanism of supported membrane disruption by antimicrobial peptide Protegrin-1*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006. **110**(42): p. 21282-21286.

58. Rigby-Singleton, S.M., et al., *Visualizing the solubilization of supported lipid bilayers by an amphiphilic peptide*. Langmuir, 2006. **22**(14): p. 6273-6279.
59. Henderson, J.M., et al., *Antimicrobial peptides share a common interaction driven by membrane line tension reduction*. Biophysical Journal, 2016. **111**(10): p. 2176-2189.
60. Berthelot, K., C. Cullin, and S. Lecomte, *What does make an amyloid toxic: morphology, structure or interaction with membrane?* Biochimie, 2013. **95**(1): p. 12-9.
61. Goode, B.L. and S.C. Feinstein, *Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of Tau*. The Journal of cell biology, 1994. **124**(5): p. 769-782.
62. Fitzpatrick, A.W.P., et al., *Cryo-EM structures of Tau filaments from Alzheimer's disease*. Nature, 2017. **547**(7662): p. 185-190.

## 4.10 Supplementary material



**Figure 4S.1** - AFM images of the aggregation of K18 on mica. **A** ( $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ ) displays the mica imaged in buffer while **B** ( $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ ) is the same area after 2 hours of incubation with  $1 \mu\text{M}$  of K18. Image **C** ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) is the area framed on image **B**.



**Figure 4S.2** - AFM images ( $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ ) of a DPPC supported lipid bilayer before (**A**) and after 2 hours incubation with  $1 \mu\text{M}$  K18 (**B**). Graphs **C** and **D** represent the cross-sections corresponding to the blue dashed lines on **A** and **B** respectively. **E** and **F** represent the reduced Young modulus maps over similar surface areas ( $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ ) and associated to **A** and **B** respectively. On **E**, mica appears brighter which indicates it is stiffer than the SLB while the edges appear darker on **F** meaning they are softer. Young's modulus were determined using the Hertz model on the Nanoscope software.

# Chapitre 5 : Microfluidic diffusional sizing probes lipid nanodiscs formation and nanodiscs/peptide interactions

Mehdi Azouz, Mathilde Gonin, Sebastian Fiedler, Jonathan Faherty, Marion Decossas, Sandrine Villette, Christophe Cullin, Isabel Alves, Michel Lafleur, Sophie Lecomte, Alexandre Ciaccafava

**Article soumis dans BBA Biomembranes**

## 5.1 Abstract

The biophysical characterisation of membrane proteins and their interactions with lipids in native membrane habitat remains a major challenge. Indeed, traditional solubilisation procedures with detergents often causes the loss of native lipids surrounding membrane proteins, which ultimately impacts structural and functional properties. Recently, copolymer-based nanodiscs have emerged as a highly promising tool, thanks to their unique ability of solubilising native membranes, in the shape of discoidal patches of lipid bilayers. While this methodology finally set us free from the use of detergent, some limitations are however associated with the use of such copolymers. Among them, one can cite the tedious control of the nanodiscs size, their instability in basic pH and in the presence of divalent cations. In this respect, many variants of the widely used Styrene Maleic Acid (SMA) copolymer have been developed to specifically address those limitations. With the multiplication of new SMA copolymer variants and the growing interest in copolymer-based nanodiscs for the characterisation of membrane proteins, there is a need to better understand and control their formation. Among the techniques used to characterise the solubilisation of lipid bilayers by amphipathic molecules, cryo-TEM, <sup>31</sup>P-NMR, DLS, ITC and fluorescence spectroscopy are the most widely used, with a consensus made in the sense that a combination of these techniques is required. In this work, we propose to evaluate the capacity of Microfluidic Diffusional Sizing (MDS) as a new method to follow copolymer nanodiscs formation. Originally designed to determine protein size through laminar flow diffusion, we present a novel application along with a protocol development to observe nanodiscs formation by MDS. We show that MDS, allows to precisely measure the size of nanodiscs, and to determine the copolymer/lipid ratio at the onset of solubilisation. Finally, we have used MDS to characterize peptide/nanodisc interactions. The technique shows a promising ability to highlight the pivotal role of lipids in promoting interactions through a case study with an aggregating peptide. This confirmed the relevance of using the MDS and nanodiscs as biomimetic models for such investigations.

## 5.2 Introduction

The plasma membrane is a complex supramolecular assembly composed of various lipids, sugars and membrane proteins (MPs) working together to modulate essential biological processes such as generation of electrochemical gradient, signalling pathways, ligand-receptor interactions and energy conversion processes [1]. Despite the importance of this key interface crucial for life, many aspects remain obscure and rather poorly investigated. Among them, the characterisation of MPs in natural membranes remains a major challenge. Indeed, the proper functionality of a MP is intimately linked to its native environment: the lipid membrane [2]. One of the main bottlenecks lies in the ability to extract MPs from their native environment while preserving their biological properties. A paradox that has considerably held back researches, as reflected by the small amount of structural data available for MPs (<1% in the Protein Data Bank) [3]. Traditionally detergents are used to solubilise biological membranes and ultimately extract MPs prior to biophysical characterisation [4, 5]. However, in many cases, solubilisation with detergents leads to inactivation of the MPs. Among the reasons given for such a loss, the delipidation of the MPs is often pointed out.

In order to provide closer physiological conditions, reconstitution methods of MPs into biomimetic lipid bilayers of controlled compositions have been developed. Detergent solubilised MPs can be reconstituted into spherical lipid bilayer system (liposomes) or planar ring-shaped lipid bilayer surrounded by a rim of short detergent molecules (bicelles) [6]. Bicelles are particularly suited for NMR studies due to their ability to align in magnetic field [7]. Closely related to bicelles, membrane scaffold protein (MSP) lipid nanodiscs are constituted of a disc-shaped lipid bilayer sizing around 10 nm diameter surrounded by a belt of MSP [8]. Unfortunately, the MSP allowing the formation of nanodiscs often interferes with spectroscopic investigations due to spectral overlap with the targeted MP.

While the aforementioned methods represent a considerable improvement, they however require the MP to be first solubilised with detergent before reconstitution into those mimicking systems. This transient state might induce irreversible structural changes and loss of lipids which could act as cofactors [9]. Recently a new class of nanodiscs has emerged, characterized by the substitution of MSP by amphiphilic copolymers forming a belt around lipid bilayers [10]. Styrene Maleic – Acid (SMA) was the first copolymer to be used, with styrene as a hydrophobic moiety and maleic acid as the hydrophilic part [11]. This novel class of nanodiscs referred as SMALPs (SMA lipid particles) offers the unique feature of extracting MPs directly from the native membrane with their intimate surrounding lipids. Typically, 100 – 200 lipids

are co-extracted [12, 13]. With such approaches, MPs are solubilised into monodisperse objects in a single step without any detergent. Moreover, thanks to their unique ability, the use of SMALPs for MPs extraction and their analysis by lipidomics have revealed very distinct environments around different MPs [14, 15]. SMA copolymer has been shown to efficiently solubilise various lipid compositions including prokaryotic and eukaryotic membranes [16-18]. While SMALPs open the road to a wide range of biophysical characterisation techniques, they also suffer from inherent limitations. The first one is the size of the MP that can be extracted, which is directly linked to the maximal size of the nanodisc. Typically, SMALPs have a 10 nm diameter but reported values range from 5 to 30 nm depending on the preparation and the MP extracted [19]. So far, the largest MP trapped inside a SMALPs is the alternative complex III associated with a cytochrome *c* oxidase constituting a supercomplex of 464 kDa and 48 transmembrane helix [20]. In this supramolecular assembly, only 11 lipid molecules were observed, reflecting somehow a very tight packing. The second limitation is the pH range of use since SMA tends to aggregate at pH below 6.5 [21]. SMA copolymer also chelates divalent cations impeding its use under these conditions. Finally, the styrene group of SMA absorbs light at 260 nm, which can be advantageously used to quantify its concentration, but unfortunately also overlaps with protein absorption signals.

In this respect, several variants of SMA have been designed to overcome those limitations but also to broaden their potential applications [21]. Among them, tolerance to divalent cations has been largely improved (up to 20 mM) thanks to the substitution of the styrene ring by a diisobutylene moiety (DIBMA) [22]. Thanks to the absence of the styrene ring, DIBMA copolymer and a methacrylate copolymer were shown to be compatible with UV-vis spectroscopy for protein characterisation [23]. The pH range of use has been extended down to 2.5 and up to 10 thanks to the addition of an ammonium derivative on the maleic acid part. Moreover, this modification allowed a size tunability of the nanodisc diameter from 10 to 30 nm depending on the copolymer/lipid ratio [24]. Furthermore, SMA copolymers were modified to incorporate a thiol function for click chemistry, paving the way for many applications including surface immobilisation and labelling [25].

Another bottleneck that needs further investigation regards the SMALPs formation process. Indeed, only a handful of studies have addressed the problematic of SMALPs formation. Among them, a systematic biophysical study has investigated SMA copolymer solubilisation of lipid bilayers of various composition, leading to the proposal of a model for SMA-driven membrane solubilisation mode of action [18]. This experimental work was further supported by coarse-grained molecular dynamics [26, 27]. Together, those data are giving a

clearer picture of SMALPs formation mechanism. The general mechanism of membrane solubilisation by copolymer can be compared to that followed by detergent. Thus, the formation of nanodiscs follows the so called three-stage model and can be depicted with the use of two dimensional composition-phase diagrams as detergent/lipid mixtures [28-30]. In the stage I, the copolymer is added stepwise to the bilayers (generally in the form of large unilamellar vesicles (LUVs)) and starts interacting with the surface mostly through hydrophobic and to a lesser extent electrostatic forces. After this initial surface binding, SMA copolymer inserts into the hydrophobic membrane core in a process modulated by the alkyl chain packing. Continuous polymer addition leads to a saturation limit, as the bilayer can no longer incorporate the copolymer and nanodiscs start being expelled from the membrane. The copolymer to lipid molar ratio in a saturated membrane just prior this transition occurs is generally called saturation ( $R_{\text{sat}}$ ) and marks the beginning of stage II. When reported on a diagram, this value represents the phase boundary, at a precise ratio, between the mixed lamellar vesicle domain and a range of coexistent species, where nanodiscs are in equilibrium with copolymer-containing vesicles. As more copolymer is added to the vesicles, complete solubilisation occurs at a higher ratio called solubilisation ( $R_{\text{sol}}$ ) corresponding to the beginning of stage III, marking the phase boundary between the coexistence range and the domain of pure nanodiscs.

Many techniques are available to follow the copolymer-induced solubilisation of lamellar vesicles. For convenience reasons as they can be used on a routine basis, the most widely used approaches involve light like turbidity measurements and static or dynamic light scattering (SLS/DLS). However, while they allow for qualitative sample characterisation, both techniques fail to accurately determine the phase transition point, especially for the onset of solubilisation ( $R_{\text{sat}}$ ). As membrane solubilisation is often accompanied by the formation of different intermediates, turbidity is not suitable for the differentiation of such species. In the case of DLS, measurements are impaired with the  $r^6$  dependence of the scattered light, resulting in an underestimation of nanodiscs contribution at the stage when saturation is reached and slightly exceeded. Solid state  $^{31}\text{P}$  NMR is often used for detecting solubilisation [31] as the phospholipid head group signal is strongly dependent on environment with micelles displaying sharp peaks which enlarge in vesicular environments, giving rise to broader signals [32]. This technique is particularly reliable for the detection of the  $R_{\text{sat}}$ .

Fluorescence spectroscopy is also used to detect solubilisation with the release of encapsulated water-soluble fluorescent dyes that self-quench when entrapped in liposomes. Other fluorescence studies with the use of FRET [33, 34] can also be carried out to detect solubilisation but the initial attachment of donor/acceptor probes onto the lipids is required

making the approach quite laborious. Other spectroscopic techniques such as X-Ray diffraction can be used and provide information at the molecular state, but this technique requires an acute expertise to avoid misleading data treatment.

Cryo-TEM probably constitutes one of the most reliable technique to observe size transitions and can also provide structural information of the samples [35]. It can particularly be useful for the visualisation of potential intermediate structures along the solubilisation process [36]. Atomic Force Microscopy has also shown to be an efficient *in situ* visualisation technique to detect membrane solubilisation by detergents [37, 38]. However, both techniques require a strong expertise to avoid artefacts and obtention of quantitative results cannot be obtained straightforwardly.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC) has also proven to be a reliable technique for accurate detection of phase transitions occurring during lipid solubilisation [39-41]. It is based on the measurement of the release or uptake of heat resulting from membrane fragmentation induced by a solubilising agent. It has extensively been used with detergents as it allows to determine the detergent to lipid ratios at which transitions occur and consequently the construction of phase diagrams. Yet, the characteristic signal provided by ITC may display complex phenomena and the use of complementary methods such as DLS might is often required.

In this work, we propose to evaluate the potential of the Microfluidic Diffusional Sizing (MDS) technology as an alternative method to follow SMALPs formation. Originally, MDS was designed to determine the size and concentration of protein samples for quality control purposes [42]. Soon after, other applications have emerged and the method has been applied to evaluate protein/ligand and protein/lipid interactions [43-45]. We have chosen to investigate the thoroughly characterised phosphatidylcholine (PC), a major lipid component of mammalian membranes. In particular, we have focused on 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) and 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine DMPC for straightforward comparison with literature. We present a specific protocol for MDS detection of lipid self-assemblies instead of proteins and we discuss the information extracted by MDS on SMALPs formation. Our approach is supported by DLS and transmission electron microscopy (TEM) measurements. Moreover, we have used MDS along with SMALPs as lipid model system to investigate the role of a specific lipid in promoting membrane/peptide interactions in a case study. We have used K18 peptide as an example, corresponding to the aggregative domain of Tau protein, and demonstrated that MDS can highlight the role of PIP<sub>2</sub> in triggering such interaction.



## 5.3 Materials and methods

### 5.3.1 Materials

1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPE), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol-4',5'-biphosphate) (PIP<sub>2</sub>, purified from porcine brain) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and were received as organic solutions (chloroform and chloroform/methanol/water for PIP<sub>2</sub> (20:9:1) vol/vol). 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Hepes) and sodium chloride were obtained from Sigma (Steinheim, Germany). All the solutions were prepared with ultra-pure water (18 MΩ cm).

### 5.3.2 Preparation of SMA (3:1)

SMA (3:1) (XIRAN® SL25010 P20) was a kind gift from Polyscope. SMA (3:1) in Hepes 50 mM pH 7.0 was prepared through dialysis as described before [46]. The final concentration was determined by UV-vis spectroscopy (Jasco V630 spectrophotometer) by measurement of the absorbance at 260 nm and using a molar extinction coefficient  $\epsilon_{260} = 6989$  L. mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> obtained elsewhere [22].

### 5.3.3 Preparation of the lipid suspensions

Lipid solutions were mixed to obtain the desired molar ratio (POPC/PIP<sub>2</sub>, 80:20 % mol), or weight ratio (POPC/POPE (9:1), DMPC/DMPE (9:1) w:w). Organic solvents were then evaporated under a gentle stream of nitrogen to form lipid films. In case of mixtures, evaporation was carried out at 50 °C to ensure lipids miscibility. To remove residual solvent traces, the lipid films were further dried in vacuum at room temperature for at least 16 h. The films were then dissolved into a buffer (Hepes 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7.4, or 50 mM pH 7.0) to a concentration of 1 mg/mL and were thoroughly agitated at 50 °C for 30 minutes. The resulting multilamellar vesicle suspensions (MLVs) were then submitted to three freeze and thaw cycles (from liquid nitrogen to 50 °C). In the case of POPC/POPE (9:1) and DMPC/DMPE (9:1) mixtures, MLVs were extruded (21 times) through a polycarbonate filter (100 nm) using a mini-extruder device (Avanti Polar Lipids) to obtain large unilamellar vesicles (LUVs). Finally, lipid concentrations were determined by phosphate quantification [47].

### 5.3.4 Production and purification of K18 peptide

pNG2 K18 (kindly provided by Pr. E. Mandelkow) was used to transform *Escherichia coli* C41(DE3) (F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)). Several transformants were grown on 120 mL LB + 1% dextrose, 100 mg/L ampicillin. When the culture reached an optical density  $OD_{650} = 0.52$ , 10 mL was added to 990 mL of ZYM 5052 medium (1% N-Z-amine, 0.5% yeast extract, 25 mM  $Na_2HPO_4$ , 25 mM  $KH_2PO_4$ , 50 mM  $NH_4Cl$ , 5 mM  $Na_2SO_4$ , 2 mM  $MgSO_4$ , 0.5% glycerol, 0.05% dextrose, 0.2% lactose) containing 100 mg/L ampicillin and incubated overnight at 37 °C.

After centrifugation, cell pellets were suspended in 50 mL of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) pH 6.8 (20 mM), NaCl (500 mM), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 1 mM) phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 1mM), benzamidine (2 mM) and dithiothreitol (DTT, 5 mM), sonicated four times (1 min cycles on ice; output 5, 50 % duty cycle) and then heated at 80 °C for 20 min. After centrifugation (30 min at 15 000 g), the supernatant was then dialyzed for at least 16 h at 4 °C against cation exchange buffer A (20 mM MES pH 6.8, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, DTT (1 mM) with a Spectra/Por Dialysis Membrane (MWCO 3.5 kDa). The dialysate was then cleared (30 min, 15 000g), filtered through a 0.22  $\mu$ m membrane and apply onto an HiTrap SP (GE Healthcare) equilibrated with the cation exchange buffer A. After washing with 25 mL of the same buffer, the protein was eluted with 25 mL of Buffer B (MES 20 mM pH 6.8, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM) and the 5 mL fractions containing most of K18 were pooled and concentrated by ultrafiltration devices (e.g., Ultrafree, Millipore 5 kDa MWCO) to a final volume of 0.5 to 1 mL. Finally, the peptide concentrate was applied onto a gel filtration column (Superdex-75) equilibrated in 100 mM Ammonium acetate containing 2-mercaptoethanol (0.1 %). The fractions containing the pure peptide were pooled, aliquoted and lyophilized.

### 5.3.5 Negative staining for transmission electron microscopy

For EM grid preparations, the sample suspension diluted at 50  $\mu$ g/mL for LUVs or 2  $\mu$ g/mL for nanodiscs in Hepes buffer (50 mM, pH 7.0) was applied to a glow-discharged carbon-coated copper 300 mesh grids and stained with 2 % uranyl acetate (w/v) solution. Images were recorded under low-dose conditions on transmission electron microscope (Tecnai F20 or CM120, ThermoFischer) using a ThermoFisher Eagle 4k\_4k or a GATAN UltraScan 1000 2k\_k camera. Images were analysed with ImageJ.

### 5.3.6 Microfluidic diffusional sizing

LUVs of POPC/POPE (9:1) and DMPC/DMPE (9:1) were diluted to a final concentration of 0.65 mM. Aliquots of SMA (3:1) stock solution (11 mM) were added to LUVs to produce the appropriate molar ratio ( $n_{\text{SMA}3:1}/n_{\text{Lipids}}$ ) typically ranging from 0.001 to 100 and left to react for at least 16 h at 25 °C for POPC/POPE (9:1) and 30 °C for DMPC/DMPE (9:1). 7  $\mu\text{L}$  of SMA (3:1) / LUVs mixture was gently drop casted onto diffusion chips. Sample loaded chips were then introduced inside the Microfluidic Diffusional Sizing (MDS) device (Fluidity One, Fluidic Analytics) for measurements. The device was set on the highest range of size detection corresponding to a measurement time of 15 min.

### 5.3.7 Peptide/nanodisc interactions

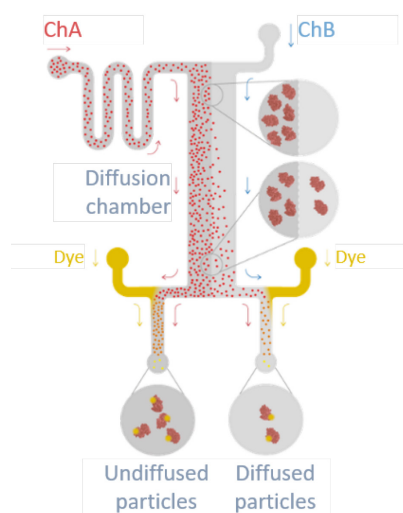
The concentration of K18 was kept constant at 1  $\mu\text{M}$ . Aliquots of nanodiscs were added to obtain a concentration ranging from 1 to 50  $\mu\text{M}$  into a total volume of 200  $\mu\text{L}$  in 500  $\mu\text{L}$  Eppendorf tubes. The tubes were thoroughly vortexed for 30 seconds at room temperature and an aliquot of 7  $\mu\text{L}$  of the mixture was then applied onto the microfluidic chip input for size measurements by MDS.

## 5.4 Results & discussion

### 5.4.1 Protocol setup for lipid detection by MDS

In this work, we propose to use MDS to follow SMALPs formation by solubilisation of lipid bilayers and to evaluate to which extent we can obtain information on such process. It is worth noticing that, MDS was designed to detect and measure protein hydrodynamic radii, in consequence, the experimental protocol must be adapted. Indeed, with MDS, protein size and concentration are determined through diffusion of the sample under a steady state laminar flow in a diffusion chip. Briefly, the sample protein flows in channel A (ChA) running alongside a channel B (ChB) filled with water. Since no convection occurs at the interface between both channels, the protein can only migrate from channel A to channel B through diffusion, which depends on the protein size. At the end of the run, both channels are split and the protein that is left in channel A and the protein that has migrated in channel B are quantified thanks to a latent labelling specific of primary amine functions (**figure 5.1**). The length of the diffusion channel on the chips used for protein sample diffusion has been tuned to detect species with a hydrodynamic radius ( $R_H$ ) ranging from 0.3 to 30 nm. Thus, species with a  $R_H > 30$  nm are not expected to be detected. In order to follow SMALPs formation by MDS in a rigorous manner,

we have determined four requirements that the studied system must fulfil. (1) In order to avoid underestimation of the copolymer concentration for the onset of solubilisation and overestimation for the complete solubilisation we have chosen to solubilise LUVs of homogenous diameter over MLVs [28]. Indeed, due to their onion-like concentric lipid bilayers, not all MLVs lipids are simultaneously available for solubilisation by the copolymer causing misestimations (2) To be detectable, the sample must switch from a non-diffusive to a diffusive behaviour in the microfluidic channel upon SMA(3:1) copolymer addition (note that we will refer later to diffusive and non-diffusive behaviour regarding diffusion along the microfluidic channel). In this respect, LUVs, which mean hydrodynamic radius is much larger than 30 nm, are not expected to diffuse whereas the smaller nanodiscs species with expected  $R_H$  comprise between 5 and 15 nm will be detectable. (3) Again, to be detectable, the measured sample must carry a free primary amine function. Usually lysine residues or N-terminal amine functions are used in protein samples (note that this excludes the widely used tris-aminomethane as buffer). In our case we have doped POPC and DMPC lipids with their amino-terminated counterparts POPE and DMPE (at a mass ratio POPC/POPE and DMPC/DMPE of (9:1) w:w) in order to apply the same instrument capability to detect lipids that was used for proteins. Note that this protocol also works with 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (POPS), (see supplementary material, **figure 5.S1**). Since we no longer deal with pure lipid composition but with mixtures, we have to make sure that the copolymer will solubilise either lipids without preference. Indeed, SMA (3:1) has been shown to solubilise lipids in a non-selective manner allowing the use of lipid mixtures and ensuring a non-biased detection [21, 46].

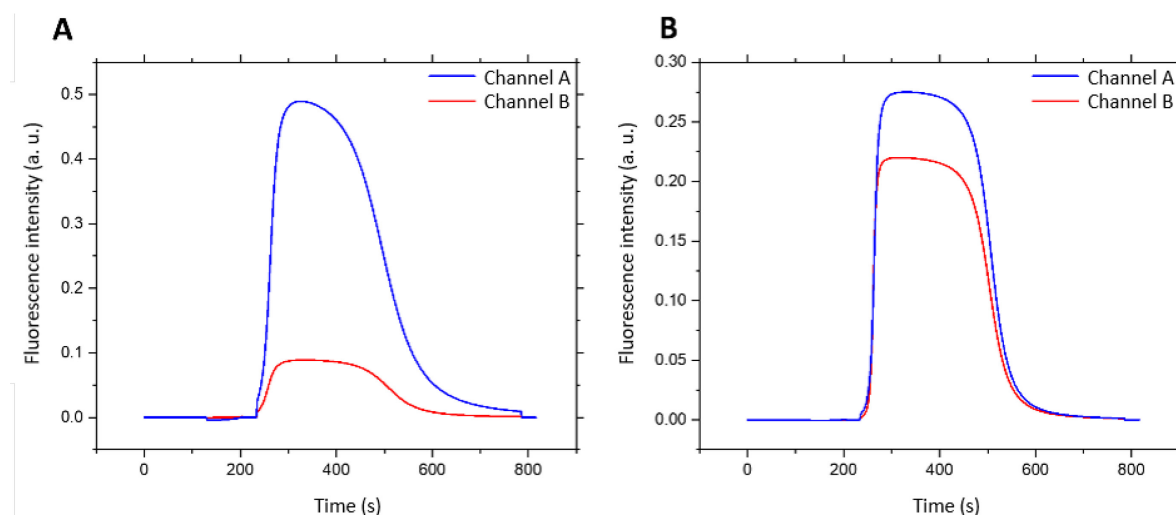


**Figure 5.1** - Scheme representing the flow of sample through a microfluidic chip during a MDS analysis on a Fluidity One instrument.

## 5.4.2 Validation of lipid detection by MDS

With those requirements in mind, we have performed several control experiments to validate this novel application of the MDS technology. POPC/POPE (9:1) and DMPC/DMPE (9:1) MLVs mixtures were prepared at a concentration of 1 mg/mL in Hepes buffer 50 mM, pH 7.0. From those lipid suspensions we have prepared LUVs through extrusion with 100 nm diameter filter to generate homogeneous species expected to have a non-diffusive behaviour. The mean diameter of these extruded LUVs of POPC/POPE (9:1) and DMPC/DMPE (9:1) was measured by DLS, giving values of 140 and 150 nm respectively.

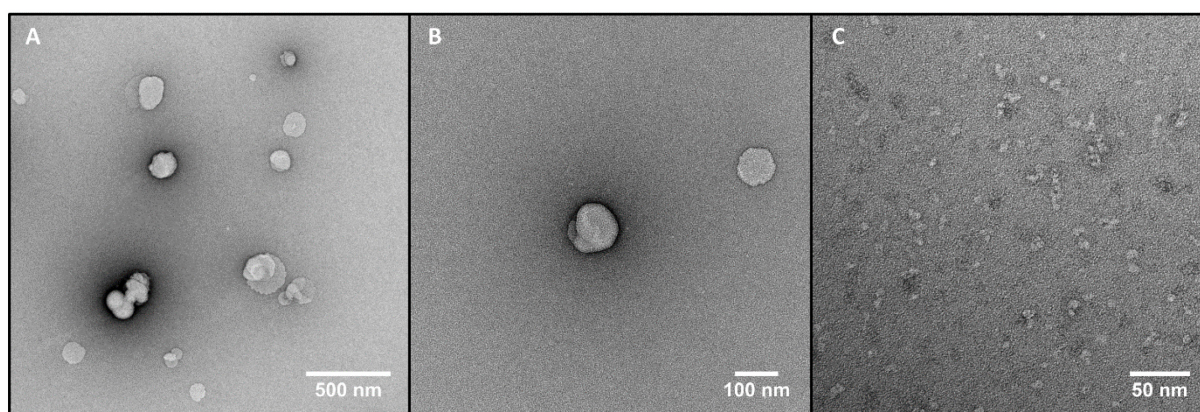
An aliquot of LUVs suspension (7  $\mu$ L) was gently drop casted onto diffusion chips before injection inside the MDS device to measure their diffusion behaviour. As expected, due to their large  $R_H$  of about 70 – 75 nm twice the MDS detection limit ( $R_H > 30$  nm), only a very weak diffusion signal was observed in ChB (**figure 5.2 A**). Accordingly, the MDS machine indicated that the sample was too large (note that the same experiment with MLVs, which diameter is around 700 nm, showed no diffusion signal at all (see supplementary material). When a large excess of SMA (3:1) is added to the LUVs ( $n_{SMA3:1}/n_{Lipids} > 5$ ) and left to react for at least 16 h, a marked diffusion signal is observed in ChB, proving that diffusion occurred for lipid particles with  $R_H$  lower than 30 nm (**figure 5.2 B**).



**Figure 5.2** - Graph **A** represents a MDS measurement of POPC/POPE (9:1) LUVs. Graph **B** displays the MDS measurement of POPC/POPE (9:1) LUVs after solubilisation with excess SMA (3:1) ( $n_{SMA3:1}/n_{Lipids} > 5$ ). In blue, Channel A corresponds to the channel where the sample has been introduced while in red, channel B is the one where the sample has diffused.

In order to support the results obtained with MDS it is highly desirable to correlate them with a visual record of the lipid samples. In this respect, the samples were observed by transmission electron microscopy. The LUVs exhibited dimensions with an average diameter of  $150 \pm 40$  nm and  $150 \pm 12$  nm for POPC/POPE (9:1) and DMPC/DMPE (9:1), respectively,

in agreement with DLS measurements (**figure 5.3, A and B**). After exposition to excess of SMA (3:1) overnight at 25 °C for POPC/POPE (9:1) and 30 °C for DMPC/DMPE (9:1), LUVs were solubilised into nanodisc shaped particles with a diameter of  $10.5 \pm 0.7$  nm and  $11.7 \pm 0.9$  nm for each composition respectively (**figure 5.3, C**). These values are in good agreement with their typical diameter of  $\sim 10$  nm reported in the literature [25, 46, 48]. Importantly, the observed mean diameters of the objects correlate perfectly either with their diffusive behaviour (nanodiscs) or non-diffusive behaviour (LUVs) observed by MDS. This set of control experiments following our established protocol proved that MDS can (1) detect lipids in addition to protein and (2) can distinguish between LUVs and nanodiscs due to their different size range.

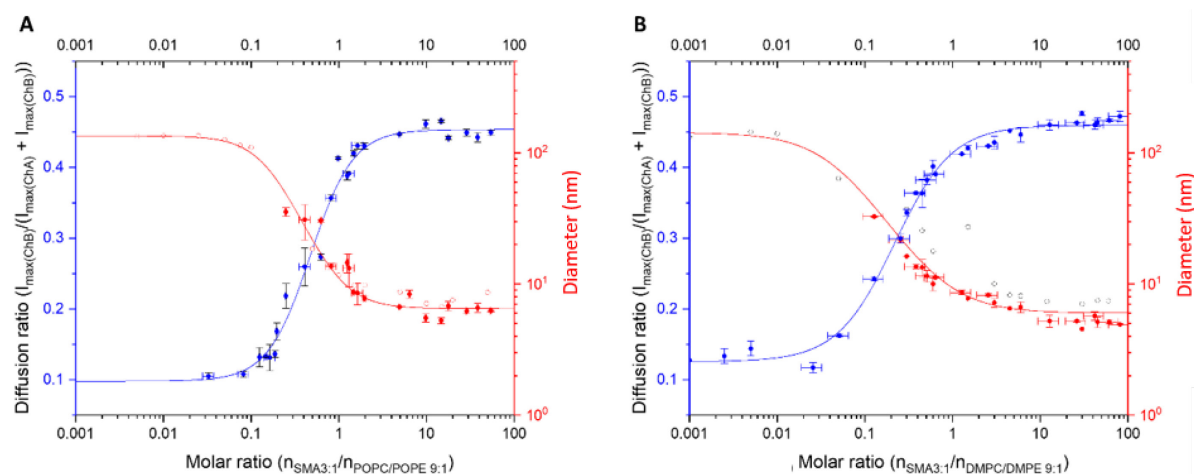


**Figure 5.3** - **A** and **B** are TEM images of LUVs of POPC/POPE (9:1). **C** is an image of the sample after addition of a solubilising excess SMA (3:1) ( $n_{\text{SMA}3:1}/n_{\text{Lipids}} > 5$ ).

The validation of this approach following the results described above invited us to further explore the SMALPs formation by MDS. We wanted to investigate if, beyond the extraction of nanodiscs size, it would be possible to access the concentration of copolymer required for the onset of solubilisation,  $R_{\text{sat}}$ , and for the complete solubilisation,  $R_{\text{sol}}$ , of lipids. Thus, we have explored the solubilisation of LUVs composed of POPC/POPE (9:1) (long alkyl chains 16:0-18:1) and DMPC/DMPE (9:1) (short alkyl chains 14:0) induced by SMA (3:1) copolymer. Our objective, besides further exploring MDS capabilities was to determine whether lipids chains unsaturation could affect the values of  $R_{\text{sat}}$  and  $R_{\text{sol}}$ . Both LUVs suspensions were kept at a constant concentration of 0.65 mM and the SMA (3:1) copolymer concentration was varied. As LUVs were prepared by extrusion, we have systematically determined the lipid concentrations with phosphorus assays [47]. Increasing amounts of SMA (3:1) copolymer were added to the LUVs and left to react for at least 16 h at 25 °C for

POPC/POPE (9:1) and 30 °C for DMPC/DMPE (9:1), to avoid impact of membrane fluidity on the process.

The molar ratio  $n_{\text{SMA}3:1}/n_{\text{Lipids}}$  was explored extensively from values as low as 0.001 up to 100. After the solubilisation step, 7  $\mu\text{L}$  of each sample was drop casted onto diffusion chips prior injection in the MDS device. The diffusion profiles of ChA and ChB were extracted and their maxima of intensity were used to define a diffusion ratio equal to  $I_{\text{max(ChB)}}/(I_{\text{max(ChA)}} + I_{\text{max(ChB)}})$ . This so-defined diffusion ratio can vary between two extrema: 0 and 0.5. The absence of diffusion corresponds to a value of 0 while a value of 0.5 means that equilibrium has been reached between both channels through diffusion. Measurements for each molar ratio were at least duplicated ( $n \geq 2$ ). For each lipid mixture, the diffusion ratio  $I_{\text{max(ChB)}}/(I_{\text{max(ChA)}} + I_{\text{max(ChB)}})$  has been plotted against the molar ratio  $n_{\text{SMA}3:1}/n_{\text{Lipids}}$  (Fig.4 A and B).



**Figure 5.4** - Particle diffusion ratio (blue full circles) and diameter (red full circles for MDS and empty circles for DLS) as a function of the molar ratio for **A**) POPC/POPE (9:1) and **B**) DMPC/DMPE (9:1). Horizontal blue and red error bars represent errors in lipid concentration determination. Vertical blue and red bars represent the standard deviation on the measurements ( $n \geq 2$ ).

In the case of POPC/POPE (9:1) mixture, for molar ratios below 0.08, the diffusion ratio had a constant value around 0.1, similar to the diffusion ratio observed in the absence of SMA (3:1). This means that for molar ratios  $\leq 0.08$  the diffusion behaviour remained unaffected, corresponding to stage I in the three-stage solubilisation model where LUVs start to be loaded with copolymer molecules. For molar ratio  $\geq 0.08$ , the diffusion ratio starts to increase with a steep slope. Interestingly this molar ratio matched quite well the saturation ratio ( $R_{\text{sat}} = 0.108$ ) for pure POPC LUVs solubilised by SMA (3:1) determined by the Keller's group using  $^{31}\text{P}$  NMR [46] (**table 5.1**). In the case of DMPC/DMPE (9:1) mixture, the diffusion ratio remained constant at a slightly higher value of 0.12 than POPC/POPE (9:1) for molar ratio below 0.05. Above 0.05, the diffusion ratio started to increase significantly. Again, this value is in good

agreement with the  $R_{\text{sat}} = 0.078$  reported for pure DMPC [46] (**table 5.1**). In this respect, the increase of diffusion ratios for both lipid mixtures marked the onset of solubilisation and the beginning of stage II. Interestingly, MDS was able to distinguish between the solubilisation of saturated (DMPC/DMPE) and unsaturated (POPC/POPE) lipids giving distinct  $R_{\text{sat}}$  values of 0.05 vs 0.08 respectively. For the POPC/POPE (9:1) mixture, a further increase in SMA (3:1) concentration led to a plateau at a diffusion ratio value of 0.45, close to the equilibrium saturation value of 0.5. The plateau appeared at molar ratios  $\geq 1.5$ . This value is very different from the  $R_{\text{sol}}$  reported previously for POPC ( $R_{\text{sol}} = 0.167$ ) [46] (**table 5.1**). For DMPC/DMPE (9:1), increasing further the molar ratio  $n_{\text{SMA}3:1}/n_{\text{Lipids}}$  allowed to reach a plateau for molar ratio  $> 2$ , which is once again much higher than the reported  $R_{\text{sol}}$  for pure DMPC ( $R_{\text{sol}} = 0.144$ ) [46] (**table 5.1**). These values, that could have been anticipated as a direct reading of the complete solubilisation ratio at the beginning of stage III, were however one order of magnitude higher than  $R_{\text{sol}}$  values reported in the literature (**table 5.1**). Thus, we will refer later to these noticeably high values as “apparent  $R_{\text{sol}}$ ”.

**Table 5.1** - Comparative table of  $R_{\text{sat}}$  and  $R_{\text{sol}}$  values for SMA (3:1) driven solubilisation of different lipids or mixtures.

	$R_{\text{sat}}$		$R_{\text{sol}}$		$R_{\text{sol}}^{30\text{nm}***}$	
	$^{31}\text{P}$ NMR	MDS	$^{31}\text{P}$ NMR	MDS	$^{31}\text{P}$ NMR	MDS
POPC	0.108*	-	0.167*	-	-	
DMPC	0.078*	-	0.144*	-	-	
POPC/POPE (9:1)	0.1*	0.08	0.175*	1.5**	-	0.36
DMPC/DMPE (9:1)	-	0.05	-	2**	-	0.17

\*: values taken or extrapolated from published data (read on the phase diagrams of [46]).

\*\*: apparent  $R_{\text{sol}}$ .

\*\*\*:  $n_{\text{SMA}3:1}/n_{\text{Lipids}}$  ratio for which nanodiscs of 30 nm diameter were observed.

Our results indicate that the approach used apparently slightly underestimates  $R_{\text{sat}}$  values whereas they largely overestimate  $R_{\text{sol}}$  values. Two reasons can explain these observed discrepancies. First,  $R_{\text{sat}}$  and  $R_{\text{sol}}$  values were compared to the ones determined for pure POPC or DMPC LUVs whereas we have introduced a small fraction of POPE or DMPE to enable sample detection. The introduction of such lipids is not without consequence. Due to their smaller head groups, POPE and DMPE present a negative spontaneous curvature, inducing an increased lateral pressure in the bilayer. The introduction of such lipids has been shown to greatly influence the solubilisation by SMA. In the case of DOPC, the introduction of a fraction of DOPE seems to facilitate the beginning of solubilisation but prevents complete solubilisation [18]. This observation was further complemented by another study, demonstrating that the



introduction of POPE inside POPC vesicles tends to decrease  $R_{\text{sat}}$  values while at the same time increasing  $R_{\text{sol}}$  values, meaning that more SMA (3:1) copolymer is required to reach complete solubilisation [46]. Indeed, thanks to the quantitative results obtained in the latter study, the expected values for  $R_{\text{sat}}$  and  $R_{\text{sol}}$  for the solubilisation of POPC/POPE (9:1) by SMA (3:1) can be estimated around  $\sim 0.1$  (0.108 without POPE) and  $\sim 0.175$  (0.167 without POPE) respectively. Consequently, the presence of PE in our systems supports the slightly lower values of  $R_{\text{sat}}$  that we have observed but is hardly compatible with the one order of magnitude increase that we have measured for  $R_{\text{sol}}$  values.

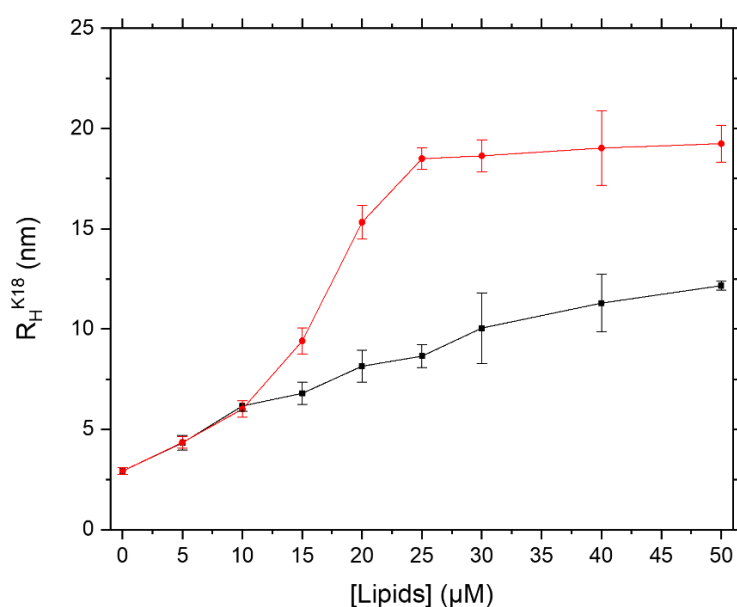
In this respect, a second observation could explain our apparent overestimation of the  $R_{\text{sol}}$  values. Indeed, to reach complete solubilisation, more and more copolymer molecules are added to the solution competing for a finite amount of lipids. It has been shown that this increasing amount of copolymer tends to decrease the size of nanodiscs [46, 49]. Indeed, we have determined apparent  $R_{\text{sol}}$  from the maximum values of the diffusion ratio, which depended on the size of the sample. Therefore, the size reduction of SMALPs diameter as a function of the copolymer concentration could explain the overestimation of the  $R_{\text{sol}}$  value. In this respect, we have plotted the diameters of diffusing particles detected by MDS against the molar ratio (**figure 5.4, A and B**). Notably, the following interpretation of  $R_{\text{sol}}$  values is based on the assumption that all LUVs have been converted into nanodiscs, an information that MDS is unfortunately not able to provide. Interestingly, our results show that the usual size range of nanodiscs of 10 – 30 nm is reached for molar ratios preceding the beginning of the plateau of the diffusion ratio curve, in other words before the apparent  $R_{\text{sol}}$ . Typically, SMALPs with diameters of 30 nm are obtained for molar ratios of  $\sim 0.36$  for POPC/POPE (9:1) and  $\sim 0.17$  for DMPC/DMPE (9:1). Those latter values reported as  $R_{\text{sol}}^{30 \text{ nm}}$  in **table 5.1** are much closer to the  $R_{\text{sol}}$  values reported in the literature. Diameters of 10 nm are observed for larger molar ratio values ( $R_{\text{sol}}^{10 \text{ nm}}$ ) of 1 and 0.72 for POPC/POPE (9:1) and DMPC/DMPE (9:1) respectively. For both lipid mixtures, increasing further the molar ratio leads to a plateau with a lower limit at  $\sim 6$  nm diameter which seems to be the lowest achievable diameter for SMA (3:1) based SMALPs.

Additionally, DLS measurement were performed to compare with MDS data. Despite a slight overestimation, the diameters determined by DLS were in good agreement with the ones measured by MDS (**figure 5.4, A and B**). While DLS is known to be biased toward large particles because of the  $10^6$  factor between the light diffusion and particle size, our measurements did not detect large particles (diameter  $> 100$  nm) in the molar ratio range where MDS was able to determine particle size (0.3 - 30 nm). This observation tends to support: (1)

the assumption that all LUVs were converted into nanodiscs (2) the observation that the size of nanodiscs decreased with increasing copolymer concentration. Consequently, MDS is efficient in the determination of  $R_{\text{sat}}$ , namely the onset of solubilisation, with values that are very similar to those reported in the literature. However, regarding  $R_{\text{sol}}$  determination, the dependence of the particle size appears to lead to larger values than those obtained by  $^{31}\text{P}$ -NMR.

### 5.4.3 Peptide/nanodisc interactions

As an additional application of MDS to illustrate its potential, we studied the interaction of a peptide with SMALPs of different compositions. In this case, the lipids used (POPC and  $\text{PIP}_2$ ) do not contain primary amines, and the technique specifically follows peptide diffusion. Aggregation of phosphorylated Tubulin-associated unit (Tau) protein is involved in the neurodegeneration process observed in Alzheimer's disease [50]. This phenomenon appears as a pathological event and needs to be investigated. In particular, negative lipids have been highlighted to induce Tau protein aggregation thus suggesting the importance of such lipids in the interaction [51-54]. This phenomenon stems from the aggregative domain (K18) of Tau, known as the microtubule-binding domain [55]. In a recent study we have demonstrated that  $\text{PIP}_2$ , a negatively charged lipid found in the inner leaflet of membranes, promoted K18 peptide aggregation and fibrillation [56].



**Figure 5.5** - Hydrodynamic radius ( $R_{\text{H}}$ ) changes of K18 (1  $\mu\text{M}$ ) following a titration with increasing concentrations of POPC (black) and POPC/ $\text{PIP}_2$  (80/20 mol%) (red) SMALPs. Each experiment was repeated three times to get statistical insight about the size variation upon SMALPs interaction.

To investigate the specific interaction with PIP<sub>2</sub>, we prepared POPC and POPC/PIP<sub>2</sub> (80/20 %mol) SMALPs with sizes of 9.3 nm and 10.5 nm respectively (followed by DLS). Without lipids, K18 exhibited a mean native hydrodynamic radius of  $2.9 \pm 0.1$  nm as measured by MDS. In aqueous solution, the peptide is supposed to be unfolded [57]. Pure zwitterionic lipids such as POPC have been shown to be unable to promote K18 aggregation [56]. Yet, we observed a progressive increase in size of the peptide hydrodynamic radius up to  $12.2 \pm 0.2$  nm in the presence of 50  $\mu$ M of lipids (**figure 5.5**). In addition, measurements of K18 with SMA (3:1) copolymer in absence of lipids (to a copolymer concentration equivalent to 25  $\mu$ M of SMALPs) showed an increase of K18 radius to 5.2 nm. Such results are pointing to an interaction between K18 and the copolymer molecules. The peptide is positively charged at physiological pH [53] and can establish electrostatic interactions with the maleic acid moieties of the copolymer that are partially deprotonated at pH 7.4 [21]. By contrast, in presence of PIP<sub>2</sub>-containing nanodiscs, K18 size evolution was different as the diameter increase was much more pronounced for same lipid concentrations (above 10  $\mu$ M). A maximum hydrodynamic radius of  $19.2 \pm 0.9$  nm was reached at 50  $\mu$ M, indicating peptide aggregation in presence of PIP<sub>2</sub> either in solution or onto nanodiscs. This phenomenon was observed within few minutes after mixing the peptide and the nanodiscs, a short time scale relative to the onset of fibrillation of K18, which was reported to be few hours of incubation in the presence of lipids [56]. The technique may therefore probe preliminary events that eventually lead to the formation of fibres induced by negatively charged lipids such as PIP<sub>2</sub>. The formation of the first aggregated objects (a few monomers) constitutes a crucial event that is generally not temporally characterised as they are not detected with classical methods such as fluorescence assays. The formation of small peptide aggregates is of primary importance, as it may trigger nucleation and lead to the formation of fibres.

## 5.5 Conclusions

With their undeniable assets in the study of membrane proteins over conventional detergents, SMALPs draw more and more attention from structural biologists, biophysicists and chemists. With the idea of pushing forward the boundaries set by the current inherent limitations of SMALPs, many variants have been developed. Such an emulation calls for better characterisation and control of SMALPs formation, a process that remains to be understood in detail. In this work, we have used a novel method based on microfluidic diffusional sizing to follow SMALPs formation from SMA (3:1) driven solubilisation of LUVs composed of POPC/POPE (9:1) and DMPC/DMPE (9:1) mixtures. While this technology was originally

developed to detect and measure protein hydrodynamic radius mostly for quality control purposes, herein we have set up a protocol to follow SMALPs formation. We have demonstrated that the introduction of a small fraction of amino-containing lipids enabled the detection of lipid particles. This opens the road to detect virtually any primary amine-containing molecule, emphasizing the versatility of the technique. Consequently, using minute amount of sample (less than 10  $\mu\text{L}$ ) in a relative short time ( $t < 15$  min), MDS was able to determine the diameter of SMALPs with high precision as confirmed by supportive DLS data. Taking advantage of MDS diffusion profiles derived from the titration of LUVs by SMA (3:1) copolymer, we were able to construct saturation curves providing a direct reading of the solubilisation process. The onset of solubilisation ( $R_{\text{sat}}$ ) can be obtained directly from the curve. Interestingly, MDS is also sensitive to the subtle effect of chain unsaturation revealing slightly different  $R_{\text{sat}}$  values for POPC and DMPC in agreement with the literature. However, since SMALPs diameter keeps decreasing after complete solubilisation upon SMA (3:1) addition, MDS profiles still evolved even after complete bilayer solubilisation which may have caused an apparent overestimation of  $R_{\text{sol}}$ . Once this phenomenon is understood,  $R_{\text{sol}}$  values can be derived for specific SMALPs size using particle diameter vs molar ratio curves. Moreover, MDS was recently used for the study of self-aggregating, fibre-forming molecules. We demonstrated that MDS is also an effective technique to highlight the aggregation propensity of a peptide in presence of peculiar lipids contained in SMALPs to have insights into the kinetics of such phenomenon and more generally to probe the interaction between peptides and membranes.

## 5.6 Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## 5.7 Acknowledgements

M.A. is thankful to the Fédération des Etudes Supérieures et Post-doctorales (FESP) from Montreal University for financial support. MA also gratefully acknowledges the financial support of the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), through its excellence network program supporting the Québec Centre for Advanced Materials and Université de Bordeaux's Initiative d'Excellence (IdEx).

## 5.8 References

1. Cournia, Z., et al., *Membrane protein structure, function, and dynamics: a perspective from experiments and theory*. The Journal of Membrane Biology, 2015. **248**(4): p. 611-640.
2. Phillips, R., et al., *Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function*. Nature, 2009. **459**: p. 379.
3. Scott, D.J., et al., *Stabilizing membrane proteins through protein engineering*. Current Opinion in Chemical Biology, 2013. **17**(3): p. 427-435.
4. Champeil, P., et al., *A robust method to screen detergents for membrane protein stabilization, revisited*. Analytical Biochemistry, 2016. **511**: p. 31-35.
5. Sadaf, A., et al., *Chapter four - amphipathic agents for membrane protein study*, in *Methods in Enzymology*, A.K. Shukla, Editor. 2015, Academic Press. p. 57-94.
6. Dürr, U.H.N., R. Soong, and A. Ramamoorthy, *When detergent meets bilayer: Birth and coming of age of lipid bicelles*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2013. **69**: p. 1-22.
7. Marcotte, I. and M. Auger, *Bicelles as model membranes for solid- and solution-state NMR studies of membrane peptides and proteins*. Concepts in Magnetic Resonance Part A, 2005. **24A**(1): p. 17-37.
8. Ritchie, T.K., et al., *Chapter eleven - reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs*, in *Methods in Enzymology*, N. Düzgünes, Editor. 2009, Academic Press. p. 211-231.
9. Kern, J. and A. Guskov, *Lipids in photosystem II: Multifunctional cofactors*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2011. **104**(1): p. 19-34.
10. Overduin, M. and B. Klumperman, *Advancing membrane biology with poly(styrene-co-maleic acid)-based native nanodiscs*. European Polymer Journal, 2018. **110**.
11. Knowles, T.J., et al., *Membrane Proteins Solubilized Intact in Lipid Containing Nanoparticles Bounded by Styrene Maleic Acid Copolymer*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(22): p. 7484-7485.
12. Rajesh, S., T. Knowles, and M. Overduin, *Production of membrane proteins without cells or detergents*. New Biotechnology, 2011. **28**(3): p. 250-254.
13. Bayburt, T.H. and S.G. Sligar, *Membrane protein assembly into Nanodiscs*. FEBS letters, 2010. **584**(9): p. 1721-1727.
14. Teo, A.C.K., et al., *Analysis of SMALP co-extracted phospholipids shows distinct membrane environments for three classes of bacterial membrane protein*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 1813.
15. Schmidt, V., et al., *The lipid environment of Escherichia coli Aquaporin Z*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2019. **1861**(2): p. 431-440.

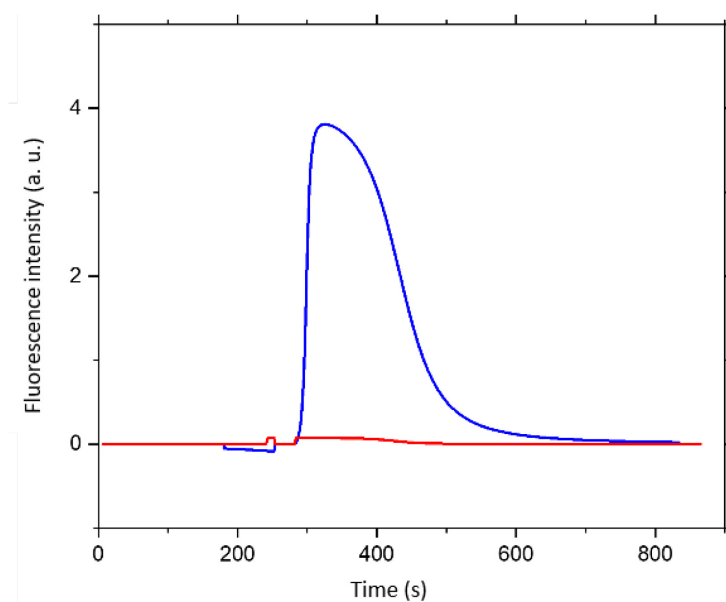
16. Karlova, M.G., et al., *Detergent-free solubilization of human Kv channels expressed in mammalian cells*. Chemistry and Physics of Lipids, 2019. **219**: p. 50-57.
17. Swainsbury, D.J.K., et al., *The effectiveness of styrene-maleic acid (SMA) copolymers for solubilisation of integral membrane proteins from SMA-accessible and SMA-resistant membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2017. **1859**(10): p. 2133-2143.
18. Scheidelaar, S., et al., *Molecular model for the solubilization of membranes into nanodisks by styrene maleic Acid copolymers*. Biophysical journal, 2015. **108**(2): p. 279-290.
19. Dörr, J.M., et al., *The styrene–maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research*. European Biophysics Journal, 2016. **45**(1): p. 3-21.
20. Sun, C., et al., *Structure of the alternative complex III in a supercomplex with cytochrome oxidase*. Nature, 2018. **557**(7703): p. 123-126.
21. Scheidelaar, S., et al., *Effect of polymer composition and pH on membrane solubilization by Styrene-Maleic Acid copolymers*. Biophysical Journal, 2016. **111**(9): p. 1974-1986.
22. Oluwole, A.O., et al., *Solubilization of membrane proteins into functional lipid-bilayer nanodiscs using a Diisobutylene/Maleic Acid copolymer*. Angewandte Chemie International Edition, 2017. **56**(7): p. 1919-1924.
23. Yasuhara, K., et al., *Spontaneous lipid nanodisc formation by amphiphilic polymethacrylate copolymers*. Journal of the American Chemical Society, 2017. **139**(51): p. 18657-18663.
24. Ravula, T., et al., *Formation of pH-resistant monodispersed polymer–lipid nanodiscs*. Angewandte Chemie International Edition, 2018. **57**(5): p. 1342-1345.
25. Lindhoud, S., et al., *SMA-SH: modified Styrene–Maleic Acid copolymer for functionalization of lipid nanodiscs*. Biomacromolecules, 2016. **17**(4): p. 1516-1522.
26. Orekhov, P.S., et al., *Styrene/Maleic Acid copolymers form SMALPs by pulling lipid patches out of the lipid bilayer*. Langmuir, 2019. **35**(10): p. 3748-3758.
27. Xue, M., et al., *Molecular mechanism of lipid nanodisc formation by Styrene-Maleic Acid copolymers*. Biophysical Journal, 2018. **115**(3): p. 494-502.
28. Lichtenberg, D., H. Ahyayauch, and F.M. Goñi, *The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers*. Biophysical journal, 2013. **105**(2): p. 289-299.
29. Lichtenberg, D., et al., *Detergent solubilization of lipid bilayers: a balance of driving forces*. Trends in Biochemical Sciences, 2013. **38**(2): p. 85-93.
30. Helenius, A. and K. Simons, *Solubilization of membranes by detergents*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes, 1975. **415**(1): p. 29-79.

31. Vargas, C., et al., *Nanoparticle self-assembly in mixtures of phospholipids with styrene/maleic acid copolymers or fluorinated surfactants*. *Nanoscale*, 2015. **7**(48): p. 20685-20696.
32. Jackson, M.L., et al., *Solubilization of phosphatidylcholine bilayers by octyl glucoside*. *Biochemistry*, 1982. **21**(19): p. 4576-4582.
33. Walter, A., et al., *The vesicle-to-micelle transition of phosphatidylcholine vesicles induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2000. **1508**(1): p. 20-33.
34. Ollivon, M., et al., *Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octylglucoside*. *Biochemistry*, 1988. **27**(5): p. 1695-1703.
35. Vinson, P.K., Y. Talmon, and A. Walter, *Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octyl glucoside elucidated by cryo-transmission electron microscopy*. *Biophysical Journal*, 1989. **56**(4): p. 669-681.
36. Johnsson, M. and K. Edwards, *Interactions between nonionic surfactants and sterically stabilized phosphatidylcholine liposomes*. *Langmuir*, 2000. **16**(23): p. 8632-8642.
37. Garner, A.E., D. Alastair Smith, and N.M. Hooper, *Visualization of detergent solubilization of membranes: implications for the isolation of rafts*. *Biophysical Journal*, 2008. **94**(4): p. 1326-1340.
38. Morandat, S. and K. El Kirat, *Solubilization of supported lipid membranes by octyl glucoside observed by time-lapse atomic force microscopy*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007. **55**(2): p. 179-184.
39. Keller, S., H. Heerklotz, and A. Blume, *Monitoring lipid membrane translocation of Sodium Dodecyl Sulfate by Isothermal Titration Calorimetry*. *Journal of the American Chemical Society*, 2006. **128**(4): p. 1279-1286.
40. Heerklotz, H., *The microcalorimetry of lipid membranes*. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2004. **16**(15): p. R441-R467.
41. Heerklotz, H., et al., *Application of isothermal titration calorimetry for detecting lipid membrane solubilization*. *Chemical Physics Letters*, 1995. **235**(5): p. 517-520.
42. Yates, E.V., et al., *Latent analysis of unmodified biomolecules and their complexes in solution with attomole detection sensitivity*. *Nature Chemistry*, 2015. **7**: p. 802.
43. Gang, H., et al., *Microfluidic diffusion platform for characterizing the sizes of lipid vesicles and the thermodynamics of protein-lipid interactions*. *Analytical Chemistry*, 2018. **90**(5): p. 3284-3290.
44. Zhang, Y., et al., *Protein aggregate-ligand binding assays based on microfluidic diffusional separation*. *ChemBioChem*, 2016. **17**(20): p. 1920-1924.
45. Herling, T.W., et al., *A microfluidic platform for real-time detection and quantification of protein-ligand interactions*. *Biophysical journal*, 2016. **110**(9): p. 1957-1966.

46. Cuevas Arenas, R., et al., *Influence of lipid bilayer properties on nanodisc formation mediated by styrene/maleic acid copolymers*. *Nanoscale*, 2016. **8**(32): p. 15016-15026.
47. Rouser, G., S. Fleischer, and A. Yamamoto, *Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots*. *Lipids*, 1970. **5**(5): p. 494-496.
48. Jamshad, M., et al., *Structural analysis of a nanoparticle containing a lipid bilayer used for detergent-free extraction of membrane proteins*. *Nano Research*, 2015. **8**(3): p. 774-789.
49. Grethen, A., et al., *Thermodynamics of nanodisc formation mediated by styrene/maleic acid (2:1) copolymer*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 11517.
50. Virginia M-Y Lee, Michel Goedert, and J.Q. Trojanowski, *Neurodegenerative tauopathies*. *Annual Review of Neuroscience*, 2001. **24**(1): p. 1121-1159.
51. Mari, S.A., et al., *Reversible cation-selective attachment and self-assembly of human Tau on supported brain lipid membranes*. *Nano Letters*, 2018. **18**(5): p. 3271-3281.
52. Ait-Bouziad, N., et al., *Discovery and characterization of stable and toxic Tau/phospholipid oligomeric complexes*. *Nature Communications*, 2017. **8**(1): p. 1678.
53. Elbaum-Garfinkle, S., T. Ramlall, and E. Rhoades, *The role of the lipid bilayer in Tau aggregation*. *Biophysical journal*, 2010. **98**(11): p. 2722-2730.
54. Chirita, C.N., M. Necula, and J. Kuret, *Anionic micelles and vesicles induce Tau fibrillization in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(28): p. 25644-25650.
55. Crowther, T., M. Goedert, and C.M. Wischik, *The repeat region of microtubule-associated protein Tau forms part of the core of the Paired Helical Filament of Alzheimer's disease*. *Annals of Medicine*, 1989. **21**(2): p. 127-132.
56. Talaga, D., et al., *PIP2 phospholipid-induced aggregation of Tau filaments probed by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018. **57**(48): p. 15738-15742.
57. von Bergen, M., et al., *Mutations of Tau Protein in Frontotemporal Dementia Promote Aggregation of Paired Helical Filaments by Enhancing Local  $\beta$ -Structure*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(51): p. 48165-48174.



## 5.9 Supplementary material



**Figure 5S.1** - MDS measurement of POPC/POPS (9:1) MLVs diffusion. In blue, Channel A corresponds to the channel where the sample has been introduced while in red, channel B is the one where the sample diffused.

---

## Chapitre 6 : Conclusions générales

### 6.1 Conclusions

Il ne fait nul doute aujourd'hui que l'implication du peptide  $A\beta_{1-42}$  et de la protéine Tau dans la pathogénèse de la MA est avérée. Le caractère délétère des oligomères d' $A\beta_{1-42}$  et la dégénérescence neuronale induite par la perte de fonction de la protéine Tau sont reconnus et devenus des dogmes dans notre compréhension de la pathologie. Dans le cas d' $A\beta_{1-42}$ , la manifestation de la toxicité des espèces oligomériques est globalement assez mal cernée, de même que le processus *on-pathway* (au cours de la fibrillation) ou, *a contrario*, *off-pathway* de leur formation. En cause, la diversité des scénarios physiopathologiques plausibles et le manque crucial d'informations sur ces espèces. L'origine, le mode de formation, la nature morphologique et structurale ne sont toujours pas bien caractérisés même si certaines hypothèses sont avancées, comme une structure secondaire particulière en feuillets  $\beta$  antiparallèles [1, 2]. La relation directe de cette structure avec la toxicité n'est pas clairement établie à ce jour. Dans le cas de Tau, le lien avec la neurotoxicité est peut-être moins difficile à cerner car la protéine et sa fonction, essentielle pour l'intégrité des cellules neuronales, sont bien définies. En revanche, les facteurs induisant la phosphorylation de la protéine, élément déclencheur de son dysfonctionnement, ainsi que les mécanismes qui conduisent à sa perte de fonction restent non élucidés.

L'implication de la membrane plasmique dans la perte de fonction de Tau ainsi que dans la manifestation de la toxicité d' $A\beta_{1-42}$  est une théorie qui reçoit de plus en plus de crédit. La membrane plasmique semble être une cible du peptide  $A\beta_{1-42}$ , induisant des dommages importants et conduisant à la mort des cellules neuronales [3]. Des lipides anioniques, spécifiquement localisés sur le feuillet interne de la membrane cytoplasmique, semblent promouvoir l'agrégation de certains domaines de la protéine Tau [4, 5]. Aucune hypothèse de mécanisme concerté (action d' $A\beta_{1-42}$  et Tau) n'est actuellement établie. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet de doctorat était de mettre en évidence les effets du peptide  $A\beta_{1-42}$  et de la protéine Tau sur des membranes modèles, de compositions lipidiques variées, afin de parvenir à mieux comprendre les facteurs (lipides spécifiques) qui régissent leurs interactions. Nous souhaitons établir les modes d'action associés à ces effets. La microscopie à force atomique est particulièrement adaptée au suivi de la morphologie des membranes et de son intégrité. Grâce à cette technique, il est possible de suivre les effets de peptides et des protéines ainsi que l'assemblage ou l'agrégation de ces derniers. Les propriétés d'autoassemblage des

espèces amyloïdes et l'aspect transitoire de l'existence de certaines espèces (oligomériques) apportent toutefois une part de complexité aux investigations en raison de la cinétique du processus de fibrillation et de l'hétérogénéité des espèces qui peuvent être générées.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons dans un premier temps étudié le phénomène de solubilisation de systèmes membranaires homogènes par des détergents afin de déterminer si la composition des membranes pouvait impacter le phénomène de solubilisation. Les résultats de cette étude permettent d'établir les paramètres dictant ce processus avec des agents de solubilisation simples et mettent en évidence la notion de sélectivité lipidique. De manière intéressante, la nature électrostatique des détergents et des lipides n'a pas joué de rôle décisif sur la sélectivité de l'extraction lipidique, une observation importante car les interactions électrostatiques sont considérées comme étant à la base des phénomènes d'interactions fortes. La structure moléculaire des lipides, associée à la courbure spontanée des films qu'ils forment, a en revanche démontré qu'elle modulait la propension d'agents solubilisants tels que des détergents à extraire préférentiellement un lipide plutôt qu'un autre. Cet aspect de sélectivité peut être également lié au type d'agrégats résultants de la solubilisation des membranes. Ces informations sont importantes car les détergents sont souvent utilisés pour extraire et étudier la composition de domaines dans les membranes biologiques. Cette étude nous a permis de mieux comprendre les facteurs qui interviennent dans le phénomène de solubilisation de membranes modèles avec des molécules simples, en s'affranchissant, dans un premier temps, de la complexité du caractère amyloïde des peptides qui font l'objet des travaux de la thèse.

Par la suite, grâce à l'AFM et l'utilisation de bicouches supportées comme modèles membranaires, nous avons pu établir que la composition lipidique des membranes pouvait moduler leurs interactions avec le peptide  $A\beta_{1-42}$ . L'ensemble des compositions étudiées démontre que la présence de domaines est un facteur qui gouverne le processus d'interaction du peptide  $A\beta_{1-42}$  avec la bicouche lipidique. L'ensemble des résultats obtenus permet de privilégier un mécanisme d'action : les défauts d'empilement lipidiques aux interfaces de ces domaines agissent comme des sites d'adsorption du peptide  $A\beta_{1-42}$ . L'étude comparative menée sur le mutant G37C (espèce oligomérique stable) a corroboré l'importance des propriétés morphologiques et structurales des oligomères du peptide  $A\beta_{1-42}$  sur le degré de fragmentation membranaire. Les oligomères ont démontré une importante capacité à fragmenter les membranes, corroborant leur toxicité observée *in vivo* [6], et le caractère particulièrement délétère des espèces oligomériques sur les cellules neuronales.

Le peptide K18, qui constitue le domaine de Tau impliqué dans l'association aux microtubules et dans l'agrégation de la protéine, a également démontré différents effets en fonction de la composition membranaire, notamment au niveau de sa capacité à pouvoir solubiliser systématiquement les bicouches lipidiques en phase fluide. Ces effets sont d'autant plus intéressants qu'ils sont observés dans des conditions de concentrations physiologiques (nM). Comme le peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>, K18 a également démontré une affinité pour les régions de la membrane où la tension est plus élevée, tels que les bords des bicouches supportées. Certes, la notion de bords n'a pas réellement de sens physiologique pour une membrane cellulaire, mais la tension membranaire est plus importante au niveau de la jonction entre les domaines lipidiques. Cette observation conforte l'idée que ces peptides ont une affinité particulière pour ce type d'interfaces, un concept relativement nouveau dans le cas des espèces amyloïdes. Ces zones pourraient, de manière générale, constituer des sites d'insertion des peptides pouvant conduire à des effets de déstabilisation membranaire comparables à des effets détergents.

Il est intéressant de remarquer que ces observations sont souvent rapportées comme étant des caractéristiques communes chez les peptides antimicrobiens [7-9].

En réalité, la possibilité qu'un peptide comme A $\beta$ <sub>1-42</sub> ait une nature antimicrobienne est une théorie de plus en plus évoquée [10-13]. De récents travaux ont en effet conduit à l'émergence d'une nouvelle hypothèse selon laquelle le peptide serait en réalité généré suite à une réponse immunitaire à but neuroprotecteur contre des agents infectieux [14]. Cette activité antimicrobienne d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> a été observée *in vivo* avec différents types de bactéries, ce qui laisse penser que le peptide ne serait pas juste le sous-produit stochastique du métabolisme de l'APP [12]. En particulier, des tests réalisés *in vivo* ont montré que l'infection de neurones par le virus de l'herpès entraînait une augmentation de la production du peptide A $\beta$  [15, 16]. La perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique est considérée comme une des conséquences du vieillissement et des infections virales ou bactériennes pourraient induire des réponses immunitaires spécifiques comme la production de peptides ayant des activités antimicrobiennes [17].

Pour finir, il est important de revenir sur le rôle des lipides que nous avons pu observer de manière individuelle. A raison de 10 à 20 mol%, ils ont entraîné des effets très variés. Ainsi, le cholestérol, souvent abordé dans la MA, a été impliqué dans des effets de fragmentation membranaire avec A $\beta$ <sub>1-42</sub> et le mutant oligomérique. Même si nous travaillons sur des modèles membranaires simples, ce résultat conforte l'idée que le stérol pourrait jouer un rôle particulier dans la pathologie. En ce sens, certains traitements thérapeutiques visent tout particulièrement

à diminuer le taux de cholestérol dans les membranes, avec les statines en particulier [18, 19]. Il est en revanche difficile de conclure quant à son rôle avec K18 car les effets de solubilisation membranaire étaient marqués avec et sans cholestérol.

Seuls les lipides anioniques ont été associés à des phénomènes d'agrégation sur les membranes. Le GM1 et PIP<sub>2</sub> ont tous deux favorisé l'association, l'agrégation ainsi que la formation de fibres sur la membrane avec A $\beta$ <sub>1-42</sub> et K18 respectivement. Ces deux lipides ont comme caractéristique commune d'être chargés négativement et de pouvoir former des agrégats au sein des membranes. Ils possèdent également des têtes polaires volumineuses comportant des groupements susceptibles de pouvoir former des liaisons hydrogène avec des protéines [20, 21]. La combinaison de ces propriétés pourrait être à la base d'un mécanisme commun dans l'amorçage de la fibrillation de peptide sur les membranes.

Il est en revanche important de souligner que de manière générale, les phénomènes de perméabilisation membranaire n'ont pas toujours été associés à des processus de fibrillation. Ceci pourrait appuyer l'hypothèse selon laquelle les formes qui induisent des phénomènes délétères sur les membranes ne sont pas nécessairement des intermédiaires du processus de fibrillation.

De plus, la forme des agrégats qui ont conduit ou non à la formation de fibres a été très influencée par la nature de la composition de la membrane les générant. Ainsi les séparations de phase ont conduit à la formation d'espèces globulaires dans le cas d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> tandis que les agrégats formés par A $\beta$ <sub>1-42</sub>, sur les membranes comportant du GM1 (nanodomains) ou associés à la formation de fibres avec K18, étaient relativement plats. Certaines structures sont peut-être plus favorables que d'autres à pouvoir promouvoir des effets de solubilisation ou des changements conformationnels menant à la formation de fibres comme il est pensé dans le cas de membranes qui comportent du GM1 [22].

Ce travail de thèse apporte donc de nouvelles connaissances sur les phénomènes d'interaction entre les membranes et les peptides amyloïdes impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Bien entendu, de nombreux travaux restent à être réalisés pour pouvoir répondre à toute la complexité de la pathologie. Ce travail participe néanmoins à une meilleure compréhension des mécanismes subtils qui interviennent à l'échelle moléculaire. Nous mettons tout particulièrement l'emphase sur l'importance de la composition membranaire et le rôle clé de certains lipides à pouvoir moduler les effets d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> et K18 *in vitro*.

## 6.2 Perspectives

Plusieurs études de caractérisation pourraient être réalisées dans la continuité de ces travaux. La dynamique des différents phénomènes d'interaction observés pourrait par exemple être davantage explorée en exploitant des modes d'imagerie AFM à haute vitesse et à plus haute résolution.

Dans la mesure où les peptides amyloïdes démontrent la capacité à pouvoir induire de la solubilisation membranaire à la manière des détergents et à former des agrégats de formes variées sur les membranes, la quantification des efflux lipidiques pourrait également apporter des éléments de réponse intéressants sur le caractère sélectif des espèces induisant ces effets lors du processus d'extraction.

Dans le cas où la membrane serait impliquée dans les processus neurotoxiques, il paraît important de pouvoir caractériser les fibres formées *in vitro*, et résultant de l'interaction avec des membranes, afin de définir s'il existe des caractéristiques structurales communes avec les fibres retrouvées dans les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires. La microscopie à force atomique permet d'obtenir une description morphologique et un état de la membrane (intégrité, formation de domaines). L'addition des peptides peut être visualisée lorsqu'il y a formation d'agrégats ou de fibres, mais aucune identification moléculaire et structurale n'est obtenue. Les agrégats visualisés sont-ils des résidus peptidiques, lipidiques ou un mélange ? Les techniques de champs proches comme l'AFM couplée à la spectroscopie IR (AFM-IR) [23] ou la spectroscopie Raman exaltée par effet de pointe (TERS) [24] pourraient nous permettre d'obtenir ces informations moléculaires et structurales. L'AFM-IR a déjà démontré des résultats prometteurs pour l'étude des fibres amyloïdes [25, 26]. La technique doit cependant lever des verrous technologiques importants car elle n'est pas encore suffisamment sensible et résolutive pour l'étude de structures qui font  $\sim 10$  nm d'épaisseur ou moins comme les fibres formées par A $\beta_{1-42}$  ou K18. La spectroscopie TERS permet de déterminer les structures secondaires d'objets ayant des épaisseurs de dimensions très faibles (quelques dizaines de nanomètres en dimension latérale et quelques nanomètres en épaisseur) [27]. La principale limitation de ces deux techniques, AFM-IR et TERS, est actuellement liée à l'environnement dans lequel elles peuvent travailler : les caractérisations ne se font qu'à l'air pour des systèmes secs. Le défi est aujourd'hui de pouvoir étudier les cinétiques d'autoassemblage dans l'eau.

Outre la structure des fibres, étudier la structure des peptides lorsqu'ils s'accumulent aux interfaces pourrait nous permettre de comprendre les facteurs structuraux qui conduisent à

la formation de fibres ou aux effets de déstabilisation qui induisent la solubilisation membranaire.

L'utilisation de pointes de cantilevier fonctionnalisées avec A $\beta$ <sub>1-42</sub> ou K18 en AFM pourrait également permettre d'élucider très localement les interactions préférentielles avec certains lipides et certaines régions spécifiques, comme les interfaces de domaines. L'analyse microfluidique de taille a également permis de mettre en évidence ces interactions à travers l'observation de phénomènes d'agrégation. La technique pourrait être employée sur une gamme plus large de compositions membranaires afin d'identifier le rôle spécifique d'autres lipides avec les peptides amyloïdes étudiés dans le cadre de la thèse.

### 6.3 Références

1. Huang, D., et al., *Antiparallel  $\beta$ -sheet structure within the C-terminal region of 42-residue Alzheimer's Amyloid- $\beta$  peptides when they form 150-kDa oligomers*. Journal of molecular biology, 2015. **427**(13): p. 2319-2328.
2. Breydo, L. and V.N. Uversky, *Structural, morphological, and functional diversity of amyloid oligomers*. FEBS Letters, 2015. **589**(19, Part A): p. 2640-2648.
3. Cline, E.N., et al., *The Amyloid- $\beta$  oligomer hypothesis: beginning of the third decade*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2018. **64**(s1): p. S567-S610.
4. Ait-Bouziad, N., et al., *Discovery and characterization of stable and toxic Tau/phospholipid oligomeric complexes*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 1678.
5. Mari, S.A., et al., *Reversible cation-selective attachment and self-assembly of human Tau on supported brain lipid membranes*. Nano Letters, 2018. **18**(5): p. 3271-3281.
6. Vignaud, H., et al., *A structure-toxicity study of A $\beta$ 42 reveals a new anti-parallel aggregation pathway*. PloS one, 2013. **8**(11): p. e80262-e80262.
7. Henderson, J.M., et al., *Antimicrobial peptides share a common interaction driven by membrane line tension reduction*. Biophysical Journal, 2016. **111**(10): p. 2176-2189.
8. Lam, K.L.H., et al., *Mechanism of structural transformations induced by antimicrobial peptides in lipid membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2012. **1818**(2): p. 194-204.
9. Hasan, M., et al., *The role of membrane tension in the action of antimicrobial peptides and cell-penetrating peptides in biomembranes*. Biophysical reviews, 2019. **11**(3): p. 431-448.
10. Soscia, S.J., et al., *The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide*. PloS one, 2010. **5**(3): p. e9505-e9505.
11. Fulop, T., et al., *Can an infection hypothesis explain the beta Amyloid hypothesis of Alzheimer's disease?* Frontiers in aging neuroscience, 2018. **10**: p. 224-224.

12. Kumar, D.K.V., et al., *Amyloid- $\beta$  peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease*. Science translational medicine, 2016. **8**(340): p. 340ra72-340ra72.
13. Crunkhorn, S., *Antimicrobial role of amyloid- $\beta$* . Nature Reviews Drug Discovery, 2016. **15**(7): p. 456-456.
14. Moir, R.D., R. Lathe, and R.E. Tanzi, *The antimicrobial protection hypothesis of Alzheimer's disease*. Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association, 2018. **14**(12): p. 1602-1614.
15. Wozniak, M.A., et al., *Herpes simplex virus infection causes cellular  $\beta$ -amyloid accumulation and secretase upregulation*. Neuroscience Letters, 2007. **429**(2): p. 95-100.
16. Eimer, W.A., et al., *Alzheimer's disease-associated  $\beta$ -Amyloid is rapidly seeded by Herpesviridae to protect against brain infection*. Neuron, 2018. **99**(1): p. 56-63.e3.
17. Erickson, M.A. and W.A. Banks, *Age-associated changes in the immune system and blood brain barrier functions*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(7): p. 1632.
18. Shepardson, N.E., G.M. Shankar, and D.J. Selkoe, *Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies*. Archives of neurology, 2011. **68**(10): p. 1239-1244.
19. Schultz, B.G., D.K. Patten, and D.J. Berlau, *The role of statins in both cognitive impairment and protection against dementia: a tale of two mechanisms*. Translational neurodegeneration, 2018. **7**: p. 5-5.
20. McLaughlin, S., et al., *PIP2 and proteins: interactions, organization, and information flow*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2002. **31**(1): p. 151-175.
21. Gu, R.-X., et al., *Ganglioside-lipid and ganglioside-protein interactions revealed by coarse-grained and atomistic molecular dynamics simulations*. The journal of physical chemistry. B, 2017. **121**(15): p. 3262-3275.
22. Cebebauer, M., M. Hof, and M. Amaro, *Impact of GMI on membrane-mediated aggregation/oligomerization of  $\beta$ -Amyloid: unifying view*. Biophysical Journal, 2017. **113**(6): p. 1194-1199.
23. Dazzi, A. and C.B. Prater, *AFM-IR: technology and applications in nanoscale infrared spectroscopy and chemical imaging*. Chemical Reviews, 2017. **117**(7): p. 5146-5173.
24. Sonntag, M.D., et al., *Single-molecule tip-enhanced Raman spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry C, 2012. **116**(1): p. 478-483.
25. Ruggeri, F.S., et al., *Infrared nanospectroscopy characterization of oligomeric and fibrillar aggregates during amyloid formation*. Nature communications, 2015. **6**: p. 7831-7831.



26. Ruggeri, F.S., et al., *Influence of the  $\beta$ -sheet content on the mechanical properties of aggregates during amyloid fibrillization*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015. **54**(8): p. 2462-2466.
27. Talaga, D., et al., *PIP2 phospholipid-induced aggregation of Tau filaments probed by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018. **57**(48): p. 15738-15742.