



HAL
open science

Le complexe CuII Amyloïde-bêta lié à la Maladie d'Alzheimer :Etude structurale, thermodynamique et réactivité

Luc Guilloreau

► **To cite this version:**

Luc Guilloreau. Le complexe CuII Amyloïde-bêta lié à la Maladie d'Alzheimer :Etude structurale, thermodynamique et réactivité. Autre. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2006. Français. NNT: . tel-00142748

HAL Id: tel-00142748

<https://theses.hal.science/tel-00142748>

Submitted on 20 Apr 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ PAUL SABATIER DE TOULOUSE III (SCIENCES)

Ecole Doctorale

CHIMIE

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PAUL SABATIER

Spécialité :

CHIMIE-BIOLOGIE-SANTÉ

par

Luc GUILLOREAU

LE COMPLEXE Cu^{II} -AMYLOÏDE-BÊTA LIÉ À LA MALADIE D'ALZHEIMER : ÉTUDE STRUCTURALE, THERMODYNAMIQUE ET RÉACTIVITÉ

Soutenue le 11 décembre 2006 devant la commission d'examen :

M.	J.-J. GIRERD	Professeur à l'Université de Paris-Sud	
M.	M. RÉGLIER	Directeur de Recherche CNRS à l'Université Paul Cézanne Aix-Marseille III	
M.	F. COUDERC	Professeur à l'Université de Toulouse III	
M.	M. VAŠAK	Professeur à l'Université de Zurich	
M.	P. FALLER	Professeur à l'Université de Toulouse III	Directeur de thèse

Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS
205, route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 4

A ma nièce, Gabrielle,

En souhaitant que sa génération voie l'émergence d'une thérapie efficace contre ce fléau.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS de Toulouse dirigé par Monsieur Jean-Jacques Bonnet. Je le remercie de m'avoir accueilli au sein de cet établissement. Je lui souhaite également une heureuse retraite.

Je remercie tout particulièrement Messieurs Jean-Jacques Girerd, Professeur de l'Université de Paris Sud, et Marius Réglie, Directeur de Recherche au CNRS à l'Université Paul Cézanne Aix-Marseille III, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Leur présence à ce jury est un honneur et je leur en suis reconnaissant.

Je tiens à remercier Monsieur Milan Vasak, Professeur à l'Université de Zurich, de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse et de m'avoir accueilli chaleureusement dans son laboratoire pour y effectuer des expériences.

Monsieur François Couderc, Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, a présidé ce jury de thèse et je l'en remercie.

Ces travaux ont été effectués au sein de l'équipe de Monsieur Peter Fallner, Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse. Je lui suis extrêmement reconnaissant de m'avoir accordé sa confiance en m'accueillant au sein de son équipe et en me proposant un sujet à l'interface de la chimie et de la biologie. Je le remercie d'autant plus qu'il a également assuré la direction scientifique de ce projet de recherche. Sa constante disponibilité, sa gentillesse, ses encouragements, ses conseils fort avisés, son dynamisme (jamais de défaitisme quelques soient les résultats), nos enrichissantes discussions (scientifiques ou non) ont assuré la réussite de la thèse. Merci également de m'avoir offert l'opportunité d'aller présenter mes résultats lors de différents congrès. Les trois années passées ici ont été des plus agréables, très formatrices et inoubliables. Je lui souhaite une bonne continuation ainsi qu'à toute la petite famille.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux différentes personnes qui ont participé à ce travail : Yannick Coppel, pour la RMN, Alain Mari, pour la RPE, Alix Sournia-Saquet, pour l'électrochimie, Dominique Lavabre pour la phosphorescence, Honoré Mazarguil pour la synthèse peptidique, Philippe Eyraud à la documentation, ainsi qu'aux équipes de Didier Fournier (en particulier Luminata Damian) et de Jean Bernadou (ex-Bernard Meunier) pour le support technique et enfin Gabriele Meloni pour m'avoir guidé lors de ma visite Zurichoise.

Je souhaite remercier les personnes que j'ai eu la chance de côtoyer pendant ces trois années et avec qui j'ai passé des moments inoubliables :

Tous les membres de l'Equipe F, anciens et actuels, Emmanuelle (A quand à 100% dans l'équipe ?), Yasmina, Diana et Vincent, Tamara - et Romain - avant d'immigrer à coté, Vanessa - et Seb et Mathilde - (pour la pause-café de 16h), Christine - et Stéphane - (bonne chance pour les concours - de prof et internet - et bon courage pour la fin), pour leur gentillesse, leur bonne humeur et l'ambiance détendue. Travailler à vos côtés a été un réel

plaisir. J'ai une pensée particulière pour les stagiaires qui ont eu « le malheur » de travailler avec moi sur les ROS : Audrey et Sarah.

Tous les membres de l'Équipe K : « Les permanents », Jean, Bernard, Geneviève, Margueritte, Anne, Catherine, Christophe L., Isabelle, Christophe pour les discussions (scientifiques autour du café) et les séminaires formateurs ; « Les passagers » Marc-Antoine, Christophe B., Guillaume, Ludivine (et Pat' qui nous font rêver à l'autre bout du monde), Alexandrine et les étudiants qui ont partagés ou partagent la même galère : Sophie M. (et ses histoires du midi et le compte rendu de la Starac'), Céline – et Mathias-, Sophie L. (Carcassonne et son histoire !), Tamara, Francois, Joel, Fatima... pour tous les fous rire, tous les festins de la cantine que nous avons partagés.

Je voudrais également remercier les amis « toulousains » : Jacky et Pierre - et toute la famille grandissante - pour m'avoir héberger lors de mon arrivée en terre inconnue. Christophe (dit Cricrounet)– et Marie -, pour toutes les soirées DVD, les bières, les matches de rugby (et la fameuse initiation), les footings au bord du canal. Natounette, pour les ciné « dimanche » et quelques autres et toutes nos soirées. Bon courage pour la fin de votre thèse. Merci encore pour le calendrier de l'avant .. j'en ferai bon usage !

J'ai également une pensée pour les amis plus lointains - mais non les moindres - « les Caennais », toujours présents malgré la distance ... Marco - et Anne- pour nos discussions où les thésards refont le monde (et réorganisent le fonctionnement du CNRS), Nannou, ma fidèle confidente et Fabienne et Ingrid pour les discussions « décompression » sur MSN.

Enfin et surtout, mes sentiments les plus forts vont à mes parents qui m'ont toujours encouragé (sauf pour acheter un cheval ...) et soutenu durant toutes ces années d'études et sans qui je n'aurai pu aller au bout de mes projets. J'y associe également ma sœur, Cécile - Vincent et Gabrielle -, ainsi que l'ensemble de ma famille .

Table des matières

Listes des abréviations	6
Chapitre 1 : Maladie d'Alzheimer : causes, mécanismes et stratégies thérapeutiques	9
I. La maladie d'Alzheimer	11
I.1 Historique : une maladie déjà centenaire ...	11
I.2 Impacts sociaux économiques	13
I.3 Origines et facteurs de risque de la maladie	15
I.3.a Facteurs génétiques	15
I.3.b Facteurs biologiques et environnementaux	16
I.3.c Implication des métaux dans la maladie d'Alzheimer	17
I.4 Le diagnostic	18
I.4.a Les manifestations cliniques	18
I.4.b Les tests neuropsychologiques	19
I.4.c L'imagerie cérébrale	20
II. Plaques amyloïdes et neurofibrilles	21
II.1 Le peptide β -amyloïde et son implication dans les plaques amyloïdes	21
II.1.a La protéine APP	23
II.1.b Le peptide β -amyloïde ($A\beta$)	27
II.1.c Interaction de $A\beta$ avec les ions métalliques	31
II.1.d Interaction de $A\beta$ avec les membranes	31
II.2 La protéine tau et son implication dans les neurofibrilles	34
II.3 Relations existant entre $A\beta$ et tau	35
II.4 Hypothèse de la cascade amyloïde	37
II.5 Différentes approches thérapeutiques	42
II.5.a Approches symptomatiques et traitements utilisés	43
II.5.b Agents thérapeutiques ciblant les causes de la maladie	49
III. Métaux et maladie neurodégénérative	58
III.1 Les métaux, indispensables pour l'organisme	58

III.1.a	<i>Rôle des métaux dans le cerveau</i>	58
III.1.b	<i>Contrôle de la concentration</i>	61
III.1.c	<i>Dérégulation des métaux et maladies</i>	65
III.2	Cuivre et espèces réactives de l'oxygène (ROS)	66
III.3	Cuivre et MA	67
III.3.a	<i>Concentration</i>	67
III.3.b	<i>Agrégation</i>	68
III.3.c	<i>Toxicité</i>	69
IV.	<i>Les complexes Métaux – Aβ</i>	69
IV.1	Sites de fixation et constantes de dissociation	70
IV.1.a	Cu^{II} -Aβ	71
IV.1.b	Zn^{II} -Aβ	72
IV.1.c	Fe^{II} -Aβ	72
IV.1.d	<i>Signification biologique de ces sites de fixation des métaux</i>	72
IV.2	Chimie de coordination	73
IV.2.a	Cu^{II} -Aβ	74
IV.2.b	Zn^{II} -Aβ	75
IV.2.c	Fe^{III} -Aβ	75
IV.2.d	<i>Autres métaux</i>	76
IV.2.e	<i>Dans les plaques amyloïdes</i>	76
IV.3	Agrégation	77
IV.4	Toxicité	77
V.	<i>Conclusion</i>	78
VI.	<i>Bibliographie</i>	81

Chapitre 2 : Caractérisation structurale et thermodynamique du complexe Cu^{II} -Aβ **95**

I.	<i>Nombre de sites de fixation et constantes d'affinités</i>	98
I.1	Vérification du nombre de sites de fixation	98
I.2	Constantes de fixation	100

I.2.a	<i>La titration calorimétrique isotherme (ITC)</i>	101
I.2.b	<i>La Fluorimétrie</i>	107
II.	<i>Les ligands mis en jeu</i>	112
II.1	La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)	113
II.1.a	<i>Site de forte affinité</i>	114
II.1.b	<i>Site de faible affinité</i>	115
II.2	Spectroscopie UV	116
II.3	La RMN	118
II.3.a	<i>RMN ¹H de Cu^{II}- Aβ16 à pH = 7,4</i>	119
II.3.b	<i>RMN ¹H de Cu^{II}- Aβ16 à pH = 6,5</i>	122
II.3.c	<i>RMN ¹H de Cu^{II}- Aβ28 à pH = 7,4</i>	122
II.3.d	<i>RMN 2D de Cu^{II}- Aβ28/40</i>	125
II.3.e	<i>RMN ¹H de Ni^{II}-Aβ16</i>	126
II.3.f	<i>Exclusion de la Tyrosine</i>	127
III.	<i>Ligand labile</i>	128
III.1	Le site de forte affinité	129
III.2	Le site de faible affinité	130
IV.	<i>Conclusion</i>	131
V.	<i>Bibliographie</i>	133

Chapitre 3 : Génération de radicaux hydroxyles par les complexes

Cu^{II}-Aβ	137	
I.	<i>Détection des radicaux hydroxyles</i>	142
I.1	Utilisation de la deferroxamine (ou desferral)	142
I.2	Détection en fluorescence	143
I.3	Détection des radicaux hydroxyles en RPE	144
II.	<i>Les résultats</i>	145
II.1	En Fluorescence	145
II.2	En RPE	152

III.	Potentiels d'oxydo-réduction des complexes cuivre-peptide	154
IV.	Inhibition des ROS	158
IV.1	Le Clioquinol	158
IV.2	La Métallothionéine -3 (MT-3)	159
IV.2.a	MT-3 et production de HO [•]	159
IV.2.b	MT-3 et A β	159
V.	Conclusion	164
VI.	Bibliographie	165

Chapitre 4 : Le processus d'agrégation **169**

I.	Effets des métaux sur l'agrégation	174
II.	Monomère, dimère, oligomère ?	177
II.1	Chromatographie d'exclusion stérique (CES)	178
II.1.a	A β _{16,28 et 40}	179
II.1.b	A β ₄₂	183
II.2	Gel d'électrophorèse	185
III.	Nature des agrégats	186
IV.	Conclusion	189
V.	Bibliographie	191

Chapitre 5 : Matériels et méthodes **193**

I.	Préparation des échantillons	195
I.1	Solutions de peptides	195
I.1.a	Peptides A β	195
I.1.b	Autres peptides	195
I.2	Solutions de métaux	196
I.3	Autres solutions	196
II.	Méthodes	199
II.1	Spectroscopie d'absorption UV-Visible	199
II.2	Spectroscopie de Fluorescence	199

II.3	Titration Calorimétrique Isotherme (ITC)	199
II.4	Spectres RPE	200
II.5	Spectres RMN	201
II.6	Spectroscopie de Luminescence	201
II.7	Mesures électrochimiques	202
II.8	Chromatographie d'exclusion stérique (CES)	202
II.9	Expériences d'agrégation	203
	II.9.a Quantification	203
	II.9.b Electrophorèse	204
III.	Bibliographie	206
	Conclusion générale et perspectives	207
	Annexes	213

Liste des abréviations

Unité de mesure

AtoM	atomolaire
M	molaire
mM	millimolaire
nM	nanomolaire
pM	picomolaire
μM	micromolaire
μg	microgramme
mg	milligramme
g	gramme
μl	microlitre
ml	millilitre
PM	poids moléculaire
kDa	kilodalton
K	kelvin
°C	degré Celcius
V	volt
A	ampère
s	seconde
h	heure

Peptides, protéines, acides aminés

Aβ	amyloïde-bêta
Ach	acétylcholine
AChE	acétylcholine estérase
ADDLs	"Aβ-derived diffusible ligands"
ADN	acide désoxyribonucléique
AICD	« APP intracellular domain »
Aph-1	« anterior-pharynx defective-1 »
ApoE	apolipoprotéine E
APP	« amyloid precursor protein »
Arg	arginine
ARN	acide ribonucléique
Asp	aspartate
ATP	adénosine triphosphate
ATP7A	ATPase alpha
ATP7B	ATPase beta
BACE	« beta site APP cleaving enzyme »
BSA	albumine de sérum bovin
BuChE	butylcholine estérase
CCO	cytochrome c oxydase

CCS	copper chaperon superoxide dismutase
Cdk5	kinase cycline dépendante 5
ChaT	choline acétyltransférase
C83	fragment C83 (possédant 83 acides aminés) de l'APP
C99	fragment C99 (possédant 99 acides aminés) de l'APP
COX1	cyclooxygénase de type 1
Gly	glycine
GSK-3	kinase glycogène synthase 3
hCtr1	"human Copper transporter"
His	histidine
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HSA	albumine de sérum humain
IDE	enzyme de dégradation de l'insuline
Leu	leucine
MAPs	« mitogen-activated proteins »
MPACs	« metal-protein attenuating compounds »
MTs	métallothionéines
MT-3	métallothionéine-3
NNOS	oxyde nitrique synthase neuronale
PKC	protéine kinase c
PS1	préséniline-1
PS2	préséniline-2
PTK1	« tau protein kinase 1 »
SOD	superoxyde dismutase
Trp	tryptophane
Tyr	tyrosine
Val	valine

Méthodes

AFM	microscope à force atomique
CES	chromatographie d'exclusion stérique
ESI-MS	"electrospray ionization mass spectroscopy"
ICP-MS	spectromètre de masse quadripolaire à source plasma « Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry »
IR	infra-rouge
IRM	imagerie par résonance magnétique
ITC	titration calorimétrique isotherme
LA-ICPMS	"Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry"
MEB	microscope à balayage électronique
RMN	résonance magnétique nucléaire
RPE	résonance paramagnétique électronique
TEP	tomographie à émission de positrons
UV/Vis	ultra-violet/visible

Divers :

azide	azoture de sodium
BC	bathocuproïne
BCA	acide bicinchonique

BP	bathophénanthroline
3-CCA	acide 3-coumarine carboxylique
CI ₅₀	concentration d'inhibition 50 %
CQ	clioquinol
DFO	deferroxamine, desferral
DO	densité optique
DTPA	acide diéthylènetriamine pentaacétique
ε	coefficient d'extinction molaire
EDTA	acide éthylènediamine tetraacétique
EGTA	acide (éthylènebis(oxyéthylènenitrilo)) tetraacétique ou acide éthylène glycol-bis (beta-aminoéthyléther)-N,N,N',N'-tetraacétique
FDA	« food and drug administration »
Hepes	{2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonic acid;
HNE	4-hydroxy-2-nonen-1-al
HNE	potentiel normal de l'électrode à hydrogène
K _a	constante d'association
K _d	constante de dissociation
MA	maladie d'Alzheimer
Mops	acide 3-(N-Morpholino)propanesulfonique
Mr	masse molaire
NSAIDs	anti-inflammatoires non-stéroïdiens
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
PHFs	paires hélicoïdales de filaments
POBN	α (4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butylnitron
R _h	rayon hydrodynamique
ROS	“Reactive oxygen species”
SDS	sodium deodecyl sulfate
TETA	triéthylènetetraamine
Th-T	thioflavine T
TMS	tetraméthylsilyl
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethane
Zincon	2-carboxy-2-hydroxy-5-(sulfoformazyl) benzène

**Maladie d'Alzheimer :
causes, mécanismes et stratégies thérapeutiques**

I. La maladie d'Alzheimer

I.1 Historique : une maladie déjà centenaire ...

A la fin du XIX^{ème} siècle, l'état de démence du sujet âgé était considéré par la grande majorité des psychiatres comme habituel et lié à l'usure normale du temps. Ce sont les travaux de l'école de Munich, autour de Kraepelin, un des deux psychiatres allemands à croire à l'intérêt de l'étude histologique du cerveau dans les maladies mentales, qui ont conduit à mieux comprendre ces maladies. Plusieurs médecins rejoignent alors son groupe dont Aloïs ALZHEIMER qui s'était initié à l'étude microscopique du cerveau.



Aloïs Alzheimer 1864-1915

C'est en 1906, lors d'une réunion de psychiatres allemands, à Tübingen que Alzheimer décrit l'observation d'une femme de 51 ans qui a présenté un délire de jalousie suivi d'une " désintégration " des fonctions intellectuelles. Grâce à des techniques de coloration, l'examen au microscope du cerveau de la patiente a révélé la présence, dans le cortex cérébral, de lésions analogues à celles de la démence sénile, **les plaques séniles**, associées à des lésions jusque-là inconnues, caractérisées par des amas anormaux de fibrilles dans les neurones, **les dégénérescences neurofibrillaires** (figure 1.1).

Peu de temps après ces observations, la communauté médicale de l'époque donna à cette nouvelle maladie le nom de son « découvreur », la maladie d'Alzheimer.

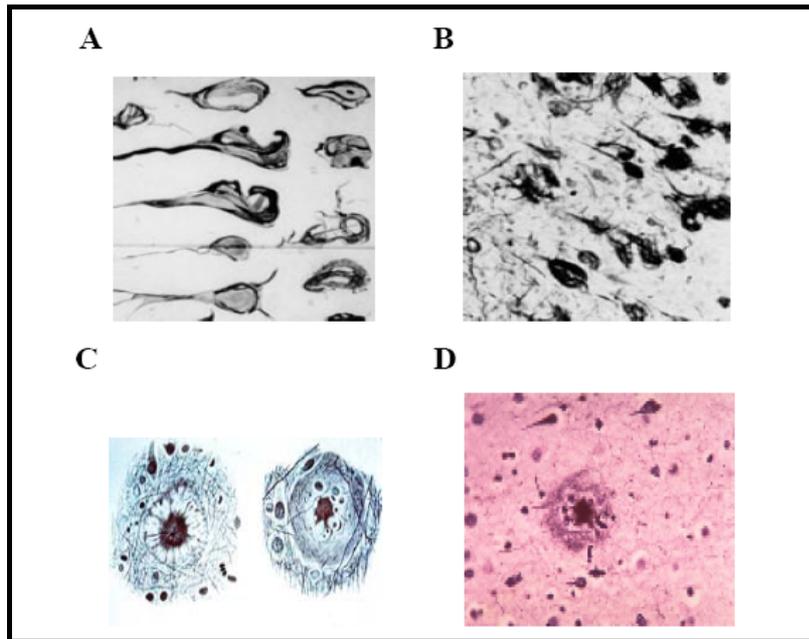


Figure 1.1. Les lésions neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer. *A) Schémas originaux des études histologiques du docteur Alois Alzheimer démontrant la présence de lésions (obscurcissement) intracellulaires (enchevêtrements). B) Enchevêtrements neurofibrillaires visualisés avec des nouvelles techniques de coloration et d'observation. C) Schémas originaux des études histologiques du docteur Alois Alzheimer démontrant la présence de corps circulaires à allure fibrillaire avec un noyau dense (plaques). D) Visualisation contemporaine, par technique de coloration au Rouge Congo (« Congo Red »), d'une plaque amyloïde (sénile). La région dense centrale (et sa périphérie) est principalement constituée de peptides A β 42 insolubles. (Images du site internet www.alzheimer-montpellier.org).*

Il faudra ensuite attendre le dernier tiers du XX^{ème} siècle pour voir les connaissances sur cette maladie évoluer sensiblement. La définition actuelle de la maladie d'Alzheimer diffère légèrement de sa description initiale. C'est une démence dégénérative du cerveau par opposition aux autres causes de démences (vasculaires, toxiques ou carencielles). Elle associe des troubles de la mémoire, des troubles cognitifs et/ou du comportement ayant un retentissement sur la vie quotidienne des patients. Elle est caractérisée par deux types de lésions cérébrales : plaques séniles et dégénérescences neurofibrillaires. C'est une maladie de personnes âgées qui peut aussi, mais plus rarement, survenir à un âge plus jeune. Mais c'est une seule et même maladie qui est présente dans tous les pays, tout au moins dans ceux où des études épidémiologiques ont été menées.

I.2 Impacts sociaux économiques

L'étude des maladies neurodégénératives montre que la maladie d'Alzheimer est la forme la plus commune de démence sénile. Actuellement, en France, elle touche environ 860 000 personnes. Elle se déclare le plus souvent chez les personnes âgées. Environ 11% de la population âgée de plus de 65 ans répondent aux critères diagnostiques validant une «maladie d'Alzheimer probable» en fonction d'échelles d'évaluation neuropsychologique (www.alzforum.com). Cependant, des formes précoces existent ; elles concernent 32 000 cas avant 60 ans et 10 000 cas avant 50 ans. Pour cette situation, il s'agit le plus souvent de cas liés à des mutations génétiques.

Au niveau mondial, elle affecte entre 12 et 15 millions d'individus dans le monde (Alzheimer International, www.alz.co.uk). Dans les pays occidentaux, elle constitue la quatrième cause de décès, précédée par les maladies cardiaques, le cancer et les accidents vasculaires cérébraux.

Au delà de 85 ans, la prévalence s'accroît de manière exponentielle pour atteindre une proportion de 35% de sujets atteints. L'incidence s'élève actuellement à 225 000 nouveaux cas par an en France et va encore augmenter avec le vieillissement de la population.

Les perspectives pour les années à venir sont inquiétantes. Si rien ne vient enrayer cette tendance, les statistiques estiment qu'il y aura environ 1 200 000 cas en 2020 et environ 2 100 000 cas (soit 3 malades pour 100 habitants) en 2050. En effet, avec l'augmentation et le vieillissement de la population, aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement, le nombre de cas de maladie d'Alzheimer va continuer à s'accroître. Les bilans démographiques annuels ont montré, dès les années 1920, une forte augmentation de la natalité et une baisse importante de la mortalité néonatale et infantile. Ces données, associées à une augmentation importante de l'espérance de vie, promettent un avenir explosif aux problèmes du vieillissement. En 1966, le pourcentage de la population âgée de plus de 60 ans était de 17,6% et de 3% pour celle de plus de 80 ans (Données Insee). En 2015, le pourcentage de la population âgée de plus de 60 ans sera alors de 25%, et celui de plus de 80 ans sera de 6%.

Ce phénomène de vieillissement de la population n'est pas propre à la France. Ainsi, d'après l'OMS, le nombre de personnes de plus de 60 ans atteignait 600 millions en 2001, et les prévisions annoncent 1,2 milliards en 2025 et 2 milliards en 2050. En

Europe, l'une des régions du monde où la tendance au vieillissement est la plus marquée, la proportion des plus de 60 ans devrait passer de 20 à 35 % d'ici 2050 (Organisation Mondiale de la Santé, www.who.int/fr).

Tranches d'âge	1966	1993	2005	2015
0-19 ans	34,2%	26,8%	25,1%	23,4%
20-59 ans	48,2%	53,5%	54,2%	51,6%
60 ans et plus	17,6%	19,7%	20,8%	25,0%

Tableau 1.1. Evolution de la population française (INSEE 2005)

Dramatique pour le malade, cette maladie afflige également tout l'environnement familial, le plongeant dans la détresse morale, l'épuisement et une solitude extrême, surtout dans les phases tardives où le malade nécessite une surveillance 24 heures sur 24. A ces épreuves s'ajoutent des frais notamment de tierce personne à domicile, de protection sanitaire et d'hébergement. Le coût moyen annuel de la prise en charge d'un malade est estimé à 22 000 euros. Cela représente un budget de 10 milliards d'euros par an pour la France (pour moitié pris en charge par l'état et moitié pour les familles) pour cette démence. Ces dépenses représentent actuellement 0.6% du PIB mais passeront à 0.8% dès 2020 et atteindront 1.8% en 2040. A ce coût direct, qu'il soit médical (consultations, hospitalisations, médicaments, examens complémentaires) ou non médical (transports, institutions spécialisées, habitations adaptées au handicap, aides sociales diverses) doit être ajouté le coût indirect plus difficilement évaluable (perte de productivité de l'entourage suite au handicap du patient).

Cette maladie est devenue un problème majeur de santé publique et un véritable fléau social. La société toute entière est donc sollicitée, et la construction de structures d'accueil adaptées devient indispensable. La démence de type Alzheimer affectant au moins une personne sur 20 à l'âge de la retraite et au moins un octogénaire sur 4, l'évolution démographique promet à cette affection une prévalence importante. Il semble important d'investir au niveau de la recherche, pour trouver rapidement de médicaments efficaces. La maladie d'Alzheimer constitue un enjeu majeur pour les laboratoires de recherches de l'industrie pharmaceutique.

I.3 Origines et facteurs de risque de la maladie

Les plaques séniles et la dégénérescence des neurofibrilles ont été considérées dès le début comme les lésions cérébrales étroitement liées à la maladie. Cependant à ce jour, les causes exactes de l'apparition de ces lésions demeurent encore inconnues. En quête de réponses, les chercheurs étudient les facteurs qui semblent avoir une influence quelconque sur la progression de la maladie. Ce sont les «facteurs de risque».

I.3.a Facteurs génétiques

Dans environ 5 % des cas, la maladie d'Alzheimer est liée à un facteur héréditaire et se déclenche précocement, avant 60 ans. Cette forme de maladie est appelée "maladie d'Alzheimer familiale". A ce jour, plus de 150 mutations sur trois gènes ont été identifiées et sont responsables de la transmission génétique de la maladie. Les trois gènes susceptibles de porter ces mutations sont : (i) un gène du chromosome 21 codant pour la protéine APP (Amyloid Precursor Protein), précurseur du peptide β -amyloïde ($A\beta$) impliqué dans la maladie, (ii) deux gènes situés sur les chromosomes 14 et 1, codant respectivement pour les protéines présénilines 1 et 2 (ces protéines s'associent aux γ -sécrétases pour conduire à la génération de $A\beta$ à partir de l'APP). C'est ainsi que la plupart des personnes atteintes du syndrome de Down (trisomie 21) expriment 1,5 fois plus d'APP que les individus sains et souffrent de démence de type Alzheimer dès l'âge de 40 ans (Selkoe, 2001).

Pour les formes de la maladie apparaissant au-delà de 60 ans, appelées "formes sporadiques", il existe également des facteurs de susceptibilité génétique.

Ainsi, il semble que des variations du gène APOE (sur le chromosome 19), codant pour la production de l'apolipoprotéine E (ApoE) impliquée dans le transport du cholestérol, puissent constituer un facteur de risque important. Ce gène possède trois variants alléliques : APOE2, APOE3 et APOE4. Les personnes possédant deux copies de APOE4 ont un risque plus élevé que la moyenne de développer la maladie d'Alzheimer, tandis que les porteurs de APOE2 ont un risque plus faible comparé à l'ensemble de la population (Corder *et al.*, 1993).

Par ailleurs, un gène du chromosome 12 codant pour l' α_2 -macroglobuline, impliquée dans la dégradation de A β , ainsi qu'un locus sur le chromosome 10 ont été identifiés comme des facteurs de risque (Selkoe, 2001).

I.3.b Facteurs biologiques et environnementaux

Les 90 à 95% des cas de la maladie restants sont sporadiques, sans antécédents familiaux et à étiologie inconnue (Rocchi *et al.*, 2003). Comme dans le cas des autres maladies liées à l'âge (maladies cardiovasculaires, diabète, maladie de Parkinson, ...), il existe aussi des facteurs biologiques, comportementaux ou d'autres facteurs liés à l'environnement qui peuvent augmenter le risque de développer la maladie d'Alzheimer.

Age et sexe :

L'âge est un important facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer. En effet, la prédominance de la pathologie double tous les 5 ans après 65 ans (Ling *et al.*, 2003). Toutefois, contrairement à la croyance populaire, la démence de type Alzheimer n'est pas un processus normal de vieillissement.

L'affection touche plus les femmes que les hommes puisqu'au delà de 75 ans, les proportions sont de 13,2% pour les hommes et de 20,5% pour les femmes. (Andersen *et al.*, 1999), la première cause étant leur plus longue espérance de vie. D'autres facteurs ont également été évoqués pour expliquer cette observation : la diminution des taux d'œstrogènes suite à la ménopause mais également une dérégulation des systèmes de transport des métaux plus importante chez les femmes pourraient favoriser le développement de la maladie (Henderson, 1997).

Carences alimentaires :

Chez les personnes atteintes de la maladie, il semble acquis que la production de radicaux libres à proximité des neurones soit supérieure à la normale, conduisant ainsi à leur mort. Les carences nutritionnelles des personnes âgées, limitant les apports en vitamines (notamment C et E), pourraient être considérées comme des facteurs aggravants. Des études épidémiologiques ont montré que l'utilisation de compléments vitaminés dans l'alimentation pouvait réduire le risque de développer la maladie d'Alzheimer (Zandi *et al.*, 2004).

Cholestérol :

Le cholestérol est un constituant essentiel des membranes cellulaires, et joue un rôle fondamental dans le développement, le maintien de la plasticité et le fonctionnement des neurones (Shobab *et al.*, 2005). Son transport est altéré dans le cas de la maladie d'Alzheimer. Il y aurait donc une relation entre cholestérol et la maladie d'Alzheimer.

Des études épidémiologiques ont montré qu'un niveau élevé de cholestérol pouvait être corrélé avec un risque plus élevé de développement de la maladie d'Alzheimer (Kivipelto *et al.*, 2001). Chez des souris transgéniques nourries selon un régime riche en cholestérol, le nombre de plaques amyloïdes est nettement plus élevé que chez les souris de contrôle (Refolo *et al.*, 2000).

De plus, un traitement par des statines (inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol prescrits aux personnes présentant des taux plasmatiques de cholestérol trop élevé) réduit fortement les taux de A β 40 et A β 42 intracellulaires et sécrétés *in vitro* (cultures neuronales). Leur utilisation pourrait réduire considérablement le risque d'Alzheimer (Jick *et al.*, 2000; Wolozin *et al.*, 2000)

I.3.c Implication des métaux dans la maladie d'Alzheimer

Parmi tous les facteurs biologiques en relation avec la maladie d'Alzheimer, les métaux tiennent une place essentielle. A ce stade disons simplement qu'ils sont impliqués dans de nombreuses autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la maladie de Creutzfeldt-Jacob, la maladie de Wilson, la sclérose latérale amyotrophique ou la maladie du prion. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, de nombreuses études ont montré que le métabolisme des ions métalliques est altéré. Les concentrations de cuivre, de zinc et de fer sont plus élevées que la normale, et plus particulièrement dans les lésions caractéristiques de la maladie (plaques amyloïdes) et à proximité de celles-ci. (Atwood *et al.*, 1999; Lovell *et al.*, 1998).

Les métaux jouent donc certainement un rôle non négligeable dans la Maladie d'Alzheimer. L'intérêt pour l'étude des ions métalliques en relation avec la pathologie est donc croissant. Il est d'ailleurs au coeur de notre sujet et fera l'objet d'une partie détaillée à lui seul (chapitre 1, partie V).

I.4 Le diagnostic

Poser le diagnostic, c'est offrir au malade l'accès aux premières possibilités thérapeutiques. C'est aussi permettre à la famille de s'organiser pour s'adapter à l'évolution. Pendant longtemps, l'absence de diagnostic fiable a constitué un problème. Une fois le diagnostic établi, l'espérance de vie peut atteindre 20 ans, même si la durée moyenne de survie se situe autour de 8,5 ans.

De nombreux progrès ont été réalisés dans ce domaine. A l'heure actuelle, il repose sur la combinaison de signes cliniques, de tests neuropsychologiques et de techniques d'imagerie cérébrale (IRM, tomographie à émission de positrons (TEP)). Cependant, aucune de ces techniques n'est capable de déceler les troubles ou les lésions à des stades précoces. Aujourd'hui encore, le seul diagnostic définitif ne peut être établi que lors d'un examen *post mortem*.

I.4.a Les manifestations cliniques

L'aggravation des troubles liés à la maladie est progressive et inexorable. Elle s'étend sur plusieurs années (figure 1.2). L'étape asymptotique passe inaperçue car elle ne s'accompagne d'aucun signe clinique manifeste. Elle peut évoluer sur de nombreuses années. Mais l'étape de pré-maladie, qui dure en moyenne 3 à 4 ans, fait apparaître les premières manifestations cliniques de la maladie d'Alzheimer que sont les troubles de la mémoire épisodique, liés à une incapacité de retenir des informations récentes; les faits anciens restant en mémoire jusqu'à un stade avancé de la maladie. Cependant, ces troubles sont compensés par la personne elle-même et l'aide de l'entourage car les autres fonctions intellectuelles sont globalement préservées et le retentissement sur la vie quotidienne est peu important.

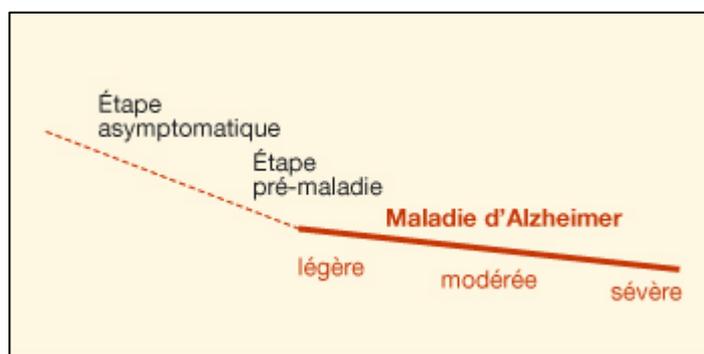


Figure 1.2. Evolution des symptômes de la Maladie d'Alzheimer

Mais à ces premiers signes cliniques, les plus classiques et les plus évocateurs, vont s'ajouter ensuite des troubles du langage, de la motricité et de la reconnaissance (des objets, des lieux et des sons), facteurs de désorientation. La maladie conduit à une perte de cohérence dans le discours et une incompréhensibilité de l'expression écrite, ainsi qu'à des détériorations dans d'autres domaines cognitifs interférant avec l'humeur, la raison ou le jugement. Il en découle une altération de la personnalité, des troubles neurologiques (aphasie, crises épileptiques) et une démence forte. Au stade final, même les tâches simples comme le maintien de l'hygiène ne peuvent plus être accomplies et le patient devient totalement dépendant. En plus de l'attention de tous les instants que nécessite l'état du patient, l'agitation et des comportements délirants compliquent la prise en charge du malade par son entourage. Cela rend la phase terminale de la maladie particulièrement difficile pour le patient et son entourage et nécessite, le plus souvent, un placement dans un établissement spécialisé.

Les troubles de la mémoire sont constants et s'associent de façon variable aux autres signes ce qui explique la grande variété des tableaux cliniques même à une phase avancée de la maladie. Le trouble de la mémoire est en outre le signe le plus précoce ce qui explique les difficultés du diagnostic précoce devant un " trou de mémoire ", somme toute banal et fréquent. Devant un tel signe isolé, seul le recours à des consultations spécialisées pour les troubles de la mémoire où l'on recherchera des signes non apparents, permettra le diagnostic. C'est là que les tests neuropsychologiques prennent toute leur place.

I.4.b Les tests neuropsychologiques

Ils sont basés sur des grilles standardisées permettant une analyse de la mémoire par une approche qualitative et quantitative. Leur réalisation peut prendre jusqu'à une heure. Ils doivent être pratiqués par des personnels entraînés et spécialisés que sont les neuropsychologues.

Le diagnostic de maladie d'Alzheimer est aussi un diagnostic d'exclusion au sens où il faut éliminer d'autres affections qui réalisent des tableaux proches et qui seraient susceptibles de bénéficier de traitements spécifiques (tumeurs, hématome ou accident vasculaire cérébral).

I.4.c L'imagerie cérébrale

Au niveau histologique, des études montrent la présence de lésions cérébrales (plaques amyloïdes et neurofibrilles) et la perte de neurones, dans un premier temps dans la partie la plus interne du lobe temporal du cerveau (cortex entorhinal et hippocampe), région vers laquelle convergent les informations pour être mises en mémoire. Les lésions se développent ensuite vers les lobes pariétaux, occipitaux et frontaux, pour envahir presque tout le cerveau, sans toutefois atteindre les centres de commande de la motricité.

En plus de ces lésions, le cerveau des malades présente d'autres altérations neuropathologiques (Figure 1.3) incluant l'atrophie du cerveau, la perte de synapses, la réduction sélective de certains systèmes de neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, une diminution du métabolisme énergétique et un niveau élevé d'inflammation (Mattson, 2004).

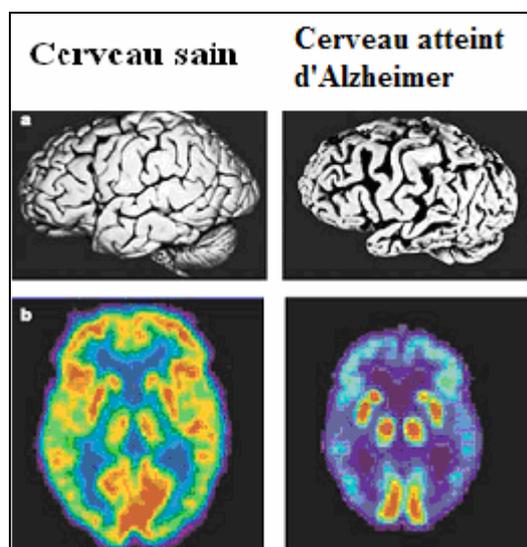


Figure 1.3. Comparaison de cerveaux de personnes saines et d'individus atteints de la maladie d'Alzheimer (d'après (Mattson, 2004)). (a) Volume global du cerveau (rétrécissement marqué du lobe temporal (partie basse) et des lobes frontaux (partie gauche)). (b) Imagerie TEP révélant le glucose : le patient atteint d'Alzheimer montre une forte diminution du métabolisme énergétique dans le cortex frontal (haut du cerveau) et dans les lobes temporaux (sur les cotés).

L'imagerie (scanner cérébral et résonance magnétique) contribue non seulement au diagnostic différentiel mais, dans des mains expertes, elle peut apporter des arguments diagnostiques de poids tels les images d'atrophie de l'amygdale hippocampique, caractéristique de la maladie d'Alzheimer. En outre, les techniques les plus récentes d'imagerie fonctionnelle permettent de mettre en évidence dans le cerveau des zones atrophiées et non fonctionnelles qui plaident en faveur du diagnostic de la maladie d'Alzheimer. L'utilisation de l'imagerie pour la détection précoce de la maladie n'en est

cependant qu'au stade de recherche. Il n'y a pas encore d'analyse de routine pour la détection de la maladie d'Alzheimer.

Par ailleurs, il n'existe pas actuellement de marqueurs permettant un diagnostic précoce en visualisant les plaques amyloïdes elle-même par TEP ou par IRM. Cela fait cruellement défaut. La mise au point et le développement de tels composés est d'ailleurs l'un des principaux défis dans le cadre de la lutte contre la maladie.

II. Plaques amyloïdes et neurofibrilles

Dès 1906, Alois Alzheimer, avait caractérisé deux principaux types de lésions cérébrales qui sont toujours considérées aujourd'hui comme le diagnostic définitif de la maladie : des enchevêtrements intra neuronaux de neurofibrilles intracellulaires (ou neurodégénérescence neurofibrillaire) et les plaques séniles extracellulaires accumulées principalement dans le cortex (figure 1.4) (Selkoe, 2001). Ces plaques sont principalement constituées d'un peptide, le peptide amyloïde ($A\beta$), sous forme agrégé.

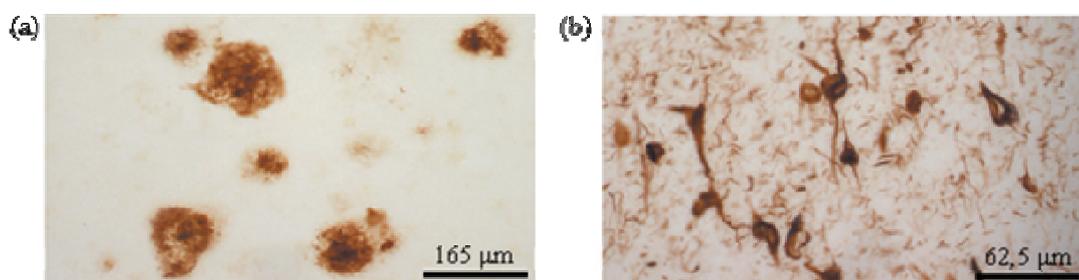


Figure 1.4. Plaques et enchevêtrements dans un cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer post-mortem (d'après (LaFerla et Oddo, 2005). (a) Microphotographie de plaques amyloïdes marquées par des anticorps spécifiques anti- $A\beta_{42}$. (b) Microphotographie de neurofibrilles marquées par des anticorps spécifiques anti-PHF1.

La principale hypothèse du développement de la maladie, expliquant le passage de l' $A\beta$ soluble aux plaques séniles, appelée cascade amyloïde, est la suivante (figure 1.5). Le peptide $A\beta$, composant des plaques amyloïdes de la maladie d'Alzheimer, est un peptide de 39 à 43 acides aminés (4 kDa) issu de la protéolyse de la protéine APP (de l'anglais "Amyloid Precursor Protein") par deux enzymes la bêta et la gamma sécrétase (figure 1.8). Il est présent dans tous les cerveaux sains sous forme soluble. Cependant son

accumulation conduit, dans un premiers temps, à la formation d'oligomères puis des plaques. Les plaques ne sont présentes que dans les cerveaux de patients de la maladie. L'agrégation de ce peptide est donc une étape clé. Cette partie décrit le rôle joué par chacun des composants intervenant dans le processus permettant le passage de l'APP, à l'origine de l'A β jusqu'à l'agrégation de celui-ci.

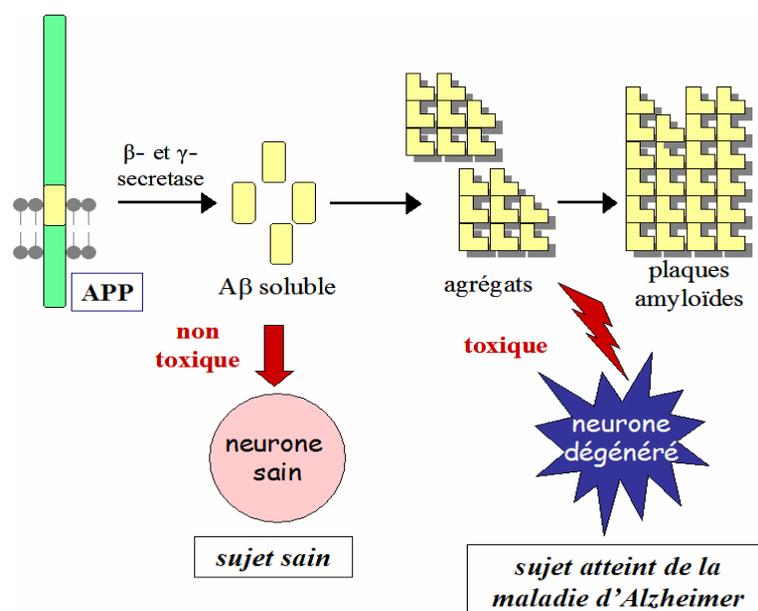


Figure 1.5. *Principale hypothèse concernant le développement de la Maladie d'Alzheimer.*

II.1 Le peptide β -amyloïde et son implication dans les plaques amyloïdes

Les plaques séniles sont des lésions extracellulaires, sous la forme d'agrégats sphériques denses de protéines organisées en fibrilles. Le peptide β -amyloïde (A β) en est le composant principal. Ces lésions sont présentes principalement dans les régions limbiques du cerveau telles que l'hippocampe et le complexe amygdalien, ainsi que dans des régions corticales et subcorticales spécifiques.

Il est important de noter que des agrégats de type amyloïde impliquant d'autres protéines se retrouvent également dans des maladies aussi différentes que le diabète de type 2, la maladie de Huntington ou les maladies liées aux prions. De plus, il existe différents types de plaques comme le montre la figure 1.6. Seules les plaques ou les agrégats organisés en type fibres seraient toxiques (Morgan *et al.*, 2004 ; Walsh *et al.*, 1999).

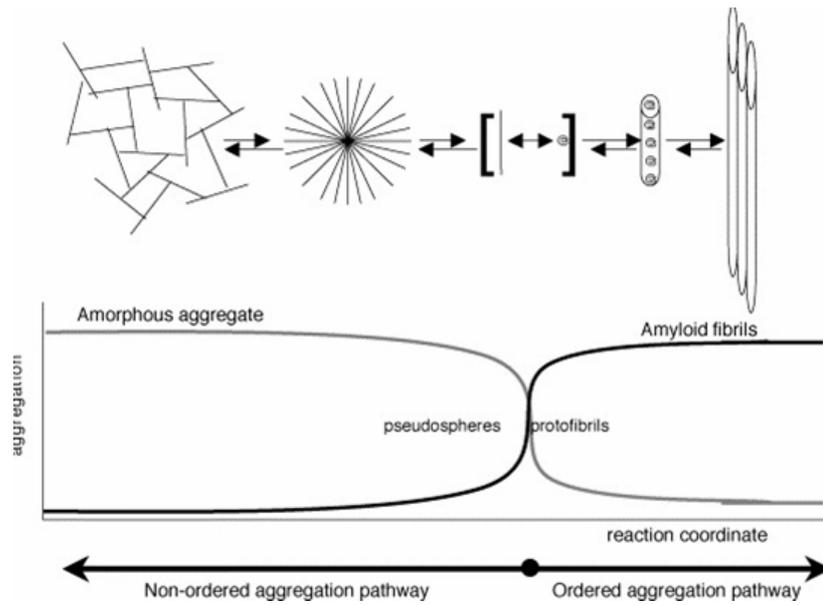


Figure 1.6. *Agrégats amorphes et fibres* (Morgan *et al.*, 2004)

II.1.a La protéine APP

Le gène des protéines APP est situé sur le chromosome 21 et code pour plusieurs glycoprotéines transmembranaires (3 isoformes principales) ayant une longue partie N-terminale située dans la partie extracellulaire, une partie transmembranaire (acides aminés 597 à 639 pour l'isoforme en contenant 695) et une courte région C-terminale située dans le cytoplasme. Le nombre d'acides aminés de ces protéines est variable (entre 695 et 770). Elles sont exprimées dans tous les tissus, mais les neurones expriment plus particulièrement la protéine APP₆₉₅ que l'on trouve en forte quantité dans le cerveau (Clippingdale *et al.*, 2001).

Rôle de l'APP

Le rôle de ces protéines n'est quasiment pas connu. Plusieurs rôles ont été proposés. Une hypothèse fréquemment rencontrée dans la littérature est leur implication dans la régulation de l'homéostasie du cuivre dans les neurones (Maynard *et al.*, 2002; White *et al.*, 1999).

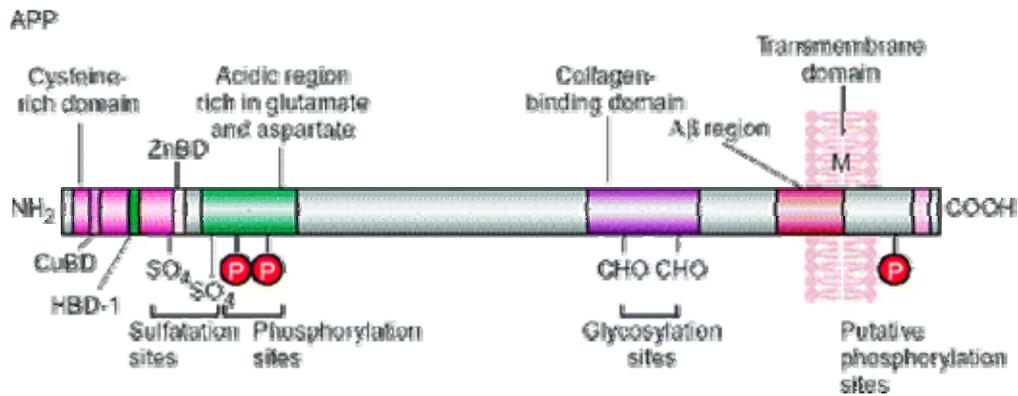


Figure 1.7. Régions fonctionnelles de l'APP (Checler et Vincent, 2002) CuBD : domaine de fixation du cuivre, ZnBD : site de fixation du zinc. HBD : site de fixation de l'héparine.

Cuivre et APP

L'APP fixe le cuivre, dans une région différente de l'Aβ, avec une constante de dissociation $K_D = 10$ nM (Hesse *et al.*, 1994). Des études RMN mettent par ailleurs en évidence le rôle des His¹⁴⁷ et His¹⁵¹, de la Tyr¹⁶⁸ et de la Met¹⁷⁰ dans une sphère de coordination tétraédrique pouvant favoriser la coordination du Cu^I (Barnham *et al.*, 2003; Multhaup *et al.*, 1996). Les 6 cystéines du domaine sont impliquées dans 3 ponts disulfides Cys¹³³-Cys¹⁸⁷, Cys¹⁴⁴-Cys¹⁷⁴, Cys¹⁵⁸-Cys¹⁸⁶.

Il a été également reporté que l'APP était capable de réduire le Cu^{II} en Cu^I par les thiols des cystéines, qui forment des ponts disulfides (Multhaup *et al.*, 1996). Il semble que l'APP existe sous au moins deux états d'oxydation, avec ces cystéines partiellement ou complètement oxydées. Dans chaque cas, il est quand même capable de lier le cuivre(II) et de le réduire.

Zinc et APP

Bush *et al.*, 1993 ont montré que l'APP est capable de lier le Zn^{II} assez fortement avec une constante de dissociation de 765 nM. Les Cys en position 186 et 187 sont indispensables pour la liaison du Zn^{II}. Des études complémentaires sur un peptide modèle (Ciuculescu *et al.*, 2005) ont démontré que le Zn pourrait induire la dimérisation de l'APP in vivo. Ceci pourrait être important pour la fonction de l'APP ou influencer la production d'Aβ.

De l'APP à l'A β

La protéine APP est métabolisée via deux voies biologiques : la voie non-amyloïdogénique (qui ne produit pas de peptides amyloïdes) et la voie amyloïdogénique. Ces deux voies se distinguent par les enzymes de clivage et par les métabolites (fragments) produits.

Ces protéines APP sont dégradées par des protéases appelées sécrétases (figure 1.8) (Selkoe, 2001). L'APP est coupée dans un premier temps par l' α - ou la β -sécrétase. Dans la voie non amyloïde, l' α -sécrétase coupe près du domaine transmembranaire, au milieu de la région A β de l'APP, pour générer un large ectodomaine soluble (α -APP_s) et laisser un fragment de 83 acides aminés (C83) dans la membrane. La voie amyloïdogénique fait intervenir la β -sécrétase, qui coupe plus loin de la membrane, produisant l'ectodomaine soluble β -APP_s et un fragment C-terminal de 99 résidus (C99) contenant le peptide A β en partie N-terminale. C83 et C99 sont tous deux substrats d'une troisième protéase, la γ -sécrétase. Cette enzyme est constituée d'un complexe multi-protéique, comprenant la préséniline, la nicastrine, Aph-1 et Pen-2 (De Strooper, 2003) et catalyse une hydrolyse inhabituelle au sein de la région transmembranaire. La protéolyse de C99 par la γ -sécrétase produit le peptide A β , alors que C83 est clivée pour donner p3, une forme de A β tronquée au niveau de la partie N-terminale (A β 17–40/42). Dans les deux cas, le fragment AICD (domaine intracellulaire de l'APP) est libéré. Bien que la fonction de l'ensemble de ces fragments ne soit pas précisément établie, il a été suggéré que le domaine AICD jouait un rôle dans la transmission des signaux de la membrane vers le noyau (signalisation cellulaire).

Le fragment A β contient de 39 à 43 acides aminés. Les formes les plus abondantes sont celles avec 40 et 42 acides aminés (A β 40 et A β 42). Ces deux formes jouent un rôle important dans la maladie d'Alzheimer mais l'A β 42 est considéré comme le plus neurotoxique par sa propriété hautement insoluble et oligomérisante (Jarett *et al.*, 1993).

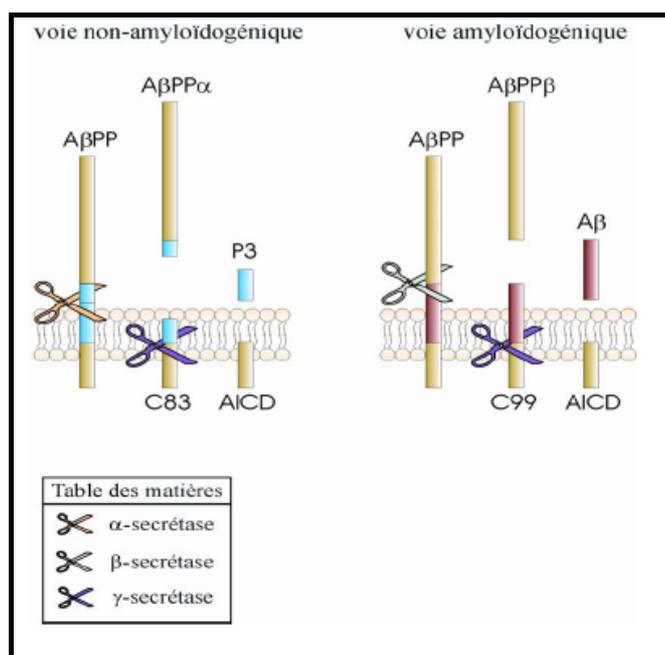


Figure 1.8. Métabolisme de la protéine APP et génération des peptides Aβ (d'après Citron, 2004a).

Les cas d'Alzheimer génétiques sont dus à une protéolyse altérée de l'APP conduisant à une surproduction de Aβ, que ce soit chez les souris transgéniques ou chez l'homme. En effet, les mutations mises en cause sur le gène codant pour APP favorisent les voies β- et γ-sécrétases, tandis que les mutations des gènes codant pour les présénilines PS1 et PS2 accentuent l'activité γ-sécrétase (Hardy, 1997; Selkoe, 2001).

Dans les cas sporadiques, les modifications du métabolisme de l'APP (notamment l'augmentation de l'activité de la β-sécrétase) conduisant à la surproduction de Aβ peuvent être dues à des augmentations de stress oxydant, une diminution du métabolisme énergétique ou une perturbation de l'homéostasie des métaux.

Le cholestérol influence les taux de Aβ via l'activité des sécrétases impliquées dans le métabolisme de l'APP, en dirigeant celles-ci vers la voie amyloïdogénique. L'Aβ est issu du clivage de l'APP. Or celui-ci peut être clivé par les sécrétases α et β, mais seul le clivage par la β-sécrétase peut ensuite donner de l'Aβ (figure 1.8).

L'activité des sécrétases α et β qui sont en compétition pour le même pool d'APP, semblent modulées par le cholestérol. Des études sur cultures cellulaires ou sur des souris transgéniques montrent que des environnements riches en cholestérol réduisent la voie α-sécrétase lors de la protéolyse de l'APP, conduisant ainsi à un taux élevé de Aβ (Bodovitz et Klein, 1996; Refolo *et al.*, 2000). A l'opposé, une diminution des taux de cholestérol

(via des agents réalisant l'extraction du cholestérol ou des statines) a pour conséquence une augmentation de la voie de l' α -sécrétase et une diminution de la sécrétion de A β (Kojro *et al.*, 2001), ou une diminution de la voie de la β -sécrétase (Simons *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'élimination du cholestérol dans les membranes inhibe l'activité de la γ -sécrétase de façon totale mais réversible (Wahrle *et al.*, 2002).

Le mécanisme d'action n'est pas encore totalement compris, mais il est possible que la modification de la fluidité des membranes en fonction des taux de cholestérol (une diminution du taux de cholestérol augmente la fluidité de la membrane) affecte les sécrétases associées à celles-ci en favorisant (ou en défavorisant) le contact entre les enzymes et leur substrat APP, ou en modifiant l'activité intrinsèque des enzymes, notamment dans le cas de la γ -sécrétase dont le site actif se situe au sein de la membrane (Bodovitz et Klein, 1996; Wahrle *et al.*, 2002).

II.1.b Le peptide β -amyloïde (A β)

Le peptide A β est produit à partir de l'APP via les voies β - puis γ -sécrétases. Le clivage par cette seconde enzyme est hétérogène. Il conduit principalement à un peptide A β de 40 acides aminés noté A β 40. Cependant, d'autres formes plus courtes ou plus longues sont également produites (entre 39 et 43 acides aminés), en particulier la forme A β 42 (figure 1.9), qui représente environ 10 % des espèces de A β . Les deux peptides A β 40 (majoritaire) et A β 42 (minoritaire) sont présents en tant qu'espèces solubles dans les fluides biologiques de tous les individus. Cependant une augmentation de la production d'A β 42 et de son accumulation conduit à des dépôts amyloïdes dans le cerveau des malades d'Alzheimer (Iwatsubo *et al.*, 1994). C'est le constituant principal des plaques séniles. Il est supposé jouer un rôle plus important que A β 40 dans la pathologie.

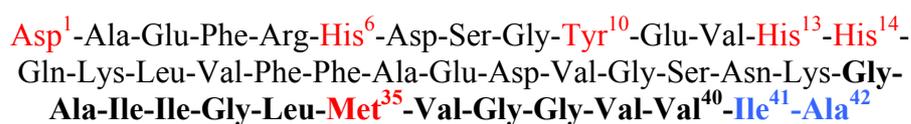


Figure 1.9. Séquence du peptide A β 42, écrite du N-terminal vers le C-terminal. La partie en gras correspond au domaine intramembranaire (d'après (Clippingdale *et al.*, 2001)). Les acides aminés en bleu soulignent la différence entre A β 40 et A β 42, ceux en rouge ont été évoqués comme impliqués dans la chélation des ions métalliques et/ou dans la production de ROS.

L'accumulation du peptide A β dépend de la balance entre sa production et sa dégradation. En plus de sa surproduction lors de la maladie d'Alzheimer, il semblerait que sa dégradation par des peptidases « spécifiques » soit elle aussi altérée. Ainsi, la variabilité génétique concernant la protéine α_2 -macroglobuline ou encore une diminution de l'activité de la néprilysine dans l'hippocampe suite au vieillissement, ces deux protéines étant impliquées dans la dégradation de A β , favorisent son accumulation (Iwata *et al.*, 2002; Selkoe, 2001). L'IDE (Insulin Degrading Enzyme), qui intervient dans son élimination, semble elle aussi avoir une activité réduite chez les patients d'Alzheimer.

Les mutations des gènes codant pour l'APP et la PS1 augmentent non seulement la production et la sécrétion de A β mais favorisent également l'espèce A β 42 parmi les différentes formes de A β (Hardy, 1997; Selkoe, 2001). Cela explique en partie les cas génétiques de la maladie.

Oligomérisation :

Les peptides A β ont tendance à agréger. C'est ainsi que la majorité du A β dans le cerveau des patients d'Alzheimer est agrégé sous forme de fibrilles qui elles-mêmes ont tendance à former les plaques amyloïdes en présence d'autres éléments (métaux, protéines, ...) (Clippingdale *et al.*, 2001).

Le peptide A β 42 est plus hydrophobe que ses analogues plus courts. Sa solubilité est par conséquent plus faible, et sa capacité à s'agréger très forte (environ 70 fois plus rapide que A β 40). Ce phénomène d'agrégation dépend non seulement de la nature de A β (40/42), mais aussi du temps, du solvant, du pH, de la concentration en peptide ou encore de la présence d'ions métalliques (Atwood *et al.*, 1998; Bitan *et al.*, 2003; Clippingdale *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 1997; Jarrett *et al.*, 1993).

La capacité d'A β à former des structures organisées (fibrilles) est principalement gouvernée par des interactions hydrophobes, et peut être directement corrélée à la proportion de structures secondaires en feuillets- β adoptée par le peptide. En effet, une étape clé dans l'agrégation d'A β est le passage d'une structure secondaire composée principalement « random coil » pour le monomère natif à une structure en feuillets- β , éventuellement via un intermédiaire contenant des portions en hélice- α (Clements *et al.*, 1996; Soto *et al.*, 1995). Ces structures en feuillets- β tendent ensuite à former des

oligomères de type protofibrille par des interactions entre les différents feuillets- β qui s'associent par la suite en fibrilles "torsadées" (Clippingdale *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 1997). D'autres intermédiaires favorisant la formation d'hélice- α (Walsh *et al.*, 1999) ont également été trouvés.

Des études cinétiques ont par ailleurs indiqué que la fibrillation comporte deux étapes : une étape lente de nucléation suivie d'une étape rapide de polymérisation (Jarrett *et al.*, 1993). Il a été montré *in vitro* que ces deux étapes sont plus rapides dans le cas de A β 42 que d'A β 40. Un mécanisme proposé passe par la formation de paranuclei pentamériques ou hexamériques de A β 42 qui s'associent ensuite entre eux pour former des protofibrilles puis des fibrilles (Bitan *et al.*, 2003).

Une étude récente couplant la RMN, la RMN du solide et des études de mutagenèse a pu mettre en évidence ces structures tridimensionnelles pour A β 42 agrégé sous forme de fibrilles (figure 1.10), avec les résidus 1-17 désordonnés et les résidus 18-42 formant deux brins β . Cette étude souligne entre autres la nature intermoléculaire des interactions entre les feuillets- β parallèles, ainsi qu'une interaction ionique intermoléculaire forte entre les résidus Lys²⁸ et Asp²³ de deux peptides (figure 1.10, A et B) (Lührs *et al.*, 2005).

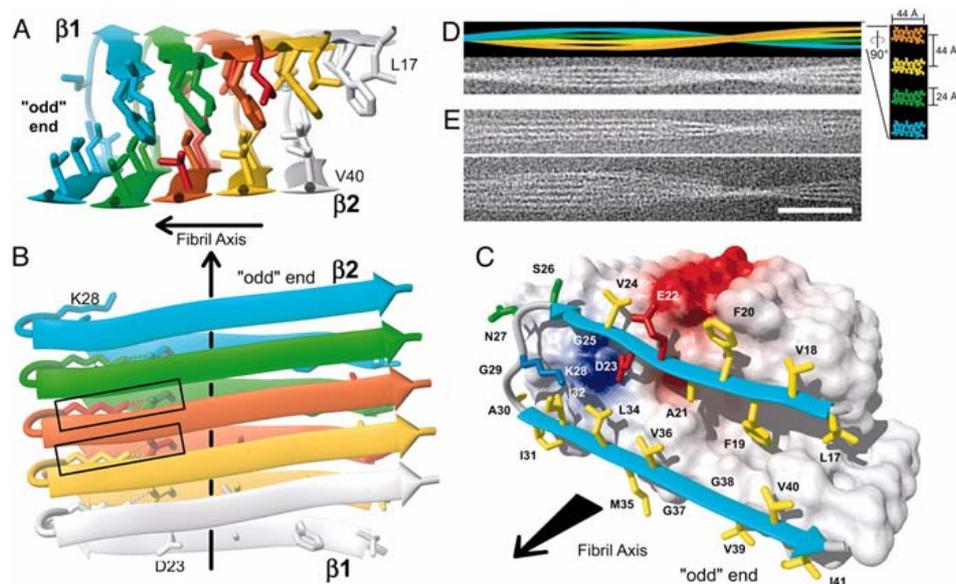


Figure 1.10. Structure tridimensionnelle d'une fibrille de A β 42 (oxydé sur Met35) d'après (Lührs *et al.*, 2005). La direction de l'axe de la fibrille est indiquée par les flèches. (A et B) Structure en rubans des résidus 17-42 illustrant la nature intermoléculaire des interactions entre les feuillets β . (C) Polarité de la surface de van der Waals (code couleur des résidus : jaune : hydrophobe, vert : polaire, rouge : chargé négativement et bleu : chargé positivement). (D) Simulation d'une fibrille constituée de 4 protofibrilles. (E) Exemples de micrographies de fibrilles de A β 42 (oxydé sur Met35), échelle de la barre : 50 nm.

Des structures RMN ont également été publiées pour A β 40, proposant l'existence de structures en feuillets- β parallèles dans la partie 12-40 avec des liaisons inter-brins intramoléculaires et des liaisons intermoléculaires ponctuelles, telles que l'interaction électrostatique entre Lys²⁸ et Asp²³ qui favorisent la formation des fibrilles (Petkova *et al.*, 2002; Petkova *et al.*, 2006) (figure 1.11). Les différences existant entre les modèles structuraux pour A β 40 et A β 42 peuvent s'expliquer, au moins en partie, par le fait que ces deux peptides adoptent des structures différentes en solution et ne s'agrègent pas selon le même mécanisme (Bitan *et al.*, 2003).

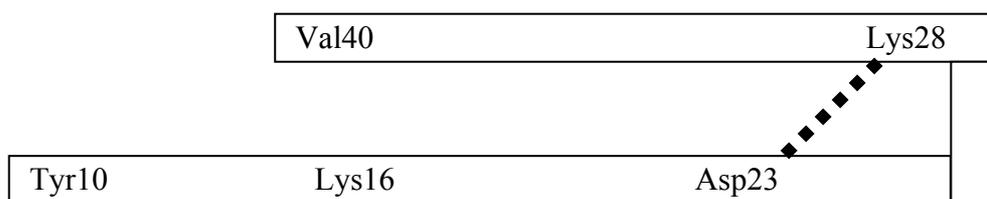


Figure 1.11. Représentation schématique de la structure coudée du peptide amyloïde A β 40.

Toxicité :

L'agrégation d'A β est généralement considérée comme un évènement critique dans la maladie d'Alzheimer ; les plaques amyloïdes étant caractéristiques des cerveaux des malades d'Alzheimer lors d'examens *post-mortem*.

Cependant, la forme d'A β responsable de la toxicité (c'est-à-dire oligomérique ou fibrillaire, extracellulaire ou intracellulaire) est toujours débattue actuellement (Hardy et Selkoe, 2002; Klein *et al.*, 2001). De nombreux indices tendent à prouver que ce sont les taux de A β soluble, et non les plaques, qui corrélerent le mieux avec les dysfonctionnements cognitifs dans la maladie d'Alzheimer (McLean *et al.*, 1999). De plus, chez les souris transgéniques, les peptides A β peuvent commencer à exercer leur toxicité avant même la formation de plaques (Moechars *et al.*, 1999; Mucke *et al.*, 2000).

L'une des hypothèses les plus répandues actuellement est que les espèces responsables de la neurotoxicité de A β ne seraient pas les plaques amyloïdes mais plutôt des formes plus petites, intermédiaires de l'agrégation (oligomères). Ainsi, des structures agrégées sphériques de petite taille (amylosphéroïdes) sont également toxiques sur cultures cellulaires (Hoshi *et al.*, 2003). Par ailleurs, de petits oligomères globulaires (des trimères aux 24-mères) d'A β 42 solubles (ADDLs en anglais pour "A β -derived diffusible ligands"), et les protofibrilles, également solubles, sont proposés comme d'autres formes d'agrégation d'A β pouvant générer de la toxicité, notamment en inhibant *in vivo* la

plasticité synaptique et le mécanisme de potentialisation à long terme associé à la mémoire (Gong *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2002).

Enfin, des accumulations intraneuronales de A β , évènements précoces de l'agrégation de A β , sont également neurotoxiques et responsables de dysfonctionnements synaptiques *in vivo* (Mucke *et al.*, 2000; Oddo *et al.*, 2003).

Des modifications chimiques et structurales associées à la polymérisation de A β ont également été relevées *in vitro* et *in vivo* suite au "vieillessement" du peptide. Elles incluent par exemple la formation de formes tronquées (via la formation de pyroglutamates N-terminaux en positions 3 et 11 par exemple), l'isomérisation (notamment au niveau des aspartates), la racémisation, l'oxydation (en particulier la sulfoxydation des méthionines), des "cross-links" via les tyrosines (figure 1.12) et la formation de polymères de A β 40 et de A β 42 résistants au SDS (Piccini *et al.*, 2005; Roher *et al.*, 1993; Zirah *et al.*, 2006). Ces diverses modifications entraînent une résistance aux protéases, rendant ainsi plus difficile la métabolisation et l'élimination des peptides.

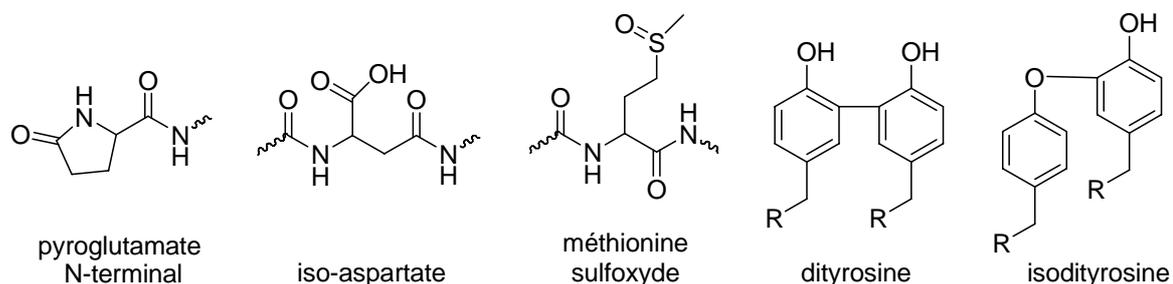


Figure 1.12. Modifications chimiques observées sur le peptide A β suite au "vieillessement"

II.1.c Interaction de A β avec les ions métalliques

Il est difficile d'attribuer l'initiation de l'amyloïdogenèse à la seule présence des peptides A β 40 et A β 42, alors que ce sont des constituants normaux du fluide cérébrospinal et que les porteurs de la maladie d'Alzheimer familiale, qui surexpriment A β 42 dès la naissance, ne présentent pas de dépôts amyloïdes dans leur enfance. D'autre part, il est difficile d'expliquer que les dépôts formés soient localisés à des endroits bien précis (au niveau des synapses par exemple) et que leur distribution ne soit pas uniforme puisque l'A β est exprimé de façon ubiquitaire. Il est donc raisonnable d'évoquer, en plus de la surproduction d'A β (liée à des causes génétiques ou à l'âge), d'autres facteurs permettant l'initiation des dépôts amyloïdes avec l'âge.

Il a été proposé que les ions métalliques participent à ce phénomène (Atwood *et al.*, 1999). Leur homéostasie est perturbée lors de la maladie d'Alzheimer (voir chapitre III). Les ions métalliques sont retrouvés à des concentrations très élevées dans le cerveau des malades d'Alzheimer, à proximité ou au sein des plaques amyloïdes (Atwood *et al.*, 1999; Lovell *et al.*, 1998). L'interaction entre l'A β et les métaux (cuivre, zinc et fer) est donc de plus en plus étudiée. Comme elle est au cœur de notre sujet, elle fera l'objet d'une bibliographie détaillée dans la partie IV. Disons pour le moment qu'il est désormais admis que les métaux sont des acteurs majeurs de la maladie d'Alzheimer.

II.1.d Interaction de A β avec les membranes

Plusieurs facteurs jouent un rôle important dans l'interaction entre le peptide A β et la membrane des lipides : la concentration et la nature du métal lié à l'A β , l'état d'oxydation de la Met35, le pH, la charge des lipides dans la membrane, le ratio avec le cholestérol sont autant de paramètres qui varient et influent sur le mode d'interaction entre l'A β (40 ou 42) et la bicouche lipidique.

A β est un peptide avec une partie hydrophobe issu de la région transmembranaire de l'APP. Il est supposé être partiellement extracellulaire (région 1 à 16) et partiellement structuré en hélice alpha dans la région transmembranaire (29 à 42). La localisation contenant les acides aminés 17 à 28 n'est pas très claire. Le caractère hydrophobe de la partie 28 à 41 favorise son interaction avec les membranes et sa conformation en hélice alpha.

La structure supramoléculaire de A β associé aux membranes est relativement peu connue et controversée. Des études de RMN du solide et de dichroïsme circulaire montrent l'affinité de A β pour les phospholipides chargés négativement. D'autres études RMN ont montré que le peptide adoptait une conformation en hélice- α dans un environnement de type membranaire. On suppose donc que le peptide est capable de s'insérer dans les membranes suite à la formation d'hélices- α , alors que les peptides non insérés forment des structures en feuillets- β à la surface des lipides (Bokvist *et al.*, 2004). Cela entraîne une diminution de la fluidité des membranes. (Kremer *et al.*, 2000). Il en résulte une altération de leurs propriétés, conduisant par exemple à leur dépolarisation (Hartley *et al.*, 1999) ou à l'augmentation de leur perméabilité. (Arispe *et al.* 1996). Les

ions Ca^{2+} peuvent passer. Ce mécanisme explique la toxicité de l'A β par la formation de canaux à Ca^{2+} , aboutissant à une accumulation de calcium (connu pour être toxique) dans la cellule. Cependant ce mécanisme est indépendant de la conformation en feuillet- β de l'A β et par voie de conséquence indépendant de l'agrégation (voir le lien entre feuillet- β et agrégation décrit précédemment). Il a aussi été montré que l'hélice- α de l'A β s'insère dans la membrane et forme des canaux cations monovalents (Arispe *et al.*, 1993). Des études de microscopie à force atomique ont montré la présence de structures multimériques (tétramériques ou hexamériques) de A β 42 en forme de canaux au sein de bicouches lipidiques, favorisant l'afflux de Ca^{2+} dans les cellules (Lin *et al.*, 2001).

Une autre voie possible est que l'A β quitte la membrane et commence à agréger en adoptant une conformation en feuillet bêta dans le domaine extracellulaire et/ou à la surface de la membrane. La conformation en feuillet bêta est supposée être liée à la toxicité de l'A β (puisque en relation avec la structuration des agrégats en fibrilles), mais le mécanisme, n'est pas encore bien compris. Il a cependant été démontré que l'agrégation de l'A β était plus rapide à la surface des membranes qu'en solution.

Plusieurs études indiquent que la charge des lipides dans la membrane joue un rôle important dans l'interaction avec l'A β . Ainsi, le cholestérol, composant essentiel des membranes, semble participer car il contribue à la fois à la structure des membranes et est associé à la régulation des sécrétases α et β clivant l'APP (partie I.3.b). Sa présence dans les membranes neuronales (en forte concentration dans la MA) est connue pour induire des modifications importantes dans la fluidité des membranes.

Rôle des métaux

Peu d'études font état du rôle des ions métalliques sur l'interaction de l'A β avec les membranes. La coordination de Cu^{II} ou Zn^{II} à A β dans un environnement lipidique chargé négativement provoque également un changement conformationnel de feuillet- β à hélice- α , accompagné de la structuration du peptide en "oligomères allostériquement organisés" qui pénètrent dans la membrane (Curtain *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'absence de Cu^{II} et/ou de Zn^{II} inhibe l'insertion de A β 40 et A β 42 dans des bicouches lipidiques (pour un pH = 5,5-7,5) indiquant l'importance de ces ions métalliques dans l'interaction de A β avec la membrane cellulaire (Curtain *et al.*, 2003).

La proximité de ces complexes Cu^{II} -A β avec le cholestérol présent dans les membranes pourrait par ailleurs faciliter la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), le cholestérol servant de réducteur. Des espèces oxydées du cholestérol (telles que le 4-cholesten-3-one) sont ainsi produites en présence de tels complexes et ont été retrouvées *in vivo* chez des souris transgéniques modélisant la maladie d'Alzheimer et dans des cerveaux humains *post-mortem* (Puglielli *et al.*, 2005).

L'agrégation de A β en structures fortement hydrophobes et leur pénétration au sein des structures lipidiques ont plusieurs conséquences sur leur intégrité, que ce soit selon un mécanisme direct ou via l'oxydation des membranes suite à la libération des ROS par l'A β à proximité ou au sein de celles-ci (Murray *et al.*, 2005), comme il sera décrit au paragraphe II.4. La conséquence principale de ces phénomènes est une augmentation de la perméabilité membranaire. Il en résulte la dérégulation de l'homéostasie des ions et des dérèglements de la signalisation cellulaire pouvant conduire à la mort cellulaire, phénomènes qui seront décrits plus longuement au paragraphe II.4.

II.2 La protéine tau et son implication dans les neurofibrilles

En plus des dépôts extracellulaires de peptides β -amyloïdes (plaques séniles), les neurones des zones du cerveau touchées par la maladie d'Alzheimer présentent des enchevêtrements intracellulaires de neurofibrilles qui affectent leur cytosquelette. Ce type de lésions impliquant la protéine tau n'est pas spécifique à la maladie d'Alzheimer, il est également retrouvé dans d'autres maladies neurodégénératives regroupées sous le terme "taupathies", incluant le syndrome de Down, la démence fronto-temporale avec Parkinsonisme liée au chromosome 17 (FTDP-17), la maladie de Pick ou encore la paralysie supranucléaire progressive (LaFerla et Oddo, 2005).

Ces enchevêtrements de neurofibrilles sont constitués d'agrégats de protéines tau sous forme hyperphosphorylée (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986).

La protéine tau est responsable de l'assemblage et de la stabilisation des microtubules, composants essentiels du cytosquelette des neurones. Dans son état natif, tau est une protéine comprenant entre 352 et 441 acides aminés (de masse 55 à 62 kDa) et existe sous six isoformes produites à partir d'un gène unique situé sur le chromosome 17. Des mutations génétiques sur ce chromosome conduisent à la démence frontale temporale

avec Parkinsonisme (FTDP-17), mais aucune mutation conduisant à la maladie d'Alzheimer n'a été répertoriée à ce jour (LaFerla et Oddo, 2005). Ces protéines ont la particularité de posséder dans leur séquence trois à quatre répétitions d'un même domaine qui permet la liaison aux microtubules. Cette liaison est par ailleurs fortement régulée par la phosphorylation de la protéine au niveau de résidus sérine et thréonine.

La protéine tau pathologique est hyperphosphorylée. Suite à cette hyperphosphorylation, tau se dissocie des microtubules (Bramblett *et al.*, 1993), compromettant ainsi leur stabilisation et leur fonctionnement. Cela conduit à une altération des transports axonaux et dendritiques ainsi qu'à une dégénérescence des neurones. De plus, la protéine hyperphosphorylée libérée montre une solubilité nettement plus faible. Elle est aussi plus sensible aux modifications chimiques induites par le stress oxydant et subit des changements conformationnels suite à ces oxydations. Elle s'agrège alors, selon un processus de polymérisation avec une étape de nucléation (Barghorn et Mandelkow, 2002), sous forme de paires hélicoïdales de filaments (PHFs, "paired helical filaments" en anglais). Ces dernières s'associent ensuite en structures plus grandes : les neurofibrilles. Par ailleurs, il est également suggéré que les ions Al^{III} et Fe^{III} , retrouvés liés à tau dans des cerveaux de patients *post mortem*, soient impliqués dans la polymérisation des protéines tau hyperphosphorylées (Shin *et al.*, 2003).

Ces structures en filaments hélicoïdaux présentes dans le cytoplasme sont responsables de neurodégénérescence. Des modèles de protéines tau hyperphosphorylées sont toxiques sur cultures cellulaires (Fath *et al.*, 2002). De plus, le nombre et la localisation des enchevêtrements de neurofibrilles dans le cerveau *post-mortem* a pu être corrélé avec le niveau de démence, alors qu'une telle relation n'existe pas dans le cas des plaques amyloïdes (Arriagada *et al.*, 1992).

II.3 Relations existant entre A β et tau

Le lien entre les lésions de la maladie d'Alzheimer (plaques et enchevêtrements de neurofibrilles) et les composants qui leur sont associés (A β et tau), ainsi que leurs relations avec la mort neuronale qui caractérise la maladie ont longtemps été controversés. Pendant de nombreuses années, deux hypothèses majeures ont été proposées sur les causes de la maladie d'Alzheimer (Suh et Checler, 2002) : "l'hypothèse

de la cascade amyloïde", qui postule que le processus neurodégénératif est une série d'évènements causés par une production anormale de A β (Hardy et Higgins, 1992), et "l'hypothèse de la dégénération du cytosquelette neuronal" proposant que les modifications du cytosquelette associées à tau sont les évènements déclencheurs de la maladie.

Des travaux sur les kinases ont apporté les premiers éléments de réponse. De nombreuses kinases, dont GSK-3 (kinase glycogène-synthase 3 ou PTK I pour "Tau protein kinase I") et cdk5 (kinase cycline-dépendante 5), sont capables de phosphoryler tau *in vitro*. Elles sont activées en réponse à l'agrégation de A β et conduisent à la mort neuronale (Alvarez *et al.*, 1999; Takashima *et al.*, 1993).

Par ailleurs, des études récentes réalisées sur des souris triplement transgéniques APP x PS1 x tau montrent le lien hiérarchique entre A β et tau, en faveur de l'hypothèse de la cascade amyloïde (LaFerla et Oddo, 2005). Ces souris développent les pathologies associées à A β et à tau, mais de façon non synchrone : A β intracellulaire (3 mois), dépôts amyloïdes extracellulaires (6 mois), premiers changements conformationnels de tau (10 - 12 mois) et hyperphosphorylation de tau (12 - 15 mois) (Oddo *et al.*, 2003). Dans une seconde étude, Oddo *et al.* ont montré que la suppression de A β par immunothérapie (ou via à un inhibiteur de γ -sécrétase) conduit à un retrait de la pathologie associée à tau à un stade précoce (avant qu'il y ait hyperphosphorylation) : la disparition de A β précédant celle de tau et la réapparition de la pathologie associée à A β précède celle associée à tau (Oddo *et al.*, 2004). Enfin, ces travaux suggèrent que A β peut moduler la progression de la pathologie associée à tau. En effet, des souris transgéniques PS1 x tau (dépourvues d'APP et donc ne développant pas de pathologie associée à A β), développent des taupathies plus tardivement et moins sévèrement (en particulier, les dysfonctionnements synaptiques sont moins prononcés) par comparaison aux souris triplement transgéniques APP x PS1 x tau (Oddo *et al.*, 2003).

Ainsi, ces résultats confirment l'hypothèse de la cascade amyloïde selon laquelle A β est l'élément déclencheur de la pathologie associée à tau. Il faut toutefois noter que tau lui-même est essentiel pour la neurotoxicité associée à A β (dégénérescence des neurones en présence de fibrilles amyloïdes). Ainsi, dans un modèle cellulaire en présence de A β fibrillaire, on observe une dégénérescence des neurones isolés de souris transgéniques exprimant tau (humain ou de souris), alors que les cellules issues

d'animaux knock-out pour tau ne dégèrent pas. De plus, la dégénérescence est rétablie suite à la réexpression de tau (Rapoport *et al.*, 2002).

II.4 Hypothèse de la cascade amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde (figure 1.13) fait intervenir l'A β comme le déclencheur de tous les cas d'Alzheimer, plaçant les pathologies associées à tau, ainsi que d'autres modifications dégénératives, en aval de celui-ci (Hardy et Higgins, 1992; Hardy et Selkoe, 2002).

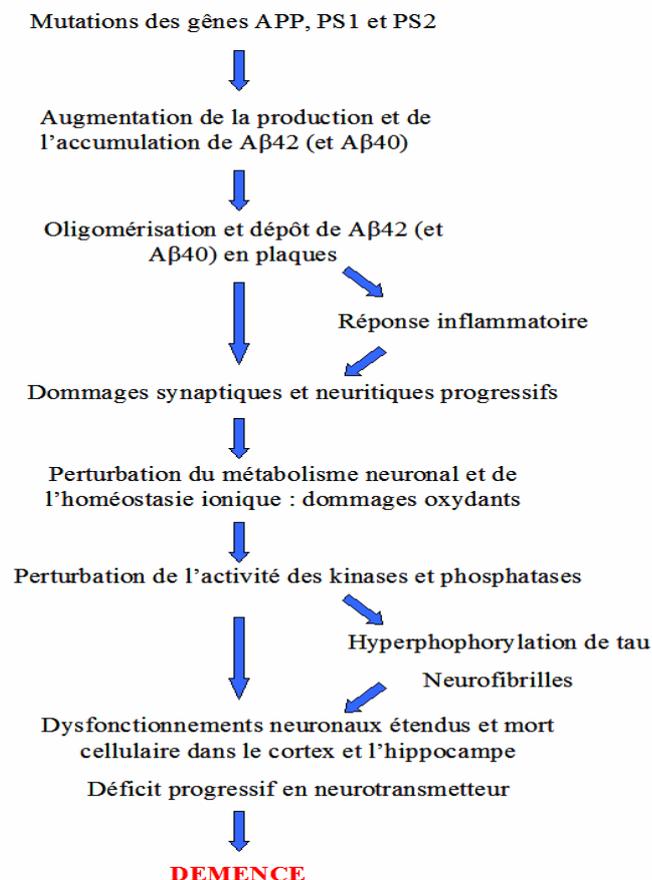


Figure 1.13. *Hypothèse de la cascade amyloïde pour les formes familiales de la maladie d'Alzheimer* (adaptée à partir de (Hardy et Selkoe, 2002; Selkoe, 2001)). Pour les formes sporadiques, le schéma est assez similaire mais les causes de l'augmentation de la production et de l'accumulation de A β sont moins bien définies.

A ce schéma centré sur le peptide β -amyloïde peuvent se greffer certains facteurs supplémentaires en relation avec la maladie d'Alzheimer, qui seront détaillés dans les paragraphes suivants.

La neurotoxicité exercée par A β (oligomères) peut l'être via divers mécanismes tels que la génération de stress oxydant, la dérégulation des systèmes de

neurotransmetteurs ou de l'homéostasie du calcium, une réponse inflammatoire forte et l'activation de diverses voies de signalisation conduisant à la mort cellulaire (Suh et Checler, 2002). Les dysfonctionnements engendrés sont en interconnexion, c'est-à-dire qu'un dérèglement quelque part, en induit un autre ailleurs et ainsi de suite (d'où le nom de cascade).

Stress oxydant :

A β est capable de produire des espèces réactives de l'oxygène (en particulier H₂O₂) qui ont été détectées sur cultures cellulaires mais également *in vivo* (Behl *et al.*, 1994; McLellan *et al.*, 2003). La protection de l'organisme vis-à-vis des dommages oxydants est réalisée par un grand nombre d'antioxydants, enzymatiques ou non. Par exemple, les superoxyde dismutases Mn-SOD et Cu/Zn-SOD sont responsables de la conversion de l'anion superoxyde en H₂O₂ et O₂. L'H₂O₂ est quant à lui détoxifié en O₂ et H₂O par la catalase et les peroxydases. Cependant, lorsque les taux de ROS dépassent la capacité anti-oxydante de la cellule, les phénomènes délétères de stress oxydant apparaissent au niveau des lipides, des protéines ou encore de l'ADN de celle-ci.

L'attaque de radicaux sur une double liaison d'acides gras insaturés (acide arachidonique, acide docosahénoïque, ...) initie des réactions en chaîne sur d'autres acides gras. Les produits formés incluent le 4-hydroxy-2-nonèn-1-al (HNE), le 2-propèn-1-al (acroléine) (figure 1.14), le malondialdéhyde et les isoprostanes. Toutes ces espèces, ainsi que des formes oxydées du cholestérol (4-cholesten-3-one par exemple) ont été retrouvées à des niveaux élevés dans les cerveaux atteints d'Alzheimer, à proximité des plaques et des neurofibrilles (Butterfield *et al.*, 2001; Puglielli *et al.*, 2005).

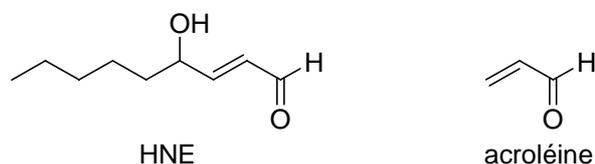


Figure 1.14. Structures du 4-hydroxy-2-nonèn-1-al (HNE) et du 2-propèn-1-al (acroléine)

La présence de dommages sur les acides nucléiques (en particulier la formation de la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG)) et de modifications des protéines (carbonylation et nitration, adduits covalents avec l'HNE ou l'acroléine via des additions électrophiles de Michael, ...) est également observée dans les régions présentant des

neurofibrilles ou des dépôts amyloïdes, ainsi que sur les protéines A β et tau elles-mêmes (Butterfield *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1997b).

Enfin, les marques de stress oxydant (catalase, superoxyde dismutase (SOD), glutathionne peroxydase et glutathionne réductase) sont augmentées dans l'hippocampe et le complexe amygdalien des malades d'Alzheimer (Suh et Checler, 2002).

Toutes ces observations sont en faveur d'un niveau élevé de stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer. Les modifications engendrées (oxydation des lipides, oxydations des protéines et de l'ADN) conduisent à une toxicité générale dans le cerveau. Par exemple, les espèces réactives formées lors du stress oxydant peuvent déclencher des événements conduisant à l'apoptose (Tamagano *et al.*, 2003). D'autre part, la perte de l'intégrité des membranes suite à l'oxydation des lipides peut conduire à des dysfonctionnements cellulaires, tels que l'inhibition des ATPases et la perte de l'homéostasie du calcium, rendant les neurones vulnérables à l'excitotoxicité et à l'apoptose. La conséquence ultime de tous ces dysfonctionnements cellulaires est la mort neuronale (Suh et Checler, 2002).

Dysfonctionnement des systèmes de neurotransmetteurs :

Dans les parties endommagées du cerveau des malades atteints par la maladie d'Alzheimer, on observe une perte importante de neurones cholinergiques avec de faibles niveaux d'acétylcholine (ACh). L'acétylcholine est un neurotransmetteur libéré dans l'espace intersynaptique. Son taux est régulé par deux enzymes : elle est synthétisée à partir de la choline par la ChAT (choline acétyltransférase) et hydrolysée par l'AChE (acétylcholine estérase) localisée dans la membrane post-synaptique (figure 1.15).

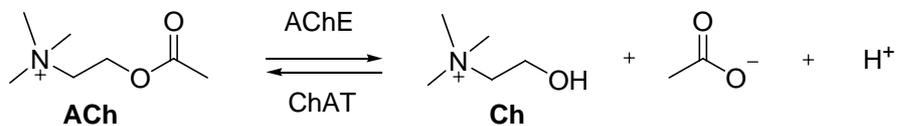


Figure 1.15. Libération de la choline à partir de l'acétylcholine

Chez les malades, l'origine du faible niveau d'ACh dans l'espace intersynaptique peut être reliée à l'activité de l'AChE, puisque celle-ci diminue lors de la progression de la maladie, et à un excès d'activité d'une enzyme de la même famille que l'AChE, la butylcholine estérase, qui reconnaît également l'ACh comme substrat (Scarpini *et al.*, 2003) et dont l'activité croît au cours de la maladie. Le déficit en acétylcholine se traduit

par une diminution des fonctions cognitives suite à une diminution de l'activation des récepteurs cholinergiques muscariniques (type M) et nicotiques (type N) (figure 1.16).

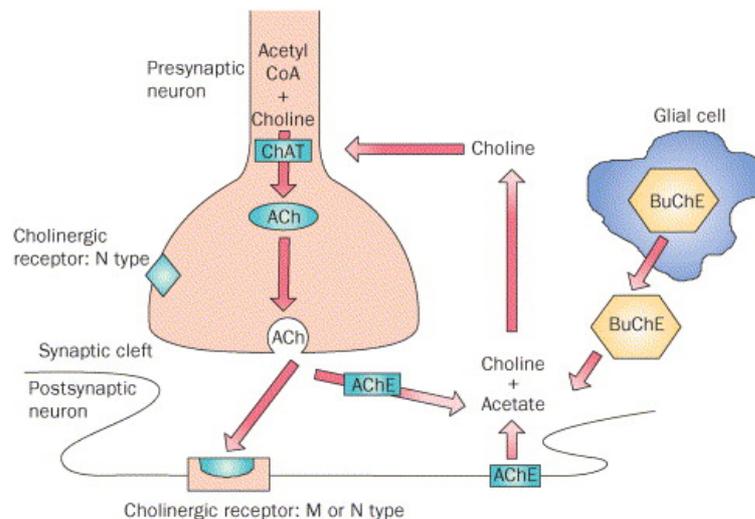


Figure 1.16. Représentation schématique du système cholinergique (d'après (Scarpini et al., 2003). ChAT : choline acétyltransférase, ACh : acétylcholine, AChE : acétylcholine estérase, BuChE : butyrylcholinestérase.

Excitotoxicité (toxicité induite par le glutamate) :

Le glutamate est un neurotransmetteur exciteur majeur du système nerveux central. Les neurones à glutamate sont impliqués dans les processus cognitifs du cortex tels que l'apprentissage et la mémoire, incluant le processus de potentialisation à long terme. Il existe trois types de récepteurs ionotropiques du glutamate, dont les récepteurs du N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA). Activés par le glutamate, ils permettent l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule via des canaux ioniques qui leur sont associés.

Une des conséquences de la production des ROS est la suractivation des récepteurs du glutamate, en particulier ceux du NMDA (Bachurin, 2003). De plus, des dysfonctionnements du métabolisme énergétique et des systèmes de transport du glutamate lors de la maladie d'Alzheimer conduisent à l'accumulation de ce neurotransmetteur dans les synapses. Or le glutamate endogène induit un effet neurotoxique (appelé excitotoxicité) via l'activation excessive des récepteurs qui lui sont associés, conduisant à la mort des cellules neuronales (Lipton, 2006).

En effet, l'hyperactivation des récepteurs du NMDA est accompagnée d'une augmentation de l'entrée des ions calcium dans la cellule et par conséquent d'une augmentation de la concentration de ces ions dans le cytosol. Ce phénomène entraîne

l'activation de certains systèmes enzymatiques intracellulaires (protéases, nucléases, lipases), déclenchant une cascade de processus dégénératifs et, finalement, l'apoptose (Bachurin, 2003) (processus décrits au paragraphe suivant).

Toxicité générée par le dérèglement de l'homéostasie du calcium :

L'ion calcium est le messager intracellulaire le plus important du cerveau. Il joue un rôle fondamental dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Il est également impliqué dans la survie et la mort neuronale. L'incapacité des neurones à réguler l'homéostasie du calcium est un aspect de la MA impliqué dans le dysfonctionnement des neurones et de leur mort.

Ce dérèglement de l'homéostasie du calcium est une conséquence de la maladie d'Alzheimer. Des expériences sur cultures cellulaires ont démontré la capacité de l'A β à déstabiliser l'homéostasie du calcium dans la cellule et à favoriser la neurotoxicité (Bachurin, 2003). Par ailleurs, nous avons déjà vu que le peptide A β peut induire des variations de perméabilité de différents types de membranes cellulaires, notamment en formant des canaux perméables aux cations dans ces membranes, favorisant alors l'afflux de calcium vers la cellule. De plus, A β provoque du stress oxydant qui altère les pompes à calcium membranaires et augmente l'afflux de calcium via les canaux voltage-dépendants et les récepteurs ionotropiques du glutamate (NMDA ou AMPA), comme cela a été décrit au paragraphe précédent (Mattson, 2004).

Des taux élevés de calcium intracellulaire ont de nombreuses conséquences délétères. Une concentration élevée de Ca²⁺ génère du stress oxydant via la surconcentration de calcium dans les mitochondries, l'activation de l'oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS) qui conduit à la production d'oxyde nitrique NO \cdot et à la formation du péroxynitrite toxique ONOO \cdot avec O₂ \cdot^- . De plus, une dérégulation de l'homéostasie du calcium a un impact sur les fonctions neuronales dépendantes du calcium telles que la libération de neurotransmetteurs et la plasticité synaptique. Le stress oxydant et le Ca²⁺ en excès conduisent également à l'activation de kinases dont GSK-3 ou encore les MAPs (Mitogen-activated proteins) kinases capables de phosphoryler la protéine tau et donc d'induire sa toxicité. Ainsi, les neurones affectés par les enchevêtrements de neurofibrilles présentent des taux de calcium élevés et des signes d'hyperactivation des protéases et des kinases Ca²⁺-dépendantes (Mattson, 2004). L'activation de ces kinases par le Ca²⁺ conduit également à l'activation de facteurs de

transcription pouvant déclencher l'apoptose. Hormis les kinases, l'excès de Ca^{2+} intracellulaire cause l'activation des caspases et d'autres facteurs d'induction d'apoptose, conduisant également à la perte des neurones (Lipton, 2006; Suh et Checler, 2002).

Inflammation :

La neurodégénérescence du tissu cérébral dans la maladie d'Alzheimer est accompagnée de phénomènes inflammatoires (Suh et Checler, 2002). Les marques de cette inflammation sont significativement plus élevées dans le cerveau des malades d'Alzheimer que chez les personnes saines (Suh et Checler, 2002). La formation des plaques amyloïdes et les modifications oxydantes sur $\text{A}\beta$ entraînent l'activation microgliale et l'apparition d'astrocytes en réponse à ces éléments "étrangers" non reconnus. Cellules microgliales et astrocytes sont alors à l'origine de la libération de médiateurs inflammatoires (cytokines, chémokines, facteur de croissance TGF, facteur de transmission $\text{NF}\kappa\text{B}$,...) et d'une production supplémentaire de peroxyde d'hydrogène et de peroxyde nitrite qui peuvent induire l'apoptose ou faciliter les réactions de stress oxydant.

En conclusion, l' $\text{A}\beta$ joue un rôle central dans la maladie d'Alzheimer. Il semble être à l'origine de nombreux mécanismes délétères en interaction les uns avec les autres qui contribuent ainsi à sa toxicité. Les effets ultimes des phénomènes inflammatoires, ioniques et du stress oxydant sont la dystrophie neuritique, la perte des synapses et une perte sélective de neurones suite à la neurodégénérescence et l'apoptose.

II.5 Différentes approches thérapeutiques

Il n'existe malheureusement encore aucun traitement efficace contre la maladie d'Alzheimer. L'avancée relativement lente dans ce domaine bénéficie cependant de quelques excuses. Pendant de nombreuses années, l'absence d'un modèle animal de la maladie a constitué un lourd handicap pour la compréhension de la maladie et l'exploration de nouveaux axes thérapeutiques. L'évaluation au stade préclinique de nouvelles molécules (ou vaccins) est facilitée lorsqu'il existe des modèles cellulaires ou animaux fiables.

Il est désormais possible d'utiliser des souris transgéniques pour tester des hypothèses biologiques et des molécules ayant une activité thérapeutique potentielle. Ces souris transgéniques sont produites par surexpression de un à deux (voire trois) gènes

humains, le plus souvent mutés, impliqués dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Les gènes utilisés à cette fin sont les gènes codant pour la protéine APP (précurseur du peptide β -amyloïde), pour les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2) - protéines permettant l'activation des γ -sécrétases - et pour la protéine tau, impliquée dans la dégénérescence neurofibrillaire. Les souris transgéniques résultantes, bien que ne développant pas tous les aspects de la maladie d'Alzheimer, sont des modèles intéressants pour l'étude des lésions caractéristiques de la maladie et des déficits cognitifs associés (Higgins et Jacobsen, 2003).

Par ailleurs, le développement de la maladie est assez lent et toute amélioration est essentiellement évaluée par des tests comportementaux de fiabilité limitée.

Plusieurs revues permettent de faire le point sur les différentes approches thérapeutiques actuellement envisagées (Bachurin, 2003; Suh et Checler, 2002). Elles peuvent être regroupées en deux classes selon qu'elles agissent sur les symptômes ou les causes de la maladie.

II.5.a Approches symptomatiques et traitements utilisés

Il n'y a actuellement aucun traitement curatif pour la maladie d'Alzheimer. Mis à part les neuroleptiques et les antidépresseurs utilisés pour lutter contre les troubles comportementaux des malades, les seuls traitements utilisés à ce jour sont des inhibiteurs des choline estérases ou des antagonistes des récepteurs du NMDA. D'autres axes thérapeutiques, incluant les antioxydants ou des anti-inflammatoires, sont actuellement en cours d'évaluation clinique quand à leur efficacité sur la maladie d'Alzheimer.

Les Inhibiteurs des choline estérases

Une perte importante de neurones cholinergiques avec de faibles niveaux d'acétylcholine et de choline acétyltransférase a été observée chez les malades d'Alzheimer. Cela se traduit par une diminution des fonctions cognitives. Afin de compenser ce déficit du neurotransmetteur acétylcholine, une voie thérapeutique intéressante consiste à utiliser des inhibiteurs des choline estérases. Leur rôle est d'augmenter la concentration et la durée d'action de l'acétylcholine dans la fente synaptique et donc d'améliorer l'activation des récepteurs cholinergiques (muscariniques et nicotiniques), améliorant ainsi les fonctions cognitives.

Ces composés ont été parmi les premières molécules essayées pour traiter les patients atteints de la maladie d'Alzheimer à un stade précoce ou modéré, et représentent l'une des deux seules classes de traitements utilisés actuellement (Bachurin, 2003).

La tacrine (Cognex®), inhibiteur des acétylcholine (AChE) et butyrylcholine estérases (BuChE), a été une des premières molécules employées (figure 1.17). Cependant, sa faible organospécificité et ses effets secondaires toxiques (inhibition des canaux à sodium et potassium) font qu'elle a été abandonnée en faveur d'inhibiteurs de seconde génération tels que le donepezil (Aricept®) et la galantamine (Reminyl®). Ces composés présentent une sélectivité prononcée pour l'AChE par rapport à la BuChE, et semblent avoir également une fonction agoniste sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (Arias *et al.*, 2005). Enfin, une dernière catégorie de composés, dont la rivastigmine (Exelon®), inhibe les deux formes acétylcholine et butyrylcholine estérases. Elle est particulièrement intéressante pour sa régiosélectivité permettant une inhibition sélective des choline estérases du cerveau par rapport aux formes périphériques. De plus, ce composé s'avère plus efficace que les autres pour augmenter les taux d'acétylcholine, ce qui peut s'expliquer par sa capacité à inhiber la butyrylcholine estérase de manière pseudo-irréversible (Bar-On *et al.*, 2002).

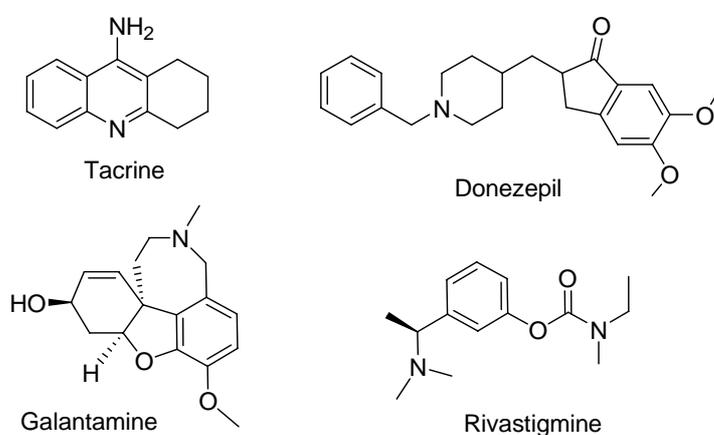


Figure 1.17. Structure des inhibiteurs de choline estérases utilisés (ou ayant été utilisés) dans le traitement de la maladie d'Alzheimer

Les inhibiteurs de l'activité cholinestérase induisent malheureusement aussi des états dépressifs. Les voies de recherches actuelles consistent donc à trouver des molécules capables de stimuler la synthèse et/ou le relargage de l'acétylcholine au niveau présynaptique (Bachurin, 2003), de stimuler les récepteurs cholinergiques muscariniques ou nicotiques post-synaptiques ou d'utiliser des agents possédant des propriétés

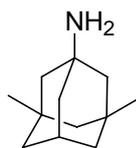
cholinomimétiques (Suh et Checler, 2002). Ces stratégies pourraient par ailleurs avoir des effets directs sur la cascade amyloïde, dans la mesure où la voie α -sécrétase de protéolyse de l'APP pourrait être régulée par l'activation des récepteurs cholinergiques muscariniques, via l'activation de protéines kinases.

Régulation du Ca^{2+} : Antagonistes des récepteurs du glutamate de la famille NMDA

Les récepteurs du N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) sont des récepteurs ionotropiques du glutamate. Activés par le glutamate, ils permettent l'influx des ions calcium dans la cellule via les canaux ioniques qui leur sont associés. Une conséquence d'un stress oxydatif élevé (comme dans la MA) est leur hyperactivation qui s'accompagne d'une augmentation de l'influx des ions calcium dans la cellule. De plus le transport du glutamate est altéré dans la maladie d'Alzheimer. L'excès de calcium résultant entraîne alors une cascade de processus dégénératifs et aboutit finalement à l'apoptose (cf. paragraphe II.4.b). Sur la base de cette hypothèse, il a été proposé que des antagonistes des récepteurs du NMDA qui bloqueraient l'influx de calcium induit par le glutamate puissent empêcher la neurotoxicité causée par $\text{A}\beta$.

C'est le cas de la mémantine (Namenda®, figure 1.18), antagoniste non compétitif du récepteur du NMDA. Elle possède une affinité modérée pour ce récepteur et bloque transitoirement l'ouverture des canaux à calcium. Ainsi, elle diminue la mort cellulaire engendrée par excitotoxicité sans altérer les fonctions normales de ce récepteur impliqué entre autres dans la transmission neuronale et dans la mémorisation (Lipton, 2006). Ce composé améliore les performances lors de tests d'apprentissage chez des souris transgéniques modélisant la maladie d'Alzheimer (Minkeviciene *et al.*, 2004). Lors de la phase III d'essais cliniques chez des patients atteints d'Alzheimer modéré à grave, la mémantine a permis de réduire les détériorations cliniques (Reisberg *et al.*, 2003). En combinaison avec le donezépil, elle a permis d'améliorer les fonctions cognitives (Tariot *et al.*, 2004).

La mémantine est actuellement utilisée en tant que traitement neuroprotecteur ralentissant le développement de la maladie d'Alzheimer pour des cas modérés à graves.



Mémantine

Figure 1.18. Structure de la mémantine, inhibiteur des récepteurs du NMDA utilisé dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Une approche alternative consisterait à utiliser des composés capables de bloquer la toxicité du calcium induite par A β , en bloquant par exemple certains canaux calciques ou en modulant l'activité de récepteurs chargés de réguler l'homéostasie du calcium (Bachurin, 2003).

Les Anti-inflammatoires non stéroïdiens

La maladie d'Alzheimer se traduisant par un état inflammatoire chronique du cerveau, il a été très vite suggéré d'utiliser des anti-inflammatoires dans son traitement.

Des anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs), inhibiteurs des cyclooxygénases (enzymes de la biosynthèse des dérivés de type prostaglandines intervenant dans les processus inflammatoires), ont donc été testés (Dannhardt et Kiefer, 2001; Townsend et Pratico, 2005). La cyclooxygénase de type 1 (COX1), constitutive et exprimée dans presque tous les tissus, assure un grand nombre de fonctions homéostatiques. La cyclooxygénase de type 2 (COX2), inductible en réponse à l'inflammation, est également présente constitutivement au niveau des neurones. Son expression augmente dans la maladie d'Alzheimer suite à une réponse inflammatoire forte face à la formation des plaques amyloïdes (Dannhardt et Kiefer, 2001).

L'ibuprofène, le naproxène, le flubiprofène, ou encore l'indométhacine (figure 1.19) sont des inhibiteurs de COX proposés pour réduire l'inflammation dans la maladie d'Alzheimer. Les deux premiers sont actuellement évalués sur ce sujet en phase III d'essais cliniques (www.alzforum.org). Par ailleurs, il a été montré que la prise régulière d'anti-inflammatoires non stéroïdiens de la même classe que l'aspirine ou l'ibuprofène pourrait réduire le risque d'Alzheimer de près d'un facteur deux (Stewart *et al.*, 1997). Une large utilisation de ces médicaments est toutefois limitée à cause des effets secondaires observés généralement pour les NSAIDs, tels que les ulcères.

La recherche s'est donc orientée vers des inhibiteurs spécifiques de COX-2, comme le rofecoxib (Vioxx®) ou le celecoxib (Celebrex®) (figure 1.19). De plus, ils devraient être dépourvus des effets secondaires liés à l'inhibition de la synthèse constitutive des prostaglandines (Dannhardt et Kiefer, 2001). Malheureusement, les premiers essais cliniques dans le cadre de la maladie d'Alzheimer n'ont révélé aucun effet thérapeutique (Reines *et al.*, 2004).

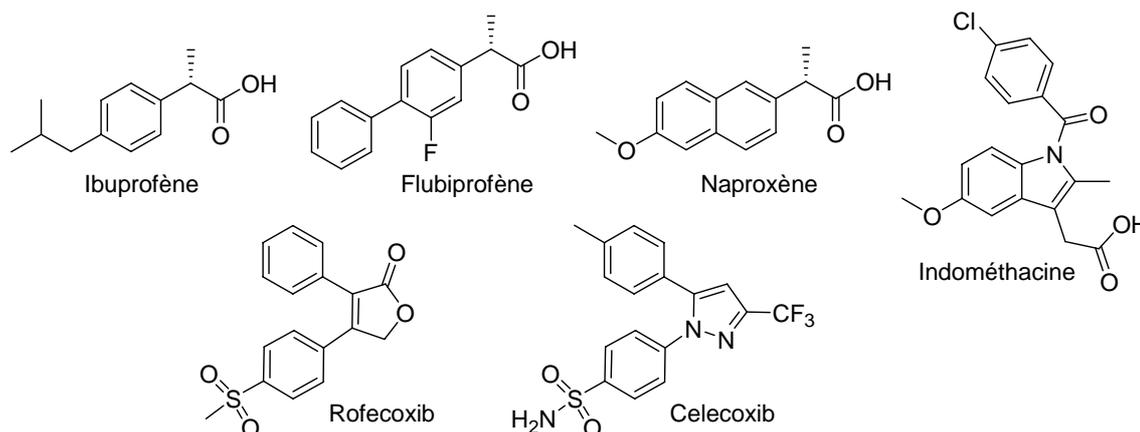


Figure 1.19. Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens testés dans le cadre de la maladie d'Alzheimer

Les antioxydants

Le phénomène de stress oxydant existe dans tous les cerveaux; cependant il est particulièrement important à proximité des plaques séniles. On pense que la présence d'ions métalliques à activité redox (cuivre et fer) à des concentrations élevées dans les plaques contribue à entretenir cette production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'origine d'un stress oxydant provoquant des dommages irréversibles sur les neurones. L'activation des cellules microgliales associée au phénomène inflammatoire et l'augmentation des taux de calcium intracellulaire sont également à l'origine de stress oxydant, notamment suite à l'activation de la NO-synthase (nNOS) par ce dernier (cf. paragraphe II.4.b).

Afin de limiter ce stress oxydant, de nombreux antioxydants (dont un certain nombre d'origine naturelle) ont été testés chez l'animal et chez l'homme (Bachurin, 2003).

L' α -tocophérol (une des formes prédominantes de la vitamine E) (figure 1.20) a fait l'objet d'études cliniques et s'avère efficace pour ralentir le développement de la maladie chez des patients atteints d'Alzheimer modéré ou grave (Sano *et al.*, 1997). Les

polyphénols tels que la curcumine (présente dans le curry), le resvératrol (composant du vin rouge) ou la catéchine (issue du thé vert) ont montré un effet protecteur sur cultures cellulaires (Conte *et al.*, 2003). Le défaut majeur de ces composés est leur difficulté à passer la barrière hémato-méningée.

La mélatonine est une hormone de régulation du sommeil dont le niveau de production décroît avec l'âge, plus particulièrement chez les malades d'Alzheimer. Une étude sur des souris transgéniques a confirmé l'activité positive de la mélatonine (réduction du stress oxydant et augmentation de la durée de vie) (Matsubara *et al.*, 2003). Cette molécule (ainsi que son précurseur, la sérotonine) présente l'avantage de passer facilement la barrière hémato-méningée. Approuvée par la FDA, elle est en vente libre aux Etats-Unis comme molécule facilitant le sommeil des personnes âgées. Sa distribution est contrôlée dans de nombreux pays européens (dont la France) car elle accentuerait les états dépressifs.

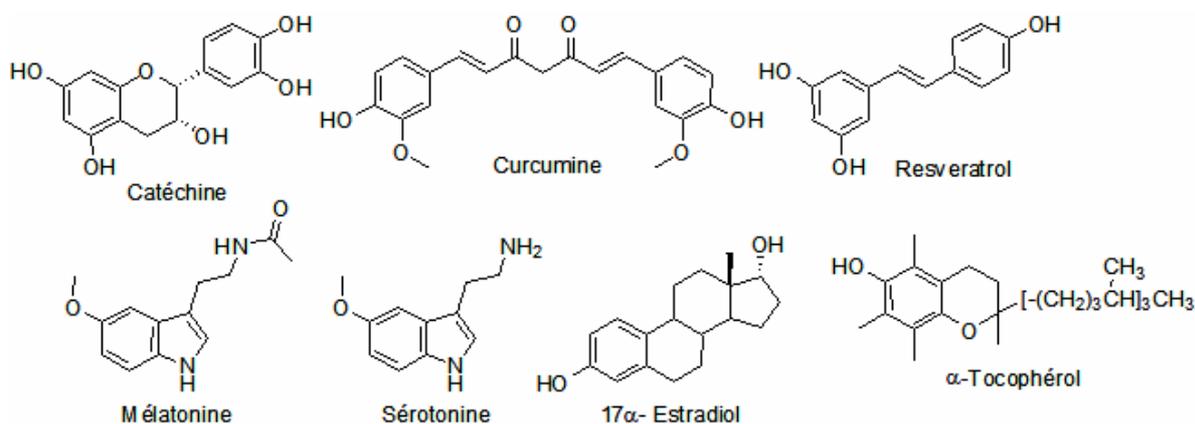


Figure 1.20. Structures de quelques composés ayant montré des propriétés antioxydantes en relation avec la maladie d'Alzheimer

De même, les hormones stéroïdiennes possèdent un effet neuroprotecteur qui a été associé, au moins en partie, à un fort effet antioxydant (Bachurin, 2003). Ainsi, les isomères 17 α - et 17 β -œstradiol et certains de leurs dérivés synthétiques passent la barrière hémato-méningée et bloquent efficacement l'accumulation intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) pouvant par conséquent prévenir les neurones du stress oxydant. Cependant, les œstrogènes ne semblent pas entraîner d'améliorations probantes sur l'évolution de la maladie (Suh et Checler, 2002).

L'inconvénient de tous ces traitements est qu'ils agissent uniquement sur les symptômes de la maladie, et non sur les causes de celle-ci.

II.5.b Agents thérapeutiques ciblant les causes de la maladie

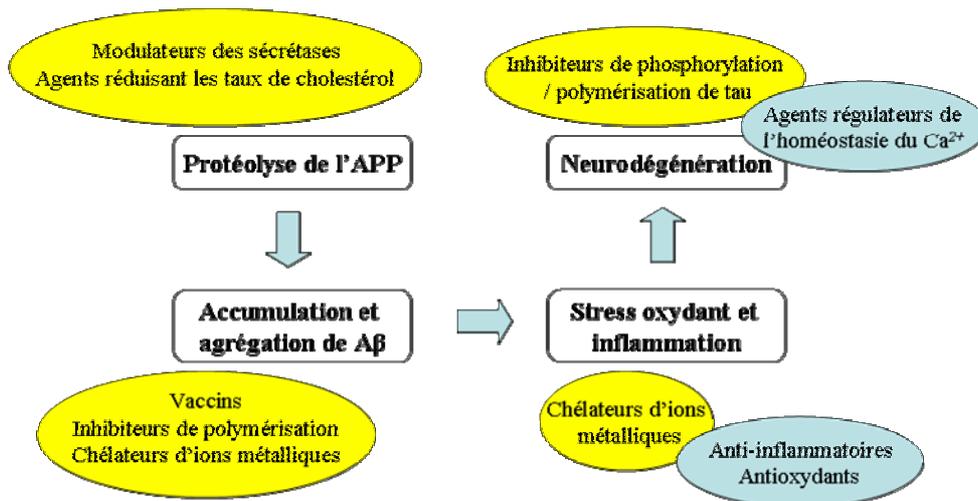


Figure 1.21. Cibles pharmacologiques et approches thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer. Les agents ciblant les causes directes de la maladie sont notés en jaune (d'après Bachurin 2003, Suh et Checler, 2002).

De nombreux efforts de recherche sont menés depuis plusieurs années sur le développement d'agents affectant les voies responsables de la neurodégénérescence ou du moins intervenant le plus tôt possible dans la cascade amyloïde. Ces stratégies, actuellement à des stades de développement plus ou moins avancés, cherchent principalement à diminuer la production de A β (modulateurs des sécrétases impliquées dans la protéolyse de l'APP), augmenter son élimination (vaccins) ou bloquer son agrégation et ses effets toxiques (inhibiteurs de polymérisation, chélateurs d'ions métalliques) (figure 1.21).

Les modulateurs de sécrétases

La protéolyse de la protéine APP par les sécrétases β et γ conduit à la formation des peptides A β , principal constituant des plaques amyloïdes (cf chapitre II). Des efforts ont donc été portés sur la recherche d'inhibiteurs de ces deux sécrétases (Citron, 2004a, 2004b; Dewachter et Van Leuven, 2002; John *et al.*, 2003).

La β -sécrétase (ou mémapsine 2 ou BACE pour " β -site APP Cleaving Enzyme") est une protéine transmembranaire de 501 acides aminés de la famille des pepsines. C'est une protéase à aspartate (c'est-à-dire qu'elle possède deux résidus aspartate requis pour

l'activité dans le site actif) générant la coupure de l'APP selon la voie amyloïdogénique (Lin *et al.*, 2000).

La plupart des inhibiteurs de β -sécrétase sont des composés peptidomimétiques facilement hydrolysables et, de part leur taille, montrent une faible capacité à passer les membranes biologiques, conduisant à un manque d'activité lors de tests cellulaires. Des inhibiteurs plus petits et pourvus de meilleures caractéristiques pharmacocinétiques sont nécessaires pour envisager un candidat médicament.

De plus, il est important de synthétiser des inhibiteurs sélectifs de la β -sécrétase (BACE-1), afin de ne pas affecter son homologue, la protéine BACE-2, qui intervient dans la vascularisation des tissus. Il pourrait donc être risqué d'agir sur la β -sécrétase, même si des souris « knock-out » pour cette protéase montrent une réduction marquée de niveaux de A β dans le cerveau, sans problème majeur au niveau du développement, de l'état de santé général ou de la fertilité (Luo *et al.*, 2001).

La γ -sécrétase est un complexe protéique comprenant quatre protéines transmembranaires : la préséniline (PS1/2) , la nicastrine, Aph1 et Pen2 (De Strooper, 2003). Le site actif de l'enzyme est situé dans les présénilines 1 et 2 qui sont, comme la β -sécrétase, des protéases à aspartate (Wolfe *et al.*, 1999). La γ -sécrétase réalise un clivage inhabituel au sein de la région transmembranaire, dans un environnement hydrophobe. Contrairement à la β -sécrétase sa structure cristalline n'est pas connue.

Les premiers inhibiteurs de la γ -sécrétase étaient des dérivés peptidiques (Suh et Checler, 2002). Par exemple, le dipeptide DAPT (figure 1.22) pénètre la barrière hémato-méningée et permet de diminuer de 50 % les taux de A β corticaux dans le cerveau de souris transgéniques (Dovey *et al.*, 2001). Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs des γ -sécrétases peut conduire à des effets secondaires dus à l'inhibition du clivage de Notch (impliqué dans la régulation de la différenciation neuronale, de la spermatogenèse, de l'ovogenèse et de la myogenèse) (De Strooper *et al.*, 1999) ou d'autres protéines substrats de cette enzyme telles que APLP1, ErbB4 ou Ire1 (Dewachter et Van Leuven, 2002). Il est donc primordial de trouver des inhibiteurs sélectifs pour le clivage de l'APP par la γ -sécrétase mais n'interférant pas avec la voie de signalisation de Notch.

C'est le cas de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens qui modifient l'activité γ -sécrétase sans l'inhiber (Weggen *et al.*, 2001). Par exemple, l'ibuprofène, l'indométhacine ou le flubiprofène (figure 1.22), peuvent moduler le clivage de l'APP en déplaçant le site de coupure de la γ -sécrétase pour libérer des fragments plus courts (tels que A β 38) et beaucoup moins toxiques que A β 42. Ainsi, l'administration de ces composés réduit la quantité de A β 42, les taux de plaques amyloïdes et l'inflammation du cerveau chez des souris transgéniques (Eriksen *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2000; Weggen *et al.*, 2001). Par ailleurs, cet effet est indépendant de l'inhibition de COX (Townsend et Pratico, 2005; Weggen *et al.*, 2001). Par conséquent, pour pallier à la toxicité gastro-intestinale de ces composés, des analogues du flubiprofène inhibant la production de A β 42 et dépourvus de l'activité inhibitrice de COX ont été préparés. C'est le cas du R-flubiprofène (figure 1.22) actuellement en phase III d'essais cliniques (www.alzforum.org) ou du composé A (CI₅₀ = 20 μ M) qui franchit la barrière hémato-méningée et permet de réduire les taux de A β 42 plasmatique sur souris transgéniques (Peretto *et al.*, 2005).

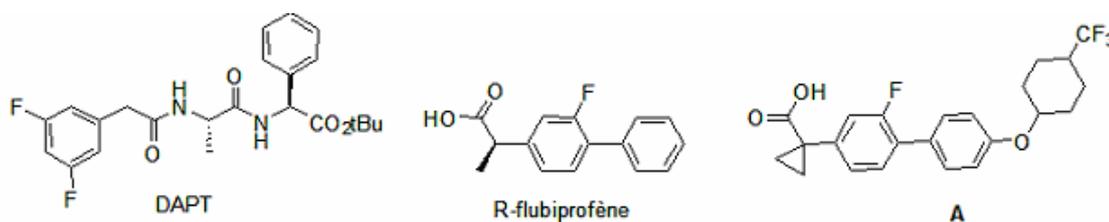


Figure 1.22. Structures de quelques inhibiteurs des γ -sécrétases

L' α -sécrétase est une métalloprotéase à zinc dont l'activité est régulée par la phosphorylation, via la protéine kinase C (PKC) (Dewachter et Van Leuven, 2002).

La stimulation du clivage de l'APP par la voie de l' α -sécrétase pourrait être un outil intéressant, dans la mesure où les sécrétases sont en compétition pour un même pool d'APP. La stimulation de l' α -sécrétase diminue la formation de A β , en dirigeant l'APP vers cette voie au détriment de la voie amyloïdogénique (Suh et Checler, 2002).

Cette activation a pu être réalisée indirectement en utilisant des ligands de la PKC (Kozikowski *et al.*, 2003). Des agonistes des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine M₁ et M₃ (cf. paragraphe III.1.a), dont les effets sur l'APP sont également liés à la PKC, permettent aussi de favoriser la voie α -sécrétase *in vitro* et *in vivo* (Nitsch *et al.*, 1992).

Les modulateurs de sécrétases, bien qu'étant des stratégies thérapeutiques intéressantes vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer, risquent cependant d'être limitées dans la mesure où la production de A β est antérieure de plusieurs années à la détection de la maladie. Une étude récente sur des souris transgéniques dont l'expression de l'APP peut être régulée montre que, suite à l'inhibition de l'expression de l'APP, la production de A β est supprimée et la charge en plaques stabilisée, mais sans être réduite. Ainsi, les plaques amyloïdes préexistantes ne sont pas éliminées dans une échelle de temps équivalente à celle qui avait permis leur formation (Jankowsky *et al.*, 2005).

Les Composés favorisant la diminution des taux de cholestérol

Le lien entre le cholestérol et la maladie d'Alzheimer a été souligné au paragraphe I.3.b. Des études épidémiologiques ont montré que l'utilisation de statines (telles que la simvastatine (Zocor®) ou l'atorvastatine (Lipitor®) (figure 1.23), pourrait réduire le risque d'Alzheimer (entre 40 et 70%) (Jick *et al.*, 2000; Wolozin *et al.*, 2000). Ces composés réduisent les taux de cholestérol en inhibant la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, qui catalyse la conversion de HMG-CoA en mévalonate lors de l'étape limitante de biosynthèse du cholestérol (Shobab *et al.*, 2005).

Ces composés interviennent dans la modulation de la protéolyse de la protéine APP en agissant sur les trois sécrétases via la diminution des taux de cholestérol, et réduisent par conséquent la production de A β *in vitro* et *in vivo*.

Même si les statines s'avèrent efficaces pour diminuer le risque d'Alzheimer, des premiers essais cliniques chez des patients atteints d'Alzheimer faible ou modéré n'ont montré que de faibles améliorations des symptômes cliniques (Sparks *et al.*, 2005).

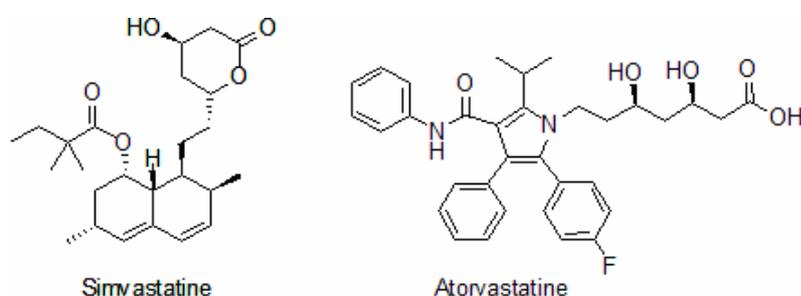


Figure 1.23. Structures de molécules favorisant la diminution des taux de cholestérol.

L'approche vaccinale

Une stratégie thérapeutique consiste à améliorer l'élimination du peptide A β par immunisation. Celle-ci va en effet stimuler le système immunitaire pour combattre les pathologies anormales associées à A β et accélérer l'élimination des plaques. Cette immunisation peut se faire selon deux méthodes : de façon active en utilisant le peptide A β lui-même, ou de façon passive avec des anticorps anti-A β .

L'immunisation avec A β 42 permet ainsi d'empêcher la formation de plaques amyloïdes chez des souris transgéniques jeunes et a conduit à une réduction de la charge en plaques et à un recul de la pathologie chez des souris plus âgées (Schenk *et al.*, 1999). Une autre étude a montré sa capacité à réduire les dysfonctionnements cognitifs de souris transgéniques (Morgan *et al.*, 2000). Il a été proposé que l'immunisation active entraîne une réponse immunitaire spécifique (via des monocytes ou des cellules microgliales) conduisant à l'élimination de A β (Schenk *et al.*, 1999).

Des essais cliniques d'immunisation active avec A β 42 préagrégé ont eu lieu en 2002. Cependant, 6 % des patients ont développé des encéphalites méningées graves suite aux essais de vaccination. Ils ont donc été interrompus. La cause probable de ces inflammations méningées est une réponse auto-immune forte visant l'APP, qui est présent dans les neurones sains. De plus, dans la mesure où le peptide peut franchir la barrière hémato-méningée, il faut également garder à l'esprit que l'immunisation avec A β pourrait en premier lieu être responsable de l'accélération des processus de formation de plaques dans le cerveau (Sigurdsson *et al.*, 2002).

L'immunisation passive avec des anticorps anti-A β devrait être moins toxique que l'immunisation directe par A β car associée à un risque plus faible de réponse auto-immune (Sigurdsson *et al.*, 2002). Comme dans le cas de l'immunisation directe, plusieurs études montrent que les anticorps permettent de réduire les plaques chez des souris transgéniques (Bard *et al.*, 2000; DeMattos *et al.*, 2001). Certains de ces anticorps, dirigés contre des domaines limités de A β , sont actuellement testés cliniquement (www.alzforum.org).

Inhibiteurs d'agrégation de A β : agents déstructurant les feuillets- β

La neurotoxicité induite par l'A β est associée à l'agrégation du peptide, induite par la formation de fibrilles à partir de structures en feuillets- β . Une approche thérapeutique consiste donc à utiliser des molécules capables de se lier à A β et de déstabiliser ces feuillets- β (" β -sheet breakers").

Des peptides courts, analogues modifiés de A β , sont capables de déstructurer les plaques de A β . C'est le cas des peptides KLVFF (Lys-Val-Leu-Phe-Phe, A β 16-20) (Tjernberg *et al.*, 1996), ou LPFFD (Leu-Pro-Phe-Phe-Asp, noté iA β 5), contenant un résidu proline favorisant l'effet " β -sheet breaker" (Soto *et al.*, 1998). Ces pentapeptides présentent une forte affinité pour les formes monomères des peptides β -amyloïdes et permettent de désagréger les plaques amyloïdes *in vitro* et *in vivo*. Cependant ils possèdent aussi des inconvénients non négligeables : (i) ils sont facilement hydrolysés *in vivo*, souvent avant d'atteindre leur cible, (ii) ils passent mal la barrière hémato-méningée, (iii) ils sont susceptibles d'entraîner des modifications conformationnelles sur des protéines autres que A β et (iv), ils sont responsables de réactions allergiques en déclenchant une réponse immunitaire (Suh et Checler, 2002). Des modifications ont été apportées pour minimiser ces inconvénients. Par exemple, l'analogue iA β 5p (Ac-LPFFD-NH₂ : protégé en positions N- et C-terminales) possède des propriétés pharmacocinétiques améliorées, franchit la barrière hémato-méningée et permet de réduire le dépôt amyloïde et la mort neuronale chez deux modèles de souris transgéniques (Permanne *et al.*, 2002).

Les recherches s'orientent actuellement vers des dérivés non peptidiques ayant les mêmes capacités à déstructurer les plaques amyloïdes. Certains de ces composés ont été sélectionnés par criblage à haut débit, comme le DAPH, qui diminue la proportion de feuillets- β (CI₅₀ \approx 15 μ M), réduit la quantité de fibrilles et la toxicité *in vitro* (Blanchard *et al.*, 2004) ou le composé RS-0406 qui empêche la formation d'oligomères et de fibrilles de A β , désagrège des fibrilles préformées et diminue la toxicité de A β *in vitro* (Nakagami *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2005) (figure 1.24).

Par ailleurs, il est actuellement proposé que certains polyphénols, connus pour leurs propriétés antioxydantes, puissent aussi agir en tant qu'inhibiteurs de fibrillation de A β (Porat *et al.*, 2006). La curcumine (épice indienne) est capable d'inhiber la formation des fibrilles de A β 40 et de les désagréger (CI₅₀ = 0,8 et 1 μ M respectivement) et se lie

aux plaques amyloïdes, réduisant leur taux *in vivo* chez la souris transgénique (Yang *et al.*, 2005). De même, le NDGA ($CE_{50} = 0,14 \mu\text{M}$) ou les polyphénols présents dans le vin permettent d'inhiber la formation de fibrilles de A β 40 ($CE_{50} \approx 0,2$ à $3 \mu\text{M}$) et de déstabiliser des fibrilles préexistantes *in vitro* (Ono *et al.*, 2003).

Enfin, un composé ionique simple, le tramiprosate (Alzhemed™) est en phase III d'essais cliniques (www.alzforum.org). Il se lie au A β soluble, maintenant celui-ci dans une structure hélice- α / boucles et réduit les plaques amyloïdes et les taux de A β soluble et insoluble sur souris transgéniques (Gervais *et al.*, 2006).

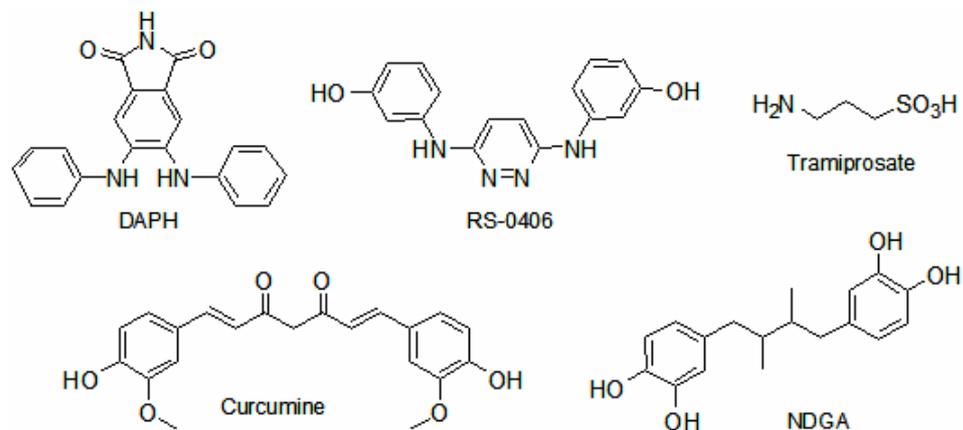


Figure 1.24. Exemples d'inhibiteurs de fibrillation d'A β

Il existe toutefois une limite à cette stratégie. Dans l'hypothèse où les espèces de A β les plus toxiques ne sont pas les plaques mais des oligomères, des composés empêchant la formation de fibrilles *in vivo* mais pas l'oligomérisation (ou qui dissocieraient ces fibrilles en oligomères) pourraient avoir des effets inverses de ceux attendus.

Inhibiteurs de la phosphorylation ou de la polymérisation de tau

Le blocage de la pathologie associée à tau est une stratégie thérapeutique intéressante, d'autant que les taupathies interviennent dans plusieurs maladies neurodégénératives. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, le nombre et la localisation des enchevêtrements de neurofibrilles ont été corrélés au niveau de démence des patients (Arriagada *et al.*, 1992). Cependant, les événements conduisant de tau aux neurofibrilles sont encore mal connus.

Il a toutefois été proposé que les kinases, responsables de la phosphorylation de tau, participent à ce processus (Johnson et Stoothoff, 2004). Des inhibiteurs des kinases responsables de cette phosphorylation, telles que la kinase cycline-dépendante 5 (cdk-5)

et la kinase glycogène-synthase 3 (GSK-3) sont recherchés. Le lithium, utilisé dans le traitement des maladies bipolaires telles que la maniaque-dépression, est un inhibiteur réversible de la GSK-3. Sur culture neuronale, il réduit la phosphorylation de tau et améliore la fixation de tau aux microtubules et la stabilisation de ces dernières (Hong *et al.*, 1997). Malgré ce premier exemple, le développement d'agents bloquant sélectivement ces kinases n'en est qu'à ses débuts.

Des agents inhibant l'agrégation de tau ou dissociant les neurofibrilles préformées sont également à l'étude. Un criblage à haut débit a permis d'identifier un certain nombre de dérivés capables d'inhiber l'agrégation de tau et de désassembler des agrégats préformés *in vitro* (figure 1.25), avec des IC₅₀ de l'ordre du micromolaire, sans interférer avec la liaison de tau aux microtubules (Pickhardt *et al.*, 2005).

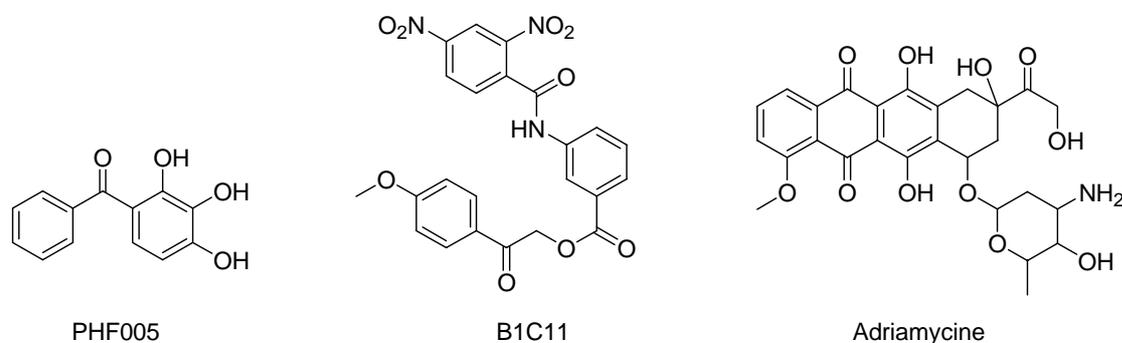


Figure 1.25. Structures de quelques composés inhibant la polymérisation de la protéine tau

Chélateurs d'ions métalliques

Il a été montré que les ions métalliques aident à la structuration des peptides amyloïdes et à leur agrégation en plaques insolubles, ainsi qu'à la production de stress oxydant. La mise en évidence d'un niveau élevé d'ions métalliques à activité redox comme le cuivre ou le fer au niveau des zones du cerveau touchées par la maladie d'Alzheimer est à l'origine de l'idée d'utiliser des chélateurs de ces ions métalliques pour empêcher leurs effets pathogènes (Bush, 2002; Cuajungco *et al.*, 2005).

Cette stratégie ne vise pas à appauvrir l'organisme en métaux en séquestrant les métaux périphériques et en les éliminant par excrétion, comme c'est le cas des chélateurs (TETA, D-pénicillamine, DFO, ...) utilisés par exemple dans le traitement de la maladie de Wilson (cuivre) ou de la β -thalassémie (forme d'anémie héréditaire) pour le fer (Sarkar, 1999). Ici, le but est d'entrer en compétition avec le peptide pour ces ions métalliques et de perturber les interactions métal-protéine délétères afin de redistribuer ce métal et de le réexporter dans la circulation sanguine générale. Ces composés ont été

définis par Bush *et coll.* sous le nom de MPACs ("metal-protein attenuating compounds") (Barnham *et al.*, 2004a). Ils doivent pouvoir franchir la barrière hémato-méningée et posséder des propriétés de chélation adaptées, suffisamment fortes pour interagir avec les métaux fixés sur le peptide A β sans toutefois complexer les métaux des métalloprotéines. L'utilisation de chélateurs d'ions métalliques tels que l'EDTA et le DTPA permettent de solubiliser A β 40 ou A β 42 agrégé en présence d'ions métalliques *in vitro* (Atwood *et al.*, 1998; Atwood *et al.*, 2000). Par ailleurs, les chélateurs TPEN, bathocuproïne (BC), bathophénanthroline (BP), EGTA ou clioquinol sont capables de dissoudre les plaques amyloïdes issues de cerveaux humains *post-mortem*. Néanmoins, la plupart d'entre eux sont trop hydrophiles pour envisager leur utilisation *in vivo*.

La deferroxamine B (DFO, Desferal[®], figure 1.26), chélateur puissant utilisé jusque là dans le traitement des excès en fer (Richardson et Ponka, 1998) a fait l'objet des premiers essais thérapeutiques de cette stratégie. Ce composé a permis une réduction significative du déclin associé à la maladie d'Alzheimer, et une analyse *post-mortem* a montré une diminution des concentrations en cuivre et en zinc dans le cerveau (McLachlan *et al.*, 1991). Cependant, il possède des inconvénients : c'est une molécule chargée qui passe mal la barrière hémato-méningée, est rapidement dégradée et provoque des effets secondaires importants (anémie par exemple) du fait d'une déplétion généralisée des ions métalliques (Bush, 2002).

Un chélateur du cuivre et du zinc, le clioquinol (figure 1.26), utilisé en tant qu'antibiotique jusqu'en 1970, a fait l'objet d'études chez l'homme comme médicament potentiel contre la maladie d'Alzheimer. Contrairement au DFO, le clioquinol passe la barrière hémato-méningée. Des souris transgéniques traitées par le clioquinol présentent une diminution de 49 % de la charge en plaques, une augmentation du taux de A β soluble et une amélioration de leur état général en comparaison avec les contrôles (Cherny *et al.*, 2001). Ces effets s'accompagnent d'une augmentation des taux de Cu^{II} et Zn^{II} solubles, traduisant une redistribution des ions métalliques par le clioquinol. Ces résultats encourageants ont permis d'entreprendre des essais de phase II chez des patients présentant un Alzheimer modérément grave (Ritchie *et al.*, 2003). L'effet du traitement sur 24 semaines a été significatif concernant la prévention du déclin cognitif pour les personnes à un stade avancé de la maladie. Dans tous les cas, le traitement par le clioquinol a été accompagné d'une diminution du taux d'A β 42 plasmatique. Cependant,

les essais cliniques sur ce composé ont été suspendus pour des raisons de toxicité d'un sous-produit présent dans les lots synthétiques de clioquinol (www.alzforum.org).

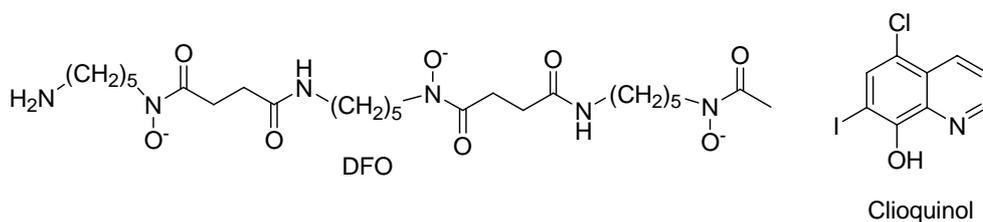


Figure 1.26. Chélateurs d'ions métalliques évalués cliniquement dans le cadre de la maladie d'Alzheimer

III. Métaux et maladie neurodégénérative

III.1 Les métaux, indispensables pour l'organisme

III.1.a Rôle des métaux dans le cerveau

Les ions métalliques (cuivre, zinc et fer notamment) sont essentiels pour les organismes vivants. Ils sont présents dans le cerveau sain à des concentrations relativement élevées (Atwood *et al.*, 1999). Le zinc est présent dans le néocortex (partie extérieure latérale du cerveau) à une concentration de l'ordre de 150 à 200 μM (soit dix fois plus que dans le sang). Libéré dans la fente synaptique lors de la transmission neuronale, il peut alors atteindre des concentrations supérieures à 300 μM . Le cuivre est également très abondant dans le cerveau. Sa concentration est comprise entre 60 et 110 μM . Quand au fer, sa concentration dans l'hippocampe et le cortex cérébral peut atteindre 400-600 μM .

Ces ions métalliques participent à l'activité neuronale au niveau des synapses (zinc et cuivre) et assurent le fonctionnement des métalloprotéines (cytochrome c oxydase, Cu/Zn superoxyde dismutase, ...). Le cuivre est notamment nécessaire pour l'activité d'un certain nombre d'enzymes d'importance physiologique catalysant des réactions redox (Miranda *et al.* 2000), figure 1.27.

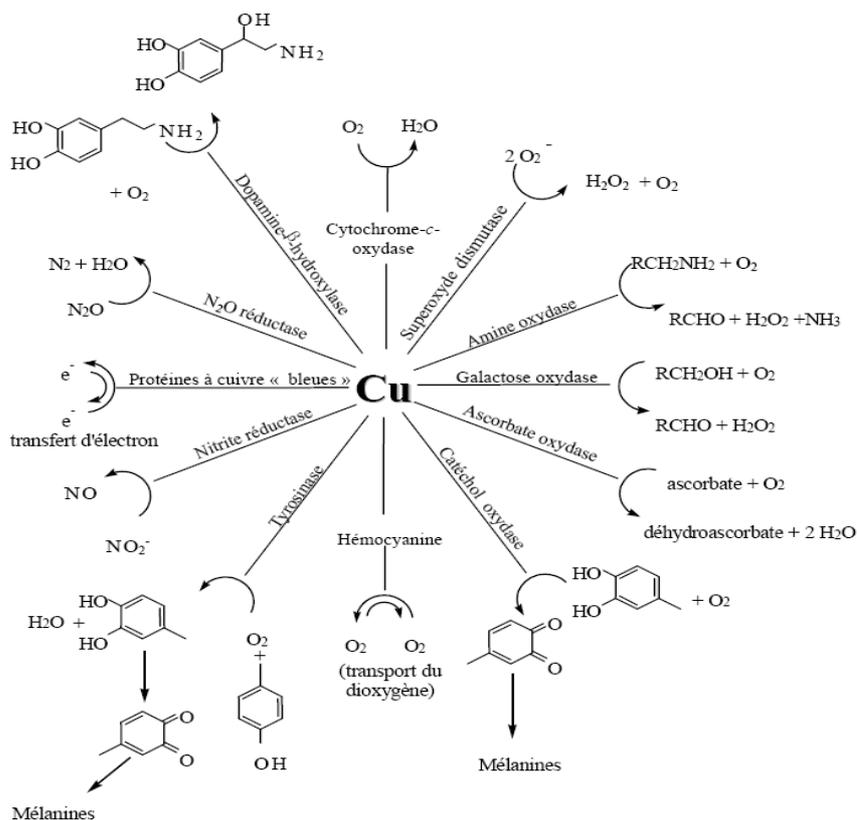


Figure 1.27. *Fonctions métaboliques essentielles des principales enzymes à cuivre*

En tant que cofacteur dans de multiples réactions redox, le Cu est aussi impliqué dans la production d'espèces radicalaires potentiellement toxiques via des réactions de Fenton ou Haber-Weiss (Miranda et al. 2000). Bien qu'essentiel pour la vie et pour le bon fonctionnement d'un certains nombres d'enzymes d'intérêt neurobiologique (tyrosinase, ceruloplasmine, cytochrome c oxydase, dopamine-β-hydroxylase ...), le Cu^{II/I} même lié à certaines molécules peut catalyser la formation de radicaux hydroxyles, les plus dangereux des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Ces ROS peuvent oxyder les protéines, l'ADN, entraîner une peroxydation des lipides (figure 1.28). Le Cu^{II/I} est trop réactif pour exister sous forme libre en quantité importante dans la cellule sans causer de dommages oxydants. Cette remarque vaut également pour le Fe^{III/II}.

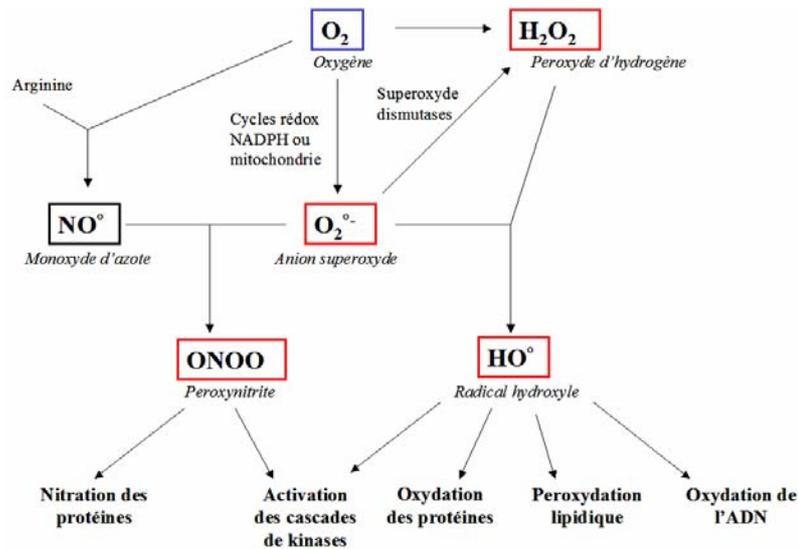


Figure 1.28. Réactivité des ROS

C'est pourquoi, tous les organismes vivants possèdent des mécanismes de contrôle de la concentration du Cu. Parmi ceux récemment élucidés, la séquestration du métal et sa libération à des compartiments spécifiques de la cellule semblent très importantes.

Des études ont en effet montré que le cuivre, le zinc ne sont pas uniformément répartis dans le cerveau (Becker *et al.*, 2005) comme le montre la figure 1.29.

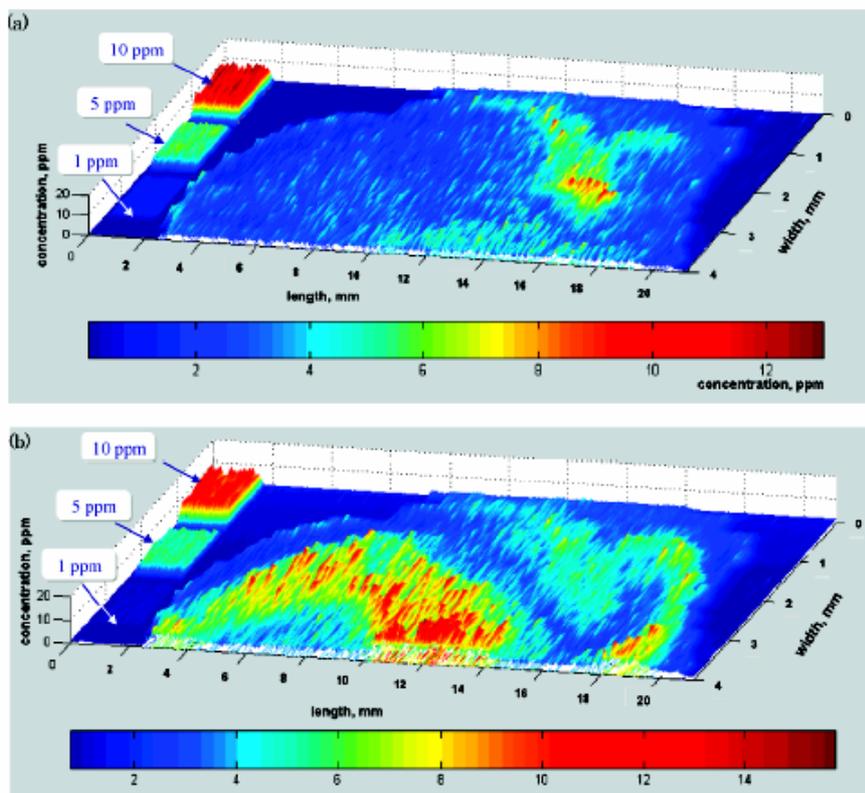


Figure 1.29. Répartition de la concentration en métaux dans le cerveau de zinc (A) et de cuivre (B) mesurée par LA-ICPMS dans l'hippocampe humain. (d'après Becker *et al.* 2005)

Il existe donc des protéines qui transportent les métaux et les libèrent dans des zones spécifiques où ils sont utilisés.

III.1.b Contrôle de la concentration

Ces concentrations élevées en métaux sont permises par des protéines assurant leur stockage dans le cerveau (métallothionéines pour le zinc et le cuivre, ferritine pour le fer) et par des protéines assurant leur transport. Par exemple la famille de protéine ZnT pour le zinc transporte le zinc à travers les membranes. Les « chaperonnes à cuivre » assurent le transfert du cuivre vers sa destination (par exemple les enzymes). La glycoprotéine transferrine est impliquée dans le transport du fer. Par ailleurs, leur concentration dans le cerveau est strictement régulée par d'autres protéines, afin d'éviter des phénomènes toxiques associés à un dérèglement de l'homéostasie des ions métalliques.

Un déséquilibre (soit une déficience soit un excès) des concentrations en cuivre peut avoir de sérieuses conséquences sur l'organisme.

Quand le Cu fait défaut, les cellules ne disposent plus d'assez de cuivre pour les enzymes. Le Cu, étant nécessaire pour le bon fonctionnement de leur site catalytique, l'activité de ces enzymes diminue et conduit à un déclin de l'activité métabolique. Par exemple, la cytochrome c oxydase (CCO), impliquée dans le métabolisme énergétique, est fortement affectée par des concentrations anormalement basses en Cu puisque son centre catalytique ne fonctionne pas sans cuivre. L'activité des enzymes responsables du renouvellement des radicaux libres dans la cellule est aussi fortement affectée quand la quantité de cuivre disponible diminue. Le cas le plus parlant est celui de la superoxyde dismutase (SOD) qui possède du Cu et du Zn dans son centre catalytique et requiert du cuivre pour sa catalyse $2 \text{O}_2^{\cdot -} \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Un excès de cuivre est associé avec le stress oxydant et peut être toxique à la fois au niveau cellulaire et au niveau de l'organisme. Quand Cu^{II} est réduit en Cu^{I} , il est capable de transférer un électron et générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) tels que les radicaux hydroxyles (HO^{\cdot}) (Halliwell et Gutteridge, 1984). Ces radicaux sont responsables de dommages tels que l'oxydation de protéines, la peroxydation des lipides dans les membranes et endommagement de l'ADN.

De l'assimilation aux cellules

Le corps d'un adulte de 70 kg en bonne santé contient moins de 110 mg de Cu répartis ainsi : dans le foie (10 mg), dans le cerveau (8,8 mg), le sang (6 mg) et le squelette (46 mg) et l'architecture des muscles (26 mg) (Gaggelli *et al.*, 2006). Le cuivre est initialement absorbé dans l'intestin. Le foie joue ensuite un rôle central dans la l'homéostasie du cuivre puisque qu'il permet son entrée dans l'organisme. La plupart du cuivre nouvellement absorbé est ensuite incorporé dans la ceruplasmine et sécrété ainsi dans le sang. S'il y a un excès de cuivre, alors il est excrété dans la bile.

2 protéines ATPase dépendante l'ATP7A et l'ATP7B jouent un rôle physiologique important dans la régulation du cuivre, comme le montre la figure 1.30.

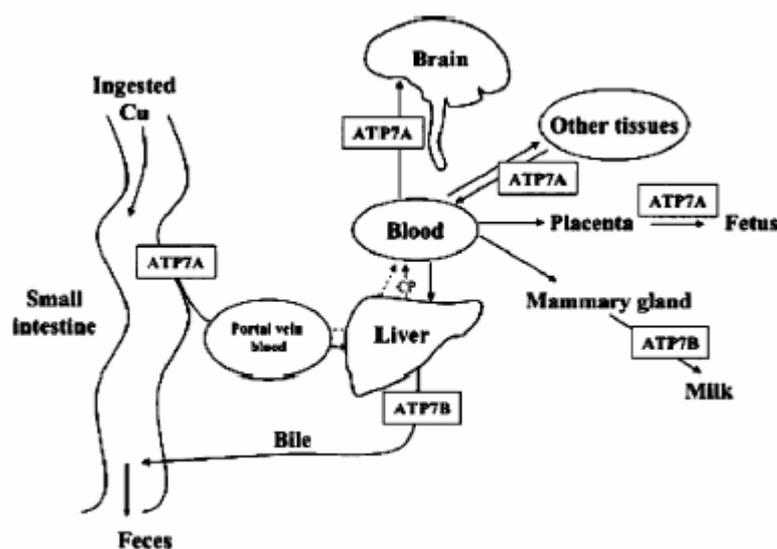


Figure 1.30. Modèle de la régulation du cuivre chez les mammifères. L'ATP7A et l'ATP7B sont impliquées dans la régulation et la distribution du cuivre (d'après Mercer et Llanos, 2003).

Le transport du cuivre jusqu'au cerveau requiert le passage de la barrière hémato-méningée. Cette étape est bloquée dans le cas de la Maladie de Menkes, où le gène codant pour l'ATP7B est déficient, suggérant que cette protéine est impliquée. Le cuivre est alors amené jusqu'aux neurones et aux astrocytes par la protéine hCtr1.

Dans les cellules

Le maintien de l'homéostasie du cuivre dans la cellule requiert des transporteurs membranaires de cuivre et une famille de protéines, appelées « chaperonnes du cuivre » qui délivrent le Cu^{II} à une cible spécifique (figure 1.31). Ces transporteurs du cuivre et

ces protéines chaperonnes ont été identifiés chez les procaryotes mais sont aussi présents chez les mammifères, avec une étonnante similarité des systèmes de circulation du cuivre dans les cellules. La figure 1.31 illustre leur rôle.

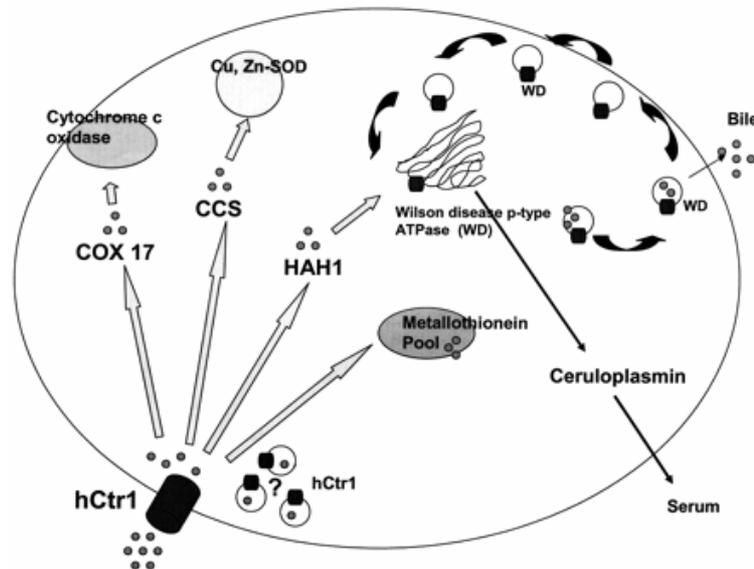


Figure 1.31. Modèle de circulation du cuivre dans une cellule (hépatocyte) (d'après Shim et Harris, 2003). Le cuivre entre via une protéine membranaire de transport hCtr1. Une fois à l'intérieur, plusieurs possibilités de distribution existe : (i) rejoindre le pool de cuivre des métallothionéines. (ii) transport par « la chaperonne à cuivre » Cox17 à la cytochrome c oxydase. (iii) fixation du cuivre à la CCS pour être ensuite délivré à la SOD Cu,Zn . (iv) distribution à l'ATPase de type P de la maladie de Wilson, située dans l'appareil trans-Golgi par HAH1.

hCtr1

La hCtr1 (de l'anglais « Human Copper Transporter ») est une protéine de 190 acides aminés contenant un domaine N-terminal extracellulaire riche en Histidine et en Méthionine. Elle se situe dans le plasma membranaire et permet au cuivre de passer à travers les membranes. Elle participerait aussi à la compartimentation intracellulaire de ce métal.

Les Métallothionéines

Les métallothionéines (MTs) constituent une famille de polypeptides riches en cystéine avec de faibles poids moléculaires (4-8 kDa). Elles sont capables de chélater les ions métalliques tels que le Cd(II), le Zn(II) et le Cu(I). Elles sont composées de deux domaines (α et β), chacun présentant des clusters métal-thiolate. Plusieurs rôles leurs sont attribués : (i) détoxification des métaux non essentiels tels que le cadmium et le mercure ; (ii) détoxification de l'excès de métaux essentiels tels que le cuivre et le zinc ; (iii)

séquestration des radicaux et des espèces réactives de l'oxygène ; (iv) transfert et transport des métaux lourds.

Les protéines « chaperonnes à cuivre ».

Les protéines chaperonnes du cuivre ont d'abord été mises en évidence dans la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* puis des homologues ont été isolées chez les souris, le mouton et l'homme. Elles conduisent le Cu^I dans le cytoplasme et le transfèrent directement jusqu'à des protéines spécifiques.

Atox1 ou HAH1

C'est une petite protéine de 68 acides aminés. Elle fixe le Cu^I entré dans la cellule, et le transfère à des protéines cibles via la chemin de la figure 1.31.

Elle est le prototype même de la protéine chaperonne jouant le rôle de récepteur soluble du cuivre(I) cytoplasmique en fixant 2 ou 3 ions dans son site actif. Elle adapte sa structure en fonction de l'échange à effectuer en créant des interactions spécifiques avec la protéine cible facilitant ainsi le mécanisme de transfert entre les deux sites de fixation du donneur et de l'accepteur.

CCS

La protéine chaperonne qui a pour cible la Superoxyde dismutase (SOD) est appelée CCS (de l'anglais « copper chaperon superoxide dismutase »). Elle est responsable de l'incorporation du cuivre dans la SOD1. La comparaison de la séquence des acides aminés de la SOD1 et de la CCS a révélé une homologie remarquable entre l'enzyme et sa protéine chaperonne.

Cox 17

La troisième protéine chaperonne classique est la Cox17. C'est une petite protéine de 8 kDa nécessaire au bon fonctionnement de la CCO. Elle est à la fois présente dans le cytoplasme et dans l'espace intermembranaire des mitochondries. Elle délivre le cuivre à la CCO.

Bien entendu, cette liste n'est pas exhaustive. Il existe une multitude d'autres protéines intervenant dans le transport du cuivre et dans la maintien de sa concentration.

III.1.c Dérégulation des métaux et maladies

Une dérégulation (soit déficience soit un excès) entraîne des dysfonctionnements dans l'organisme. Bon nombre de maladies sont d'ailleurs associées à des dérégulations de l'homéostasie des métaux, comme le montre le tableau 1.2 (Murali Doraiswamy et Finefrock, 2004)

Neurodegenerative disorders with possible metal-associated pathology		
Disorder implicated	Metal implicated	Metalloproteins or enzymes
AD	Copper, iron, zinc	A β , APP
PD	Iron	α synuclein, neuromelanin, lactoferrin, ferritin, melanotransferrin, ceruloplasmin,ivalent cation transporter
Creutzfeldt-Jakob disease	Copper, iron	Prion protein
Familial amyotrophic lateral sclerosis	Copper, zinc deficiency	Superoxide dismutase 1
Lewy-body dementia	Iron	α synuclein
Friedreich's ataxia	Iron	Frataxin, aconitase, mitochondrial proteins
Carotid atherosclerosis	Copper, iron	Proteins in vessel wall
Tardive dyskinesia	Iron	Dopamine pathways
Multiple sclerosis	Iron	Not known
Wilson's disease	Copper, zinc deficiency(?)	Ceruloplasmin deficiency, Wilson's protein
Progressive supranuclear palsy	Iron	α synuclein
Hallervorden-Spatz syndrome	Iron	Vitamin B5 metabolism (?)
Multisystem atrophy	Iron, copper	α synuclein (?), ceruloplasmin (?)
Huntington's disease	Iron, calcium	Huntingtin
Familial basal ganglia degeneration	Iron	Ferritin
Down's syndrome	Copper, iron, zinc	A β
Cataracts	Copper, iron	α crystallin
Haemochromatosis	Iron	α synuclein, haemochromatosis gene products
Cerebral haemorrhage, head injury	Iron	None

Tableau 1.2 Maladie neurodégénérative et le rôle possible des métaux (Murali Doraiswamy et Finefrock, 2004)

Les cas les plus évocateurs pour le cuivre sont les maladies de Menkes et de Wilson.

La maladie de Menkes est une affection due à un défaut du transport du cuivre de l'intestin vers le sang. Il en résulte un déficit en cuivre libre, dont découlent des lésions diffuses (des artères, du squelette, des cheveux, du cerveau...). Cette pathologie affecte environ 1/300 000 naissances. Elle est liée à une mutation d'un gène localisé en Xq13.3, codant pour une protéine transporteuse du cuivre, MNK, comportant 6 sites de transport du cuivre et 6 à 8 domaines transmembranaires, appelée Cu²⁺ Transporting ATPase alpha polypeptide (ATP7A). Cette protéine circule entre l'appareil de Golgi et la membrane cytoplasmique où elle intervient pour le transport du cuivre vers l'extérieur de la cellule. Des mutations au niveau du gène entraînent un défaut de production de cette protéine, et donc un défaut d'absorption intestinale du cuivre. La fonction des enzymes cuivre

dépendante (cytochrome-oxydase, tyrosinase, lysyloxydase, monoamine oxydase , ascorbate oxydase) est alors perturbée, expliquant les symptômes de la maladie : l'hypothermie, la dépigmentation des cheveux et de la peau, les lésions de l'intima des vaisseaux, la tortuosité des cheveux, la déminéralisation du squelette. Le déficit en dopamine-bêta-hydroxylase, enzyme également cuivre dépendante, pourrait également jouer un rôle dans les symptômes de cette maladie.

La maladie de Wilson est une maladie génétique autosomique récessive caractérisée par une accumulation toxique de cuivre essentiellement dans le foie et le système nerveux central. Il s'agit d'une maladie rare, puisque l'incidence estimée en France est de 1/30 000 à 1/100 000 nouveaux cas par an. Sa prévalence est estimée à 1/25 000. Cette maladie résulte d'une mutation du gène d'un transporteur de métaux lourds, l'ATP7B porté par le chromosome 13 (analogue de l'ATP7A dans la maladie de Menkes). Elle se traduit par une insuffisance de fabrication de la cerruplasmine, glycoprotéine qui intervient dans le transport du cuivre. On assiste à une dégénérescence (modification des tissus) de certaines zones du cerveau. D'autre part, les scientifiques ont observé des dépôts de cuivre dans le foie (à l'origine d'une cirrhose : dégénérescence du foie), dans la peau qui devient de coloration grisâtre, et dans la cornée. Cette maladie est l'une des rares affections génétiques à pouvoir être traitées avec efficacité grâce, en particulier, à l'utilisation de chélateurs de cuivre et de zinc.

III.2 Cuivre et espèces réactives de l'oxygène (ROS)

L'oxygène moléculaire peut générer, en présence de métaux de transition tels que le Cu^{I} ou le Fe^{II} , des espèces réactives de l'oxygène (ROS, figure 1.32, éq. 2-4) parmi lesquelles l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle OH^{\cdot} obtenu par des réactions de type Fenton (éq. 4) ou Haber-Weiss (éq. 6).

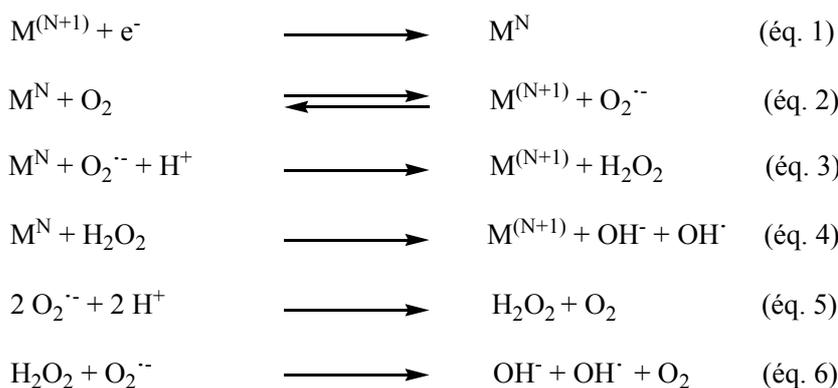


Figure 1.32. Principales réactions conduisant à la production des espèces oxygénées réactives ($M^N = Cu^I, Fe^{II}$)

Le Cu^{II} , même lié à des protéines, peut être réduit en Cu^I et catalyser la production de ROS en présence de réducteurs biologiques tels que l'ascorbate ou de glutathion. Cela dépend en fait de la liaison entre le Cu^{II} et la protéine. L'enchaînement des réactions aboutissant notamment à la génération de HO^\cdot peut alors commencer (figure 1.32).

« A l'état normal » des espèces réactives de l'oxygène sont produites dans les cellules mais des composants du système de défense les prennent en charge et les transforment. Par exemple, les superoxyde dismutases catalysent la conversion des anions superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène. La catalase catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et en eau. Le problème intervient lorsque ces enzymes ne sont plus capables de détoxifier la cellule. Cela arrive lorsque l'activité de ces enzymes diminue ou lorsque la quantité de ROS produite est trop importante.

III.3 Cuivre et MA

Parmi tous les facteurs biologiques en relation avec la maladie d'Alzheimer, les métaux tiennent une place essentielle.

III.3.a Concentration

Le processus de vieillissement, en relation avec la dérégulation du métabolisme énergétique, conduit à une diminution du contrôle strict de la teneur et de la distribution des ions métalliques dans les différents organes. Les concentrations de cuivre et de fer

augmentent dans de nombreux tissus, et dans le cerveau en particulier, lorsque l'âge de l'individu augmente (Atwood *et al.*, 1999). Ce fait est particulièrement important dans la mesure où ces ions métalliques présentent une forte activité redox dans les conditions physiologiques (à pH = 6–7 et en présence d'oxygène moléculaire) lorsqu'ils ne sont plus intégrés dans le site actif des métalloenzymes ou dans les protéines chargées de les stocker ou de les transporter et au sein desquelles la réactivité redox est contrôlée.

Suite à cette augmentation des concentrations en métaux dans le cerveau avec l'âge, on retrouve ceux-ci en relation avec la maladie d'Alzheimer. Ainsi, de nombreuses études relatent un métabolisme perturbé des ions métalliques dans le cerveau des malades d'Alzheimer et indiquent que les concentrations de cuivre, de zinc et de fer sont plus élevées que la normale, et plus particulièrement dans les lésions caractéristiques de la maladie (plaques amyloïdes) et à proximité de celles-ci (tableau 1.3) (Atwood *et al.*, 1999; Lovell *et al.*, 1998).

	Cuivre (μM)	Fer (μM)	Zinc (μM)
Plaques séniles	393	940	1055
Neuropile - malade d'Alzheimer	304	695	786
Neuropile - contrôle sain	69	338	346

Tableau 1.3. Concentrations en ions métalliques dans les plaques amyloïdes et le neuropile de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (d'après (Atwood *et al.*, 1999)).

III.3.b Agrégation

Les métaux influencent l'agrégation du peptide A β ; en général, ils l'accélèrent. Le processus d'agrégation étant l'étape clé de la maladie, cela leur conférant un rôle central.

L'importance du zinc dans la formation des plaques amyloïdes a été montrée en utilisant par exemple le transporteur de zinc ZnT3, responsable du transport de l'ion métallique dans les vésicules synaptiques. Ainsi, des souris transgéniques Tg2576 surexprimant APP (et donc développant des plaques amyloïdes) mais knock-out pour le gène codant protéine ZnT3 ont un taux de plaques réduit et une quantité de A β soluble augmentée à la suite de la suppression du pool de Zn^{II} éjecté dans la fente synaptique (Lee *et al.*, 2002). Une autre étude chez des lapins modélisant la maladie d'Alzheimer a montré que des traces de cuivre dans l'alimentation (à une concentration égale à 10 % de la concentration limite acceptée pour l'eau potable) sont suffisantes pour induire la

formation de plaques amyloïdes et générer des problèmes d'apprentissage (Sparks et Schreurs, 2003).

Chez les rongeurs, la faible affinité de A β 40 pour les métaux se traduit par le fait que le A β 40 de rat est inaffecté par la présence de zinc ou de cuivre à des concentrations de l'ordre du micromolaire (Atwood *et al.*, 1998), ce qui permet d'expliquer la rareté avec laquelle ces animaux forment des plaques amyloïdes avec l'âge (Higgins et Jacobsen, 2003).

Enfin, nous avons vu dans la partie II, que les chélateurs d'ions métalliques tels que l'EDTA et le DTPA permettent de solubiliser A β 40 ou A β 42 agrégé en présence d'ions métalliques *in vitro* (Atwood *et al.*, 1998; Atwood *et al.*, 2000). Leur utilisation est l'une des voies envisagées pour trouver un médicament efficace contre le développement de la maladie.

Tous ces derniers résultats confirment bien l'implication des ions métalliques dans la précipitation du peptide A β .

III.3.c Toxicité

Le cuivre et le fer, en raison de leurs propriétés redox, peuvent générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme nous l'avons vu au chapitre III.2.

Le peptide A β , en présence d'ions métalliques Fe ou Cu et de réducteurs biologiques extérieurs tels que l'ascorbate, la dopamine ou le cholestérol (Opazo *et al.*, 2002), est capable de générer du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Huang *et al.*, 1999a; Opazo *et al.*, 2002). Ces ROS directement produits par les complexes Cu^{II}-A β pourraient être impliquées dans la maladie d'alzheimer, un excès de ROS aboutissant à la mort des cellules. C'est d'ailleurs une hypothèse de plus en plus répandue.

IV. Les complexes Métaux – A β

Une étude récente de microscopie couplée au Raman sur des plaques amyloïdes *post-mortem* a montré que A β est une protéine liant le cuivre et le zinc *in vivo* (Dong *et al.*, 2003). L'interaction métal-A β pourrait être impliquée dans la maladie d'Alzheimer.

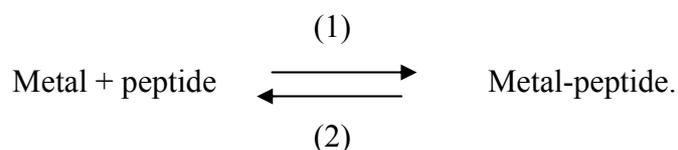
Les études sur la relation entre l'A β , le Cu, le Zn, l'agrégation et la toxicité se multiplient. Ce chapitre fait le point sur les dernières avancées.

IV.1 Sites de fixation et constante de dissociation

Il a été proposé que le site de fixation des métaux sur le peptide A β se situe sur les 16 premiers acides aminés de la séquence. De nombreuses études sur l'interaction métal-A β ont donc été réalisées sur des peptides modèles A β 16 (16 premiers acides aminés) et A β 28 (28 premiers acides aminés). Ce sont de bons modèles étudier la complexation sous forme soluble. Cependant ces formes tronquées n'agrègent pas (A β 16) ou très lentement (A β 28) comme le font les peptides A β 40 et 42 et ne peuvent mimer la liaison métal-A β dans l'état agrégé.

La notion de constante de fixation du métal sur les peptides ou les protéines est un paramètre important en biologie. Il renseigne sur la signification physiologique de l'interaction d'une protéine ou d'un peptide avec un métal. Une constante d'affinité trop faible indique que le peptide ne sera pas capable de lier le métal *in vivo* en raison de la présence d'un certain nombre de ligands plus forts. Il est aussi important de connaître ce paramètre dans le but de concevoir des chélateurs capables d'arracher le métal à l'A β . De tels chélateurs peuvent être des médicaments puisqu' en reprenant le métal à l'A β , ils devraient ralentir l'agrégation et diminuer sa toxicité.

La notion de fixation du métal correspond en fait à l'équilibre entre les formes libres du métal et de la protéine et le complexe lui même.



La constante d'affinité est donnée par la relation $K_a = \frac{[\text{Métal-peptide}]}{[\text{Métal}][\text{peptide}]}$. Cependant, en biologie, on utilise souvent la constante de dissociation K_d correspondant à la réaction (2) inverse (c'est-à-dire de la dissociation du complexe). La relation entre le K_a et le K_d est : $K_d = 1/K_a$. Le K_d présente l'avantage d'exprimer directement une concentration.

Par ailleurs, les constantes sont déterminées dans des tampons, qui ont eux aussi une affinité pour le cuivre, à un pH donné. Il y a une compétition pour la fixation du cuivre entre le tampon et le peptide. Les constantes déterminées sont donc des constantes apparentes. Pour obtenir la constante absolue, il faut tenir compte de l'affinité du tampon pour le métal. En général, les constantes d'affinité métal-protéine sont déterminées dans des conditions expérimentales similaires et les constantes apparentes sont comparées directement.

IV.1.a Cu^{II} -A β

Bush *et al.* ont prouvé que l'A β (et ses formes tronquées) était capable de fixer 2 équivalents de Cu^{II} avec des constantes de dissociation différentes, faisant ainsi apparaître un site de forte affinité et un site de fixation plus faible.

Des études de RPE, de RMN ou encore de spectroscopie Raman ont permis d'identifier des résidus impliqués dans la chélation des ions métalliques, situés dans le domaine 1-16 de A β . La coordination est dépendante du pH, mais nous ne développerons ici que les complexes formés à des pH entre 6 et 8 (proche du pH physiologique).

Garzon-Rodriguez *et al.* ont mesuré les constantes d'affinité du Cu^{II} pour le peptide A β 40 et 42 sur le site de plus forte affinité en suivant la fluorescence due à la Tyrosine (en position 10). Les expériences ont révélé des constantes de dissociation de l'ordre de 2 μM dans un tampon Tris. Des expériences similaires, dans le même tampon, ont été menées par Karr *et al.*, révélant des constantes K_d de 11, 28, 47 μM respectivement pour les peptides A β 40, A β 28 et A β 16. Cependant ces constantes sont des constantes apparentes car les expériences ont été réalisées dans un tampon qui lui aussi possède une affinité pour le cuivre. Il y a donc compétition entre le tampon et le peptide. Pour s'affranchir de ce paramètre, Syme *et al.* ont effectué des mesures sans tampon par compétition avec 2 ligands du cuivre (Histidine et Glycine). Ils ont ainsi encadré le K_d apparent du A β 28 entre 1.5 et 500 nM. Si on tient compte du tampon utilisé (et de son affinité pour le cuivre), les K_d sont similaires. Le peptide A β soluble et les peptides modèles plus courts exhibent à pH physiologique un K_d apparent de l'ordre du nM à pH 7,4.

IV.1.b Zn^{II}-A β

Des études basées sur l'augmentation du signal en fluorescence de la Tyrosine10 suite aux ajouts successifs ont révélé des constantes Kd de 300 μ M pour l'A β 40 et 57 μ M pour l'A β 42 (Garzon-Rodriguez *et al.*, 1999). Cependant cette étude a été effectuée dans un tampon Tris/HCl à pH 7,4 qui a une affinité non négligeable pour le zinc, pouvant ainsi entraîner une sous-estimation de la constante d'affinité. Enfin une étude récente par compétition avec un chélatant du zinc, le zincon (2-carboxy-2-hydroxy-5-(sulfoformazyl) benzène) a permis de détecter une constante apparente de $\sim 10^{-5}$ M (Mekmouche *et al.*, 2005). Une fois encore, si on tient compte de l'affinité du tampon pour le zinc, les résultats de ces deux études sont en accord.

D'une façon générale, on peut donc dire que l'A β et ses modèles possèdent pour le zinc une affinité de l'ordre du μ M ($\sim 10\mu$ M). L'A β a donc une affinité plus forte pour le cuivre que pour le zinc. Cela a d'ailleurs été confirmé par le fait que le cuivre est capable de déplacer le zinc fixé sur A β à pH 6,6 (Atwood *et al.*, 2000).

IV.1.c Fe^{II}-A β

Les seules données sur l'affinité du fer avec l'A β sont avec du Fe^{II}. (Garzon-Rodriguez *et al.*, 1999). Les expériences ont été réalisées dans un tampon Tris/HCl à pH 7,4 en présence d'ascorbate pour maintenir le fer sous sa forme réduite. Les Kd apparents reportés sont de 13 μ M et 0,33 μ M respectivement pour A β 40 et A β 42.

Aucune référence sur l'affinité du Fe^{III} pour l'A β ne figure dans la littérature.

IV.1.d Signification biologique de ces sites de fixation des métaux

La première question est de savoir si les concentrations des ions métalliques sont assez fortes pour que l'A β puisse les lier, c'est-à-dire si les concentrations de ces ions, sous forme libre, sont du même ordre de grandeur que les Kd apparents.

Les analyses en spectroscopie Raman ont mis en évidence que les métaux étaient liés à l'A β dans ces plaques. Cependant, les plaques amyloïdes sont riches en Cu, Fe et Zn, et il faut garder à l'esprit que l'A β est certes le principal mais pas le seul composant des plaques séniles. Ces métaux pourraient donc être aussi liés à ces autres constituants.

La concentration intracellulaire des ions est parfaitement contrôlée et les teneurs en Cu^{II} et Zn^{II} libre sont très faibles (Finney et O'Halloran, 2003). Il en est certainement

de même pour les neurones et les autres cellules du cerveau. Les métallothionéines sont réparties dans tout le cerveau à des concentrations de plusieurs μM . Leur constante d'affinité pour le Cu^{I} est estimée comme supérieure à 10^{14} M^{-1} et pour Zn-MT3 $6 * 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Elles sont donc à des concentrations proches de celles des ions métalliques et avec des affinités beaucoup plus élevées que l'A β . Cela signifie donc que dans des conditions normales, l'A β n'est pas capable de fixer le zinc ou le cuivre dans le cytosol.

Dans le domaine extracellulaire, les conditions sont différentes. Le Cu et le Zn peuvent atteindre des concentrations de l'ordre de 15 μM à 300 μM respectivement dans certaines régions, leur distribution n'étant pas uniforme. Cela laisse donc supposer que l'A β a accès à ces pools de cuivre et de zinc malgré la présence probable d'autres protéines capables de les fixer avec une affinité plus importante.

IV.2 Chimie de coordination

La coordination des ions métalliques à l'A β a des conséquences majeures sur celui-ci : les ions métalliques sont responsables de l'amplification du phénomène d'agrégation de l'A β mais aussi de sa toxicité par le biais de modifications physiques (conformationnelles) et chimiques dues à la présence de ROS.

De nombreuses études ont cherché à déterminer quels étaient les ligands mis en jeu pour les différents complexes métal-A β .

IV.2.a Cu^{II}-A β

Des études de RPE, de RMN ou encore de spectroscopie Raman ont permis d'identifier des résidus impliqués dans la chélation des ions métalliques, situés dans le domaine 1-16 de A β . La coordination est dépendante du pH, mais nous ne développerons ici que les complexes formés à des pH entre 6 et 8 (proches du pH physiologique).

A pH 7,4, le complexe formé est hétérogène, mélange entre 2 formes avec des environnements 3N/1O ou 4N pour le Cu^{II} (Miura *et al.*, 2000; Syme *et al.*, 2004). La forme majoritaire est un complexe plan carré légèrement déformé avec un environnement 3N/1O. La forme minoritaire fait elle intervenir une coordination avec 4N.

De nombreuses études (RMN, remplacement d'une Histidine par un autre acide aminé ..) ont montré que les 3 His (en positions 6, 13 et 14) de A β participent à la chélation des ions métalliques Cu et Zn (Atwood *et al.*, 1998; Curtain *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1999; Miura *et al.*, 2000; Syme *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2000). Elles participent à la liaison du cuivre par un atome d'azote. Cependant il y a au moins un autre ligand. Concernant ce quatrième résidu impliqué dans la chélation, plusieurs suggestions ont été proposées : allant de l'oxygène de la Tyr¹⁰ (Miura *et al.*, 2000), à la fonction NH₂ terminale (Syme *et al.*, 2004), aux résidus carboxylates (sur Asp¹, Glu³ ou Glu¹¹) (Karr *et al.*, 2005) ou encore des azotes du squelette peptidique à pH basique (Miura *et al.*, 2000). Dans un premier temps la Tyr10 avait été proposé comme ligand potentiel (Miura *et al.*, 2000) mais des études récentes l'ont exclue (Syme *et al.*, 2004; Karr *et al.* 2005). Pour la forme 4N, il semble que ce soit le NH₂ terminal. Cependant le ligand oxygène impliqué dans la forme majoritaire, n'a pas été identifié. La détermination de ce quatrième ligand oxygène a constitué une partie de nos travaux (chapitre 2).

L'une des histidines pourrait par ailleurs être un résidu pontant entre deux atomes de cuivre (Curtain *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2006). Un schéma de coordination ressemblant à celui de la superoxyde dismutase et favorisant des structures dimériques ou multimériques a ainsi été proposé (figure. 1.33). L'histidine pontante pourrait également favoriser des ratios A β : Cu > 1, des stœchiométries pouvant aller jusqu'à 2,5 Cu par A β et une coopérativité forte ayant été rapportées dans la littérature (Atwood *et al.*, 2000).

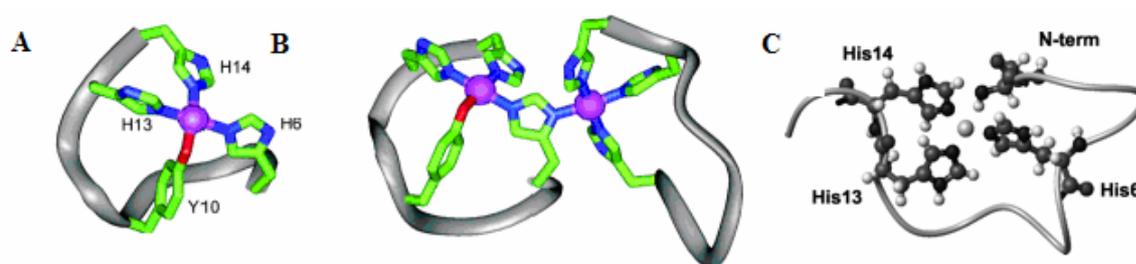


Figure. 1.33. Exemples de modèles du site de coordination de Cu^{II} lié à A β (d'après (Curtain *et al.*, 2001)). (A) Site de coordination monomérique dans un environnement 3N1O. (B) Proposition de modèle dimérique mettant en jeu une histidine pontante entre deux atomes de Cu^{II}, expliquant la fixation coopérative des ions métalliques et la formation d'espèces dimériques. Une structure dimérique avec une histidine pontante et deux sites de coordination identiques pour les Cu^{II} (3N1O) a également été envisagée (Smith *et al.*, 2006). (C) Modèle proposé par Syme *et al.* avec le N-terme comme 4^{ème} ligand.

IV.2.b Zn^{II} -A β

Il a été montré que le site de fixation du zinc est dans la même partie N-terminale hydrophile composée des acides aminés 1 à 16 (A β 16) que pour le Cu^{II} . (Kozin *et al.*, 2001).

Plusieurs études montrent clairement que les 3 His en position 6,13 et 14 sont impliquées. Le remplacement de l'His13 par une Arg diminue l'affinité pour le Zn ainsi que l'induction de l'agrégation. (Liu *et al.*, 1999). Yang *et al.* ont reporté que le remplacement des His13 ou His14 par une Ala empêche le Zn de favoriser le changement de conformation en feuillet- β et l'agrégation du A β 28. Comme dans le cas du cuivre, le 4^{ème} ligand pour Zn^{II} fait débat.

Pour ce site, à haut pH, le 4^{ème} ligand a été identifié. Il semble s'agir de l'Asp1 qui lierait le cuivre par sa fonction oxygène (Mekmouche *et al.*, 2004). Cela a été confirmée par Syme *et al.*, 2006.

Une étude récente à pH 6,5 n'est cependant pas en accord avec ces dernières et propose le Glu11 et non l'Asp1 comme 4^{ème} ligand. (Zirah *et al.*, 2006).

IV.2.c Fe^{III} -A β

Peu d'études ont été rapportées sur la coordination du Fe à l'A β et celles qui existent ont été réalisées exclusivement avec le Fe^{III} . Le Fe^{III} est fortement insoluble en solution aqueuse en raison de sa précipitation avec les ions hydroxydes. La constante de solubilité de $[Fe^{III}(OH)_3]$ est de $6 \cdot 10^{-38} M^3$. Cela signifie qu'à pH 7, les concentrations en Fe^{III} doivent être inférieure à $10^{-17} M$ pour être sûr qu'il soit soluble. Des ligands tels que le citrate, l'oxalate ou l'acide nitriloacétique, qui forment des complexes parfaitement caractérisés avec le Fe^{III} , sont donc souvent utilisés pour le stabiliser.

Des études en spectroscopie Raman (Miura *et al.*, 2000) sur l'A β 16 et l'A β 40 ont montré que, sous forme soluble, ou précipitée la sphère de coordination du métal était composée du tyrosinate et de carboxylates provenant de l'Asp et du Glu. Les His ne sont pas impliquées. Cependant ces expériences ont été effectuées en excès de Fe (4 équivalents par rapport à l'A β) et sans stabilisation du Fe^{III} . La formation de précipités d'hydroxyde a été observée et gêne les interprétations. D'autres études devraient être réalisées avec un ligand pour stabiliser le Fe^{III} en solution pour confirmer l'interaction

entre le Fe et l'A β . Il semble cependant que le Fe^{III} puisse lier l'A β puisqu'il influence l'agrégation de l'A β 42 (House *et al.*, 2004).

IV.2.d Autres métaux

Mekmouche *et al.* ont utilisé le Cd^{II} pour mimer la liaison de l'A β 16 avec le Zn^{II}. En RMN ¹H, les résonances les plus affectées par addition de Cd^{II} ou de Zn^{II} sont les mêmes, à savoir les 3 His. et à haut pH (pH ~ 8.7) l'Asp1. Cependant les résonances ne sont pas affectées de la même façon. L'addition de Zn^{II} conduit à une diminution du signal alors que l'addition de Cd^{II} aboutit à son déplacement (shift de quelques ppm).

Des études avec du Co^{II}, souvent utilisé pour mimer le comportement du zinc, ont également été réalisées avec les peptides A β 16, A β 20 en milieu non aqueux, dans du d₆-DMSO (Da Silva *et al.*, 2005). L'addition de Co^{II} conduit à un déplacement des résonances attribuées aux NH des His de 40 à 80 ppm, caractéristique de la formation d'une liaison His-Co^{II}. Par ailleurs, comme les 3 signaux des imidazoles des 3 His sont observés, il n'y a pas de pont histidine (et donc pas de formation de cluster via des His pontées). La Tyr10 a été exclue comme ligand potentiel et aucune indication n'a été obtenue à propos du N-terminal.

IV.2.e Dans les plaques amyloïdes

Une étude en spectroscopie Raman a été effectuée sur des plaques amyloïdes issues de patients d'Alzheimer. Elle a montré que le Cu^{II} et le Zn^{II} étaient liés par les His. Aucune indication n'a été trouvée concernant une liaison Cu^{II} ou Fe^{III}-tyrosinate. Par ailleurs, dans le cas du Cu^{II}, une compétition avec un ligand tel que l'EDTA (capable de « l'arracher » à l'A β) diminue l'intensité de la bande attribuée à la liaison Cu^{II}-His, confirmant les résultats. De plus une autre bande attribuée à une liaison C=O (backbone) ou à un carboxylate (de l'Asp ou Glu) lié à l'ion métallique est aussi réduite avec l'EDTA (Dong *et al.*, 2003). Elle est d'une importance majeure puisque c'est la seule sur la liaison des métaux aux plaques amyloïdes in vivo. Cependant l'attribution des bandes pour de tels complexes n'est pas aisée et elle doit être complétée par d'autres pour connaître exactement la liaison des métaux aux plaques in vivo.

IV.3 Agrégation

Des études *in vitro* ont permis de caractériser ce phénomène. Ainsi, le Zn^{II} à des concentrations physiologiques (≥ 300 nM) induit l'agrégation rapide d'A β 40 (par comparaison à l'agrégation lente en absence de métal) en structures de type amyloïde résistantes aux protéases (Bush *et al.*, 1994a; Bush *et al.*, 1994b; Huang *et al.*, 1997). Le Cu^{II} , et dans une moindre mesure le Fe^{III} induisent également la précipitation de A β à pH = 7,4 (Atwood *et al.*, 1998). La précipitation de A β 42 est de plus fortement accrue par rapport à A β 40, quelles que soient les conditions. Ainsi, dans le cas du cuivre, des traces de Cu^{II} ($< 0,1$ μ M) suffisent à induire la précipitation du peptide (Atwood *et al.*, 2000).

Le phénomène de précipitation est d'autre part amplifié à pH acide (pH = 6,6), dans le cas du Cu^{II} comme du Fe^{III} (Atwood *et al.*, 1998). Or le pH au sein du cerveau a tendance à s'acidifier légèrement lors de la maladie d'Alzheimer suite à un phénomène d'inflammation, favorisant ainsi la précipitation de A β par le cuivre et le fer.

IV.4 Toxicité

Il est désormais admis que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que HO^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$ générées sous des conditions de stress oxydant jouent un rôle clé dans les maladies neurodégénératives.

Il existe une relation évidente entre les ROS et la toxicité de l'A β pour les neurones (Bush, 2003). De nombreuses études ont montré qu'A β est toxique *in vitro* et *in vivo* en relation avec la présence d'ions métalliques redox actifs trouvés associés aux lésions amyloïdes dans des cerveaux *post-mortem* (Sayre *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1997a) (se reporter à (Ali *et al.*, 2004; Cuajungco *et al.*, 2005; Tabner *et al.*, 2002) pour différentes revues sur ce sujet). La présence de peptide A β oxydé sur Met³⁵, retrouvé associé aux métaux Cu^{II} et Zn^{II} dans les plaques amyloïdes *post mortem*, traduit également un environnement pro-oxydant au niveau de ces plaques (Dong *et al.*, 2003).

Le peptide A β , en présence d'ions métalliques Fe^{III} ou Cu^{II} et de réducteurs biologiques extérieurs tels que l'ascorbate, la dopamine ou le cholestérol (Opazo *et al.*, 2002), est capable de générer du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Huang *et al.*, 1999a;

Opazo *et al.*, 2002). Le peptide A β 42 est deux fois plus réactif que l'A β 40, lui-même étant 5 fois plus actif que l'A β 28.

Il a également été rapporté que le peptide A β 42, et dans une moindre mesure A β 40, sont capables de réduire, par eux même, le Cu^{II} et le Fe^{III} coordonnés en Cu^I et Fe^{II} respectivement, alors que les formes plus courtes (telles que A β 28) ou le A β 40 de rat ne le peuvent pas (Huang *et al.*, 1999a). Il est à noter que le potentiel de réduction formel de Cu^{II} en Cu^I par A β 42 reporté dans la littérature est fortement positif (environ + 730-780 mV par rapport à ENH) et caractéristique des cuproprotéines réductrices, suggérant que la forme Cu^I est stabilisée par le peptide (Huang *et al.*, 1999b). L'origine des électrons lors de la réduction peut être aussi due à la présence d'agents réducteurs, ou encore impliquer directement les résidus Met³⁵ ou Tyr¹⁰ de A β , oxydables en espèces radicalaires Met-S^{•+} ou Tyr-O[•] (Barnham *et al.*, 2004b; Varadarajan *et al.*, 1999).

Les complexes de Cu^I et Fe^{II} peuvent ensuite réagir avec O₂, H₂O₂ ou O₂^{•-}, s'il n'est pas consommé dans le milieu biologique par des mécanismes de défense tels que la catalase ou la glutathione peroxydase, pour produire des radicaux hydroxyles via une réaction de type Fenton. Des études de RPE ont montré *in vitro* la présence de radicaux hydroxyles associée aux complexes Cu^I-A β ou Fe^{II}-A β (Dikalov *et al.*, 2004; Tabner *et al.*, 2002).

Le caractère neurotoxique du peptide β -amyloïde (à des concentrations micromolaires), varie selon l'ordre suivant A β 42 > A β 40 >> A β 40 rat \approx 0 (Huang *et al.*, 1999b), en accord avec les différentes capacités à réduire les métaux et à produire H₂O₂ (Huang *et al.*, 1999a), elles-mêmes reliées avec la capacité à chélater les ions métalliques.

La réaction d'A β avec Cu^{II} conduit par ailleurs à l'auto-oxydation de A β (cf. paragraphes II.1.b.), favorisant de multiples modifications sur celui-ci (carbonylation, alkylation des chaînes latérales des histidines, oxydation des méthionines, ...). De plus, les ions métalliques, qui structurent les peptides en favorisant des ponts inter-brins, vont ensuite générer des liens covalents entre ces différents peptides via des modifications oxydantes telles que des "crosslinks" radicalaires entre deux tyrosines (figure. 1.34) (Atwood *et al.*, 2004). Ces différentes modifications oxydantes seraient à l'origine des formes oligomériques de A β résistantes au SDS (Atwood *et al.*, 2000; Dyrks *et al.*, 1992) qui sont également retrouvées dans les extraits neurotoxiques issus de cerveaux *post-mortem* de malades d'Alzheimer.

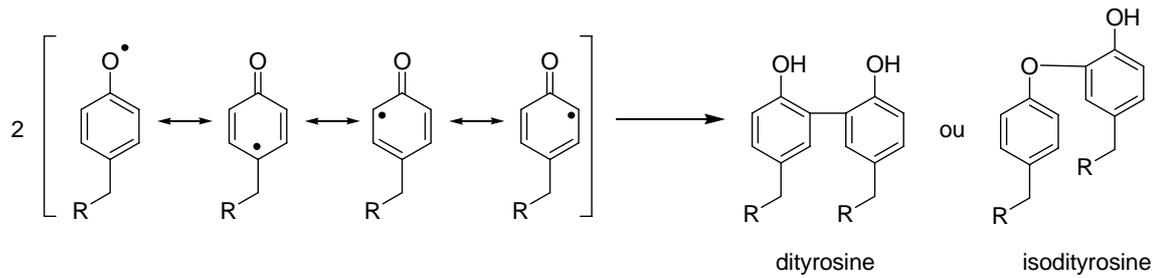


Figure 1.34. Equation de formation des dimères de tyrosines

Enfin, nous avons déjà vu que l'interaction de A β avec les ions Cu^{II} et Fe^{III} redox actifs est également à l'origine d'un stress oxydant plus général.

Cependant, certains résultats semblent indiquer une relation plus complexe entre la balance homéostatique des ions métalliques et A β . Une hypothèse avancée est qu'APP et A β seraient des métalloprotéines du cerveau possédant un rôle neuroprotecteur (Atwood *et al.*, 2003; Kontush, 2001). Le peptide A β serait synthétisé en réponse à la présence de métaux libres afin de les piéger (Maynard *et al.*, 2002) via ses sites d'affinités élevées (notamment pour l'espèce A β ₂Cu) (Atwood *et al.*, 2000). Il pourrait alors s'agréger pour séquestrer ces métaux au sein des plaques amyloïdes et/ou agir comme un antioxydant, de la même manière que la SOD, en complexant le Cu^{II} puis en le réduisant en Cu^I, catalysant ainsi la transformation d'O₂^{•-} toxique en H₂O₂, ce dernier étant ensuite pris en charge par d'autres systèmes de dégradation. Certaines études montrent en effet que A β sous forme monomérique (à des concentrations nanomolaires) est non toxique et possède des propriétés antioxydantes, inhibant la formation de ROS par le cuivre ou le fer (Zou *et al.*, 2002). Cependant, la perturbation de l'homéostasie des métaux et l'augmentation du stress oxydant avec l'âge, ainsi que l'augmentation de la production de l'espèce A β ₄₂, pourraient corrompre cette fonction biologique. Pour une stœchiométrie métal : ligand élevé, le peptide A β deviendrait hypermétallé, s'agrégerait davantage et pourrait devenir pro-oxydant, produisant des quantités de H₂O₂ supérieures aux capacités de détoxification de la cellule.

V. Conclusion

Ce chapitre bibliographique illustre la complexité de la maladie d'Alzheimer. On comprend mieux pourquoi, à l'heure actuelle, il n'y a aucun traitement curatif sur le marché. Les traitements existants actuellement (inhibiteurs des choline estérases et un inhibiteur des récepteurs au NMDA) n'agissent pas directement sur les causes de la maladie. La conception de nouveaux médicaments nécessite en premier lieu la compréhension du mécanisme de développement de la maladie pour pouvoir « agir à la source ». En effet, la distinction entre les causes et les effets est difficile à établir.

L'implication des ions métalliques dans la maladie d'Alzheimer est un point essentiel, puisque les métaux prennent part à l'agrégation du peptide amyloïde et à sa toxicité via la génération d'espèces réactives de l'oxygène, délétères pour un grand nombre d'espèces biologiques (lipides, protéines, ADN). L'étude du complexe formé entre les métaux et le peptide peut donc élucider de nombreuses questions.

Le laboratoire est impliqué dans la compréhension du rôle des métaux de transition dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Le projet détaillé ici se focalise sur l'interaction entre le cuivre (Cu^{I} ou Cu^{II}) et le peptide $\text{A}\beta$.

Le deuxième chapitre rapporte l'étude structurale et thermodynamique du complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta$. Nous décrivons la force de l'interaction entre le peptide et le métal. L'identification des ligands mis en jeu sera également discutée.

Dans les deux chapitres suivants, nous présenterons les études portant sur la production de radicaux hydroxyles et sur l'agrégation, les deux phénomènes clés de la maladie. Nous aborderons ainsi le rôle du cuivre dans tous les aspects du développement de la maladie.

VI. Bibliographie

- Alvarez, A., Toro, R., Caceres, A., and Maccioni, R.B. (1999) Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents β -amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett.* **459**: 421-426.
- Andersen, K., Launer, L.J., Dewey, M.E., Letenneur, L., Ott, A., Copeland, J., Dartigues, J.-F., Kragh-Sorensen, P., Baldereschi, M., Brayne, C., Lobo, A., Martinez-Lage, J.M., Stijnen, T., and Hofman, A. (1999) Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: the EURODEM Studies. *Neurology* **53**: 1992-1997.
- Arias, E., Gallego-Sandin, S., Villarroya, M., Garcia, A.G., and Lopez, M.G. (2005) Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors Galantamine, Donepezil, and Rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**: 1346-1353.
- Arispe, N., Pollard, H.B., and Rojas, E. (1993) Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid β -protein [A β P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 10573-10577.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., and Hyman, B.T. (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**: 631-639.
- Atwood, C.S., Moir, R.D., Huang, X., Scarpa, R.C., Bacarra, N.M.E., Romano, D.M., Hartshorn, M.A., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1998) Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J. Biol. Chem.* **273**: 12817-12826.
- Atwood, C.S., Huang, X., Moir, R.D., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1999) Role of free radicals and metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Met. Ions Biol. Syst.* **36**: 309-364.
- Atwood, C.S., Scarpa, R.C., Huang, X., Moir, R.D., Jones, W.D., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (2000) Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid β peptides: Identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid β 1-42. *J. Neurochem.* **75**: 1219-1233.
- Atwood, C.S., Obrenovich, M.E., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith, M.A., and Martins, R.N. (2003) Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- β . *Brain Res. Rev.* **43**: 1-16.
- Atwood, C.S., Perry, G., Zeng, H., Kato, Y., Jones, W.D., Ling, K.-Q., Huang, X., Moir, R.D., Wang, D., Sayre, L.M., Smith, M.A., Chen, S.G., and Bush, A.I. (2004) Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid β . *Biochemistry* **43**: 560-568.
- Bachurin, S.O. (2003) Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Med. Res. Rev.* **23**: 48-88.
- Bar-On, P., Millard, C.B., Harel, M., Dvir, H., Enz, A., Sussman, J.L., and Silman, I. (2002) Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug Rivastigmine. *Biochemistry* **41**: 3555-3564.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.-L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D., and

- Yednock, T. (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Med.* **6**: 916-919.
- Barghorn, S., and Mandelkow, E. (2002) Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* **41**: 14885-14896.
- Barnham, K.J., McKinsty, W.J., Multhaup, G., Galatis, D., Morton, C.J., Curtain, C.C., Williamson, N.A., White, A.R., Hinds, M.G., Norton, R.S., Beyreuther, K., Masters, C.L., Parker, M.W., and Cappai, R. (2003) Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. *J. Biol. Chem.* **278**: 17401-17407.
- Barnham, K.J., Cherny, R.A., Cappai, R., Melov, S., Masters, C.L., and Bush, A.I. (2004a) Metal-protein attenuating compounds (MPACs) for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Des. Rev.-Online* **1**: 75-82.
- Barnham, K.J., Haeffner, F., Ciccotosto, G.D., Curtain, C.C., Tew, D., Mavros, C., Beyreuther, K., Carrington, D., Masters, C.L., Cherny, R.A., Cappai, R., and Bush, A.I. (2004b) Tyrosine gated electron transfer is key to the toxic mechanism of Alzheimer's disease β -amyloid. *FASEB J.* **18**: 1427-1429.
- Beauchemin, D., and Kisilevsky, R. (1998) A method based on ICP-MS for the analysis of Alzheimer's amyloid plaques. *Anal. Chem.* **70**: 1026-1029.
- Becker, J.S., Zoriy, M.V., Pickhardt, C., Palomero-Gallagher, N., and Zilles, K. (2005) Imaging of Copper, Zinc, and Other Elements in Thin Section of Human Brain Samples (Hippocampus) by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal Chem.* **77**: 3208-3216.
- Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R., and Schubert, D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* **77**: 817-827.
- Bitan, G., Kirkitadze, M.D., Lomakin, A., Vollers, S.S., Benedek, G.B., and Teplow, D.B. (2003) Amyloid β -protein ($A\beta$) assembly: $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 330-335.
- Blanchard, B.J., Chen, A., Rozeboom, L.M., Stafford, K.A., Weigele, P., and Ingram, V.M. (2004) Efficient reversal of Alzheimer's disease fibril formation and elimination of neurotoxicity by a small molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 14326-14332.
- Bodovitz, S., and Klein, W.L. (1996) Cholesterol modulates α -secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **271**: 4436-4440.
- Bokvist, M., Lindström, F., Watts, A., and Gröbner, G. (2004) Two types of Alzheimer's β -amyloid (1-40) peptide membrane interactions: aggregation preventing transmembrane anchoring *versus* accelerated surface fibril formation. *J. Mol. Biol.* **335**: 1039-1049.
- Bramblett, G.T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S.E., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (1993) Abnormal tau phosphorylation at Ser³⁹⁶ in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* **10**: 1089-1099.
- Bush, A.I., Pettingell, W.H., d Paradis, M., and Tanzi, R.E. (1994a) Modulation of $A\beta$ adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *J. Biol. Chem.* **269**: 12152-12158.

- Bush, A.I., Pettingell, W.H., Multhaup, G., d Paradis, M., Vonsattel, J.-P., Gusella, J.F., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Tanzi, R.E. (1994b) Rapid induction of Alzheimer A β amyloid formation by zinc. *Science* **265**: 1464-1467.
- Bush, A.I. (2002) Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **23**: 1031-1038.
- Bush, A.I. (2003) The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* , **26**: 207-214.
- Butterfield, D.A., Drake, J., Pocernich, C., and Castegna, A. (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid peptide. *Trends Molec. Medicine* **7**: 548-554.
- Checler, F., and Vincent, B. (2002) Alzheimer's and prion diseases: distinct pathologies, common proteolytic denominators. *Trends Neurosci.* **25**: 616-620.
- Cherny, R.A., Atwood, C.S., Xilinas, M.E., Gray, D.N., Jones, W.D., McLean, C.A., Barnham, K.J., Volitakis, I., Fraser, F.W., Kim, Y.S., Huang, X., Goldstein, L.E., Moir, R.D., Lim, J.T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R.E., Masters, C.L., and Bush, A.I. (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* **30**: 665-676.
- Citron, M. (2004a) Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nature Rev. Neurosci.* **5**: 677-685.
- Citron, M. (2004b) β -secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease - promise and challenge. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**: 92-97.
- Ciuculescu, D., Mekmouche, Y., and Faller, P. (2005) Metal-binding properties of the peptide APP170-188 : A model of the Zn(II)-binding site of amyloid precursor protein (APP) *Chemistry-A European Journal*, **11**: 903-909.
- Clements, A., Allsop, D., Walsh, D.M., and Williams, C.H. (1996) Aggregation and metal-binding properties of mutant forms of the amyloid A β peptide of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **66**: 740-747.
- Clippingdale, A.B., Wade, J.D., and Barrow, C.J. (2001) The amyloid- β peptide and its role in Alzheimer's disease. *J. Peptide Sci.* **7**: 227-249.
- Conte, A., Pellegrini, S., and Tagliazucchi, D. (2003) Synergistic protection of PC12 cells from β -amyloid toxicity by resveratrol and catechin. *Brain Res. Bull.* **62**: 29-38.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993) Gene dose of Apolipoprotein E type 4 allele and risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**: 921-923.
- Cuajungco, M.P., Goldstein, L.E., Nunomura, A., Smith, M.A., Lim, J.T., Atwood, C.S., Huang, X., Farrag, Y.W., Perry, G., and Bush, A.I. (2000) Evidence that the β -amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of A β by zinc. *J. Biol. Chem.* **275**: 19439-19442.
- Cuajungco, M.P., Frederickson, C.J., and Bush, A.I. (2005) Amyloid- β metal interaction and metal chelation. *Sub-Cellular Biochem.* **38**: 235-254.

- Curtain, C.C., Ali, F., Volitakis, I., Cherny, R.A., Norton, R.S., Beyreuther, K., Barrow, C.J., Masters, C.L., Bush, A.I., and Barnham, K.J. (2001) Alzheimer's disease amyloid- β binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *J. Biol. Chem.* **276**: 20466-20473.
- Curtain, C.C., Ali, F.E., Smith, D.G., Bush, A.I., Masters, C.L., and Barnham, K.J. (2003) Metal ions, pH, and cholesterol regulate the interactions of Alzheimer's disease amyloid- β peptide with membrane lipid. *J. Biol. Chem.* **278**: 2977-2982.
- Dannhardt, G., and Kiefer, W. (2001) Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects. *Eur. J. Med. Chem.* **36**: 109-126.
- Da Silva, G.F., Tay, W.M. and Ming, L.J. (2005) Catechol Oxidase-like Oxidation Chemistry of the 1–20 and 1–16 Fragments of Alzheimer's Disease-related β -Amyloid Peptide: THEIR STRUCTURE-ACTIVITY CORRELATION AND THE FATE OF HYDROGEN PEROXIDE. *J. Biol. Chem.* **280**, 16601-16609.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., Goate, A., and Kopan, R. (1999) A presenilin-1-dependant- γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**: 518-522.
- De Strooper, B. (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active γ -secretase complex. *Neuron* **38**: 9-12.
- DeMattos, R.B., Bales, K.R., Cummins, D.J., Dodart, J.-C., Paul, S.M., and Holtzman, D.M. (2001) Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 8850-8855.
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S.C., Parker, I., and Glabe, C.G. (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* **280**: 17294-17300.
- Dewachter, I., and Van Leuven, F. (2002) Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease: the prospects. *Lancet Neurol.* **1**: 409-416.
- Dikalov, S.I., Vitek, M.P., and Mason, R.P. (2004) Cupric-amyloid β peptide complex stimulates oxidation of ascorbate and generation of hydroxyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* **36**: 340-347.
- Dodart, J.-C., Marr, R.A., Koistinaho, M., Gregersen, B.M., Malkani, S., Verma, I.M., and Paul, S.M. (2005) Gene delivery of human apolipoprotein E alters brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 1211-1216.
- Dong, J., Atwood, C.S., Anderson, V.E., Siedlak, S.L., Smith, M.A., Perry, G., and Carey, P.R. (2003) Metal binding and oxidation of amyloid- β within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. *Biochemistry* **42**: 2768-2773.
- Dovey, H.F., John, V., Anderson, J.P., Chen, L.Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L.Y., Freedman, S.B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztynska, E.J., Hu, K.L., Johnson-Wood, K.L., Kennedy, S.L., Kholodenko, D., Knops, J.E., Latimer, L.H., Lee, M., Liao, Z., Liederburg, I.M., Motter, R.N., Mutter, L.C., Nietz, J., Quinn, K.P., Sacchi, K.L., Seubert, P.A., Shopp, G.M., Thorsett, E.D., Tung, J.S., Wu, J., Yang, S., Yin, C.T., Schenk, D.B., May, P.C., Altstiel, L.D., Bender, M.H., Boggs, L.N., Britton, T.C., Clemens, J.C., Czilli, D.L., Dieckman-

- McGinty, D.K., Droste, J.J., Fuson, K.S., Gitter, D.B., Hyslop, P.A., Johnstone, E.M., Li, W.-Y., Little, S.P., Mabry, T.E., Miller, F.D., Ni, B., Nissen, J.S., Porter, W.J., Potts, B.D., Reel, J.K., Stephenson, D., Su, Y., Shipley, L.A., Whitesitt, C.A., Yin, T., and Audia, J.E. (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J. Neurochem.* **76**: 173-181.
- Eriksen, J.L., Sagi, S.A., Smith, T.E., Weggen, S., Das, P., McLendon, D.C., Ozols, V.V., Jessing, K.W., Zavitz, K.H., Koo, E.H., and Golde, T.E. (2003) NSAIDs and enantiomers of flubiprofen target γ -secretase and lower A β 42 in vivo. *J. Clin. Invest.* **112**: 440-449.
- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lütjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kühl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., and Hartmann, T. (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 5856-5861.
- Fath, T., Eidenmuller, J., and Brandt, R. (2002) Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **22**: 9733-9741.
- Finney, L.A., and O'Halloran, T.V. (2003) Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors. *Science*, **300**: 931-936.
- Gaggelli, E., Kozlowski, H., Valensin, D., and Valensin, G. (2006) Copper homeostasis and Neurodegenerative Disorders (Alzheimer's, Prion, and Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis). *Chem. Rev.* **106**: 1995-2044.
- Garzon-Rodriguez, W., Yatsimirsky, A.K., and Glabe, C.G. (1999) Binding of Zn(II), Cu(II), and Fe(III) ions to Alzheimer's A β peptide studied by fluorescence. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**: 2243-2248.
- Gervais, F., Paquette, J., Morissette, C., Krywkowski, P., Yu, M., Azzi, M., Lacombe, D., Kong, X., Aman, A., Laurin, J., Szarek, W.A., and Tremblay, P. (2006) Targeting soluble A β peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiol. Aging*: in press.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A., and Klein, W.L. (2003) Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 10417-10422.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.-C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 4913-4917.
- Hardy, J., and Higgins, G.A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**: 184-185.
- Hardy, J. (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **20**: 154-159.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**: 353-356.
- Hartley, D.M., Walsh, D.M., Ye, C.P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P.M., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid β -protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.* **19**: 8876-8884.

- Henderson, V.W. (1997) The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Neurology* **48**: 27-35.
- Hensley, K., Carney, J.M., Mattson, M.P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J.F., Floyd, R.A. and Butterfield, D.A. (1994) A Model for β -Amyloid Aggregation and Neurotoxicity Based on Free Radical Generation by the Peptide: Relevance to Alzheimer Disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 3270
- Hesse, L., Beher, D., Masters, C.L., and Multhaup, G. (1994) The β A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett.* **349**: 109-116.
- Higgins, G.A., and Jacobsen, H. (2003) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and application. *Behav. Pharmacol.* **14**: 419-438.
- Hong, M., Chen, D.C.R., Klein, P.S., and Lee, V.M.-Y. (1997) Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* **272**: 25326-25332.
- Hoshi, M., Sato, M., Matsumoto, S., Noguchi, A., Yasutake, K., Yoshida, N., and Sato, K. (2003) Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I / glycogen synthase kinase-3 β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 6370-6375.
- Huang, X., Atwood, C.S., Moir, R.D., Hartshorn, M.A., Vonsattel, J.-P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1997) Zinc-induced Alzheimer's A β 1-40 aggregation is mediated by conformational factors. *J. Biol. Chem.* **272**: 26464-26470.
- Huang, X., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Cuajungco, M.P., Gray, D.N., Lim, J., Moir, R.D., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1999a) The A β peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* **38**: 7609-7616.
- Huang, X., Cuajungco, M.P., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Tyndall, J.D.A., Hanson, G.R., Stokes, K.C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Saunders, A.J., Lim, J., Moir, R.D., Glabe, C., Bowden, E.F., Masters, C.L., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1999b) Cu(II) potentiation of Alzheimer A β neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **274**: 37111-37116.
- House, E., Collingwood, J., Khan, A., Korchazkina, O., Berthon, G., and Exley, C. (2004) Aluminium, iron, zinc and copper influence the in vitro formation of amyloid fibrils of Abeta42 in a manner which may have consequences for metal chelation therapy in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* **6**:291-301.
- Iwata, N., Takaki, Y., Fukami, S., Tsubuki, S., and Saido, T.C. (2002) Region-specific reduction of A β -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J. Neurosci. Res.* **70**: 493-500.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994) Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* **13**: 45-53.
- Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Gonzales, V., Savonenko, A.V., Wen, J.C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Younkin, L.H., Lester, H.A., Younkin, S.G., and Borchelt, D.R. (2005) Persistent amyloidosis following suppression of A β production in a transgenic model of Alzheimer disease. *PLoS Med.* **2**: e355.

- Jarrett, J.T., Berger, E.P., and Lansbury, P.T. (1993) The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**: 4693-4697.
- Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S., and Drachman, D.A. (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* **356**: 1627-1631.
- John, V., Beck, J.P., Bienkowski, M.J., Sinha, S., and Henrikson, R.L. (2003) Human β -secretase (BACE) and BACE inhibitors. *J. Med. Chem.* **46**: 4625-4630.
- Johnson, G.V.W., and Stoothoff, W.H. (2004) Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J. Cell. Sci.* **117**: 5721-5729.
- Karr, J.W., Akintoye, H., Kaupp, L.J., and Szalai, V.A. (2005) N-terminal deletions modify the Cu^{2+} binding site in amyloid- β . *Biochemistry* **44**: 5478-5487.
- Kivipelto, M., Helkala, E.-L., Laakso, M.P., Hänninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J., and Nissien, A. (2001) Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Br. Med. J.* **322**: 1447-1451.
- Klein, W.L., Krafft, G.A., and Finch, C.E. (2001) Targeting small $\text{A}\beta$ oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.* **24**: 219-224.
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., März, W., and Fahrenholz, F. (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the α -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 5815-5820.
- Kontush, A. (2001) Amyloid- β : an antioxydant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **31**: 1120-1131.
- Kozikowski, A.P., Nowak, I., Petukhov, P.A., Etcheberrigaray, R., Mohamed, A., Tan, M., Lewin, N., Hennings, H., Pearce, L.L., and Blumberg, P.M. (2003) New amide-bearing benzolactam-based protein kinase C modulators induce enhanced secretion of the amyloid precursor protein metabolite sAPP α . *J. Med. Chem.* **46**: 364-373.
- Kozin, S.A., Zirah, S., Rebuffat, S., Hoa, G.H., and Debey, P., (2001) Zinc Binding to Alzheimer's $\text{A}\beta(1-16)$ Peptide Results in Stable Soluble Complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **285**: 959-964.
- Kremer, J.J., Pallitto, M.M., Sklansky, D.J., and Murphy, R.M. (2000) Correlation of β -amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes. *Biochemistry* **39**: 10309-10318.
- LaFerla, F.M., and Oddo, S. (2005) Alzheimer's disease: $\text{A}\beta$, tau and synaptic dysfunction. *Trends Molec. Med.* **11**: 170-176.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A., and Klein, W.L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from $\text{A}\beta_{1-42}$ are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 6448-6453.
- Lee, J.-Y., Cole, T.B., Palmiter, R.D., Suh, S.W., and Koh, J.-Y. (2002) Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 7705-7710.

- Lim, G.P., Yang, F., Chu, T., Chen, P., Beech, W., Teter, B., Tran, T., Ubeda, O., Hsiao Ashe, K., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2000) Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer Disease. *J. Neurosci.* **20**: 5709-5714.
- Lim, G.P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2001) The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci.* **21**: 8370-8377.
- Lin, H., Bhatia, R., and Lal, R. (2001) Amyloid β protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J.* **15**: 2433-2444.
- Ling, Y., Morgan, K., and Kalsheker, N. (2003). Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **35**: 1505-1535.
- Lipton, S.A. (2006) Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nature Rev. Drug Discov.* **5**: 160-170.
- Liu, S.T., Howlett, G., and Barrow, C.J. (1999) Histidine-13 is a crucial residue in the zinc ion-induced aggregation of the A β peptide of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **38**: 9373-9378.
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., and Markesbery, W.R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* **158**: 47-52.
- Lührs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Döbeli, H., Schubert, D., and Riek, R. (2005) 3D structure of Alzheimer's amyloid- β (1-42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 17342-17347.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J.-C., Yan, Q., Richards, W.G., Citron, M., and Vassar, R. (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation. *Nature Neurosci.* **4**: 231-232.
- Matsubara, E., Bryant-Thomas, T., Pacheco Quinto, J., Henry, T.L., Poeggeler, B., Herbert, D., Cruz-Sanchez, F., Chyan, Y.-J., Smith, M.A., Perry, G., Shoji, M., Abe, K., Leone, A., Grundke-Iqbal, I., Wilson, G.L., Ghiso, J., Williams, C., Refolo, L.M., and Pappolla, M.A. (2003) Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **85**: 1101-1108.
- Mattson, M.P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**: 631-639.
- Maynard, C.J., Cappai, R., Volitakis, I., Cherny, R.A., White, A.R., Beyreuther, K., Masters, C.L., Bush, A.I., and Li, Q.-X. (2002) Overexpression of Alzheimer's disease amyloid- β opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *J. Biol. Chem.* **277**: 44670-44676.
- McLachlan, D.R.C., Kruck, T.P.A., Kalow, W., Andrews, D.F., Dalton, A.J., Bell, M.Y., and Smith, A.T. (1991) Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease. *The Lancet* **337**: 1304-1308.
- McLellan, M.E., Kajdasz, S.T., Hyman, B.T., and Bacskai, B.J. (2003) In vivo imaging of reactive oxygen species specifically associated with Thioflavine S-positive amyloid plaques by multiphoton microscopy. *J. Neurosci.* **23**: 2212-2217.

- Mekmouche, Y., Coppel, Y., Hochgräfen, K., Guilloreau, L., Talmard, C., Mazarguil, H., and Faller, P. (2005) Characterization of the Zn^{II} binding to the peptide Amyloid- β^{1-16} linked to Alzheimer's disease. *ChemBioChem* **6**: 1663-1671.
- Minkeviciene, R., Banerjee, P., and Tanila, H. (2004) Memantine improves spatial learning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**: 677-682.
- Miura, T., Suzuki, K., Kohata, N., and Takeuchi, H. (2000) Metal binding modes of Alzheimer's amyloid β -peptide in insoluble aggregates and soluble complexes. *Biochemistry* **39**: 7024-7031.
- Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reversé, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Van Den Haute, C., Checler, F., Godaux, E., Cordell, B., and Van Leuven, F. (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J. Biol. Chem.* **274**: 6483-6492.
- Moir, R.D., Atwood, C.S., Romano, D.M., Laurans, M.H., Huang, X., Bush, A.I., Smith, J.D., and Tanzi, R. (1999) Differential effects of apolipoprotein E isoforms on metal-induced aggregation of A β using physiological concentrations. *Biochemistry* **38**: 4595-4603.
- Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M., and Arendash, G.W. (2000) A β peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* **408**: 982-985.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.-Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000) High-level neuronal expression of A β_{1-42} in wild type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* **20**: 4050-4058.
- Multhaup, G., Schicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1996) The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science* **271**: 1406-1409.
- Murali Doraiswamy, P and Finefrock, A.E. (2004) Metals in our minds: therapeutic implications for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* **3**:431-434
- Murray, I.V.J., Sindoni, M.E., and Axelsen, P.H. (2005) Promotion of oxidative lipid membrane damage by amyloid β proteins. *Biochemistry* **44**: 12606-12613.
- Nakagami, Y., Nishimura, S., Murasugi, T., Kaneko, I., Meguro, M., Marumoto, S., Kogen, H., Koyama, K., and Oda, T. (2002) A novel β -sheet breaker, RS-0406, reverses amyloid β -induced cytotoxicity and impairment of long-term potentiation *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* **137**: 676-682.
- Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J., and Growdon, J.H. (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* **258**: 304-307.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**: 409-421.

- Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., and Yamada, M. (2003) Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **87**: 172-181.
- Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., and Yamada, M. (2006) Anti-Parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity for Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*. *Neurochem. Int.* **48**: 275-285.
- Opazo, C., Huang, X., Cherny, R.A., Moir, R.D., Roher, A.E., White, A.R., Cappai, R., Masters, C.L., Tanzi, R.E., Inestrosa, N.C., and Bush, A.I. (2002) Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease β -amyloid. *J. Biol. Chem.* **277**: 40302-40308.
- Peretto, I., Radaelli, S., Parini, C., Zandi, M., Raveglia, L.F., Dondio, G., Fontanella, L., Misiano, P., Bigogno, C., Rizzi, A., Riccardi, B., Biscaioli, M., Marchetti, S., Puccini, P., Catinella, S., Rondelli, I., Cenacchi, V., Bolzoni, P.T., Caruso, P., Villetti, G., Facchinetti, F., Del Giudice, E., Moretto, N., and Imbimbo, B.P. (2005) Synthesis and biological activity of Flurbiprofen analogues as selective inhibitors of β -amyloid₁₋₄₂ secretion. *J. Med. Chem.* **48**: 5705-5720.
- Permanne, B., Adessi, C., Saborio, G.P., Fraga, S., Frossard, M.-J., Van Dorpe, J., Dewachter, I., Banks, W.A., Van Leuven, F., and Soto, C. (2002) Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a β -sheet breaker peptide. *FASEB J.* **16**: 860-862.
- Petkova, A.T., Ishii, Y., Balbach, J.J., Antzutkin, O.N., Leapman, R.D., Delaglio, F., and Tycko, R. (2002) A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 16742-16747.
- Petkova, A.T., Yau, W.-M., and Tycko, R. (2006) Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Biochemistry* **45**: 498-512.
- Piccini, A., Russo, C., Gliozzi, A., Relini, A., Vitali, A., Borghi, R., Giliberto, L., Armirotti, A., D'Arrigo, C., Bachi, A., Cattaneo, A., Canale, C., Torrassa, S., Saido, T.C., Markesbery, W., Gambetti, P., and Tabaton, M. (2005) β -amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **280**: 34186-34192.
- Pickhardt, M., Gazova, Z., Von Bergen, M., Khlistunova, I., Wang, Y., Hascher, A., Mandelkow, E.-M., Biernat, J., and Mandelkow, E. (2005) Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments *in vitro* and in cells. *J. Biol. Chem.* **280**: 3628-3635.
- Porat, Y., Abramowitz, A., and Gazit, E. (2006) Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem. Biol. Drug Des.* **67**: 27-37.
- Puglielli, L., Friedlich, A.L., Setchell, K.D.R., Nagano, S., Opazo, C., Cherny, R.A., Barnham, K.J., Wade, J.D., Melov, S., Kovacs, D.M., and Bush, A.I. (2005) Alzheimer's disease β -amyloid activity mimics cholesterol oxidase. *J. Clin. Invest.* **115**: 2256-2563.
- Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P., and Ferreira, A. (2002) Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 6364-6369.
- Refolo, L.M., Pappolla, M.A., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G.S., Sambamurti, K., and Duff, K. (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis.* **7**: 321-331.

- Reines, S.A., Block, G.A., Morris, J.C., Liu, G., Nessly, M.L., Lines, C.R., Norman, B.A., and Baranak, C.C. (2004) Rofecoxib - No effect on Alzheimer's disease in a 1-year, randomized, blinded, controlled study. *Neurology* **62**: 66-71.
- Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., and Mobius, H.J. (2003) Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1333-1341.
- Ritchie, C.W., Bush, A.I., Mackinnon, A., Macfarlane, S., Mastwyk, M., Macgregor, L., Kiers, L., Cherny, R.A., Li, Q.-X., Tammer, A., Carrington, D., Mavros, C., Volitakis, I., Xilinas, M., Ames, D., Davis, S., Beyreuther, K., Tanzi, R.E., and Masters, C.L. (2003) Metal-protein attenuation with Iodochlorohydroxyquin (Clioquinol) targeting A β amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **60**: 1685-1691.
- Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G., and Murri, L. (2003). Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain. Res. Bull.* **61**: 1-24.
- Roher, A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Wolkow, C., Wang, R., Cotter, R.J., Reardon, I.M., Zurcher-Neely, H.A., Heinrikson, R.L., Ball, M.J., and Greenberg, B.D. (1993) Structural alterations in the peptide backbone of β -amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **268**: 3072-3083.
- Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R.G., Klauber, M.R., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., Cotman, C.W., Pfeiffer, E., Schneider, L.S., and Thal, L.J. (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **336**: 1216-1222.
- Sarkar, B. (1999) Treatment of Wilson and Menkes diseases. *Chem. Rev.* **99**: 2535-2544.
- Sayre, L.M., Perry, G., Harris, P.L.R., Liu, Y., Schubert, K.A., and Smith, M.A. (2000) In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J. Neurochem.* **74**: 270-279.
- Scarpini, E., Scheltens, P., and Feldman, H. (2003) Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol.* **2**: 539-547.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandevent, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., and Seubert, P. (1999) Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**: 173-177.
- Selkoe, D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **81**: 741-766.
- Shim, H., and Harris, Z.L. (2003) Genetic Defects in Copper Metabolism. *J. Nutr.* **133**: 1572S-1531S.
- Shin, R.-W., Kruck, T.P.A., Murayama, H., and Kitamoto, T. (2003) A novel trivalent cation chelator Feralex dissociates binding of aluminium and iron associated with hyperphosphorylated τ of Alzheimer's disease. *Brain Res.* **961**: 139-146.
- Shobab, L.A., Hsiung, G.-Y.R., and Feldman, H.H. (2005) Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **4**: 841-852.
- Sigurdsson, E.M., Frangione, B., and Wisniewski, T. (2002) Immunization for Alzheimer's disease. *Drug Dev. Res.* **56**: 135-142.

- Simons, M., Keller, P., De Stropper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., and Simons, K. (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 6460-6464.
- Smith, D.P., Smith, D.G., Curtain, C.C., Boas, J.F., Pilbrow, J.R., Ciccotosto, G.D., Lau, T.-L., Tew, D.J., Perez, K., Wade, J.D., Bush, A.I., Drew, S.C., Separovic, F., Masters, C.L., Cappai, R., and Barnham, K.J. (2006) Copper mediated amyloid- β toxicity is associated with an intermolecular histidine bridge. *J. Biol. Chem.* **281**: 15145-15154.
- Smith, M.A., Harris, P.L.R., Sayre, L.M., and Perry, G. (1997a) Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 9866-9868.
- Smith, M.A., Richey Harris, P.L., Sayre, L.M., Beckman, J.S., and Perry, G. (1997b) Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **17**: 2653-2657.
- Soto, C., Sigurdsson, E.M., Morelli, L., Kumar, A., Castano, E.M., and Frangione, B. (1998) β -sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer's therapy. *Nature Med.* **4**: 822-826.
- Sparks, D.L., and Schreurs, B.G. (2003) Trace amounts of copper in water induce β -amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 11065-11069.
- Suh, Y.-H., and Checler, F. (2002) Amyloid precursor protein, presenilins, and α -synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Rev.* **54**: 469-525.
- Syme, C.D., Nadal, R.C., Rigby, S.E.J., and Viles, J.H. (2004) Copper binding to the amyloid- β ($A\beta$) peptide associated with Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **279**: 18169-18177.
- Syme, C.D., and Viles, J.H. (2006) Solution ^1H NMR investigation of Zn^{2+} and Cd^{2+} binding to amyloid-beta peptide ($A\beta$) of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**: 246-256.
- Tabner, B.J., Turnbull, S., El-Agnaf, O.M.A., and Allsop, D. (2002) Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from $A\beta$ and α -synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **32**: 1076-1083.
- Takashima, A., Noguchi, K., Sato, K., Hoshino, T., and Imahori, K. (1993) Tau protein kinase I is essential for amyloid β -protein induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 7789-7793.
- Takeda, A., Smith, M.A., Avila, J., Nunomura, A., Siedlak, S.L., Zhu, X., Perry, G., and Sayre, L.M. (2000) In Alzheimer's disease, heme oxygenase is coincident with Alz50, an epitope of τ induced by 4-hydroxy-2-nonenal modification. *J. Neurochem.* **75**: 1234-1241.
- Tamagano, E., Robino, G., Obbili, A., Bardini, P., Aragno, M., Parola, M., and Danni, O. (2003) H_2O_2 and 4-hydroxynonenal mediate amyloid β -induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38^{MAPK} . *Exp. Neurol.* **180**: 144-155.
- Tariot, P.N., Farlow, M.R., Grossberg, G.T., Graham, S.M., McDonald, S., and Gergel, I. (2004) Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving Donepezil: A randomized controlled trial. *JAMA* **291**: 317-324.

- Tjernberg, L.O., Näslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlström, A.R., Thyberg, J., Terenius, L., and Nordstedt, C. (1996) Arrest of β -amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J. Biol. Chem.* **271**: 8545-8548.
- Townsend, K.P., and Pratico, D. (2005) Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *FASEB J.* **19**: 1592-1601.
- Varadarajan, S., Yatin, S., Kanski, J., Jahanshahi, F., and Butterfield, D.A. (1999) Methionine residue 35 is important in amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress. *Brain Res. Bull.* **50**: 133-141.
- Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A.C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Younkin, S.G., and Golde, T.E. (2002) Cholesterol-dependant γ -secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol. Dis.* **9**: 11-23.
- Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M., and Teplow, D.B. (1997) Amyloid β -protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.* **272**: 22364-22372.
- Walsh, D.M., Hartley, D.M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Selkoe, D.J. and Teplow, D.B. (1999) Amyloid β -protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J. Biol. Chem.* **274**: 25945-25952.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* **416**: 535-539.
- Walsh, D.M., Townsend, M., Podlisny, M.B., Shankar, G.M., Fadeeva, J.V., El-Agnaf, O., Hartley, D.M., and Selkoe, D.J. (2005) Certain inhibitors of synthetic amyloid β -peptide (A β) fibrillogenesis block oligomerization of natural A β and thereby rescue long-term potentiation. *J. Neurosci.* **25**: 2455-2462.
- Weggen, S., Eriksen, J.L., Das, P., Sagi, S.A., Wang, R., Pietrzik, C.U., Findlay, K.A., Smith, T.E., Murphy, M.P., Bulter, T., Kang, D.E., Marquez-Sterling, N., Golde, T.E., and Koo, E.H. (2001) A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* **414**: 212-216.
- White, A.R., Reyes, R., Mercer, J.F.B., Camakaris, J., Zheng, H., Bush, A.I., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C., and Cappai, R. (1999) Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice. *Brain Res.* **842**: 439-444.
- White, A.R., Multhaup, G., Galatis, D., McKinstry, W.J., Parker, M.W., Pipkorn, R., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Cappai, R. (2002) Contrasting, Species-Dependent Modulation of Copper-Mediated Neurotoxicity by the Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein. *J. Neurosci.* **22**: 365 -373.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., and Selkoe, D. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* **398**: 513-517.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G., and Siegel, G. (2000) Decrease prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* **57**: 1439-1443.

- Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., Chen, P., Kayed, R., Glabe, C.G., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**: 5892-5901.
- Zandi, P.P., Anthony, J.C., Khachaturian, A.S., Stone, S.V., Gustafson, D., Tschanz, J.T., Norton, M.C., Welsh-Bohmer, K.A., and Breitner, J.C.S. (2004) Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements. *Arch. Neurol.* **61**: 82-88.
- Zirah, S., Kozin, S.A., Mazur, A.K., Blond, A., Cheminant, M., Ségalas-Milazzo, I., Debey, P., and Rebuffat, S. (2006) Structural changes of region 1-16 of the Alzheimer disease amyloid β -peptide upon zinc binding and in vitro aging. *J. Biol. Chem.* **281**: 2151-2161.
- Zou, K., Gong, J.-S., Yanagisawa, K., and Michikawa, M. (2002) A novel function of monomeric amyloid β -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J. Neurosci.* **22**: 4833-4841.

**Caractérisation structurale et thermodynamique
du complexe Cu^{II}-A β**

Avant propos

Il a été proposé que le site de fixation du métal se situe dans les 16 premiers acides aminés du peptide A β (chapitre 1, partie IV), impliquant notamment les histidines en position 6, 13 et 14 (figure 2.1). De plus, ce peptide A β 16 tronqué n'a pas la tendance à agréger ou à former des fibres lorsqu'il est à des concentrations modérées, contrairement aux A β 40 ou A β 42. Il est donc couramment utilisé pour mimer le comportement du peptide A β 42 sous forme soluble vis-à-vis de la fixation des métaux.

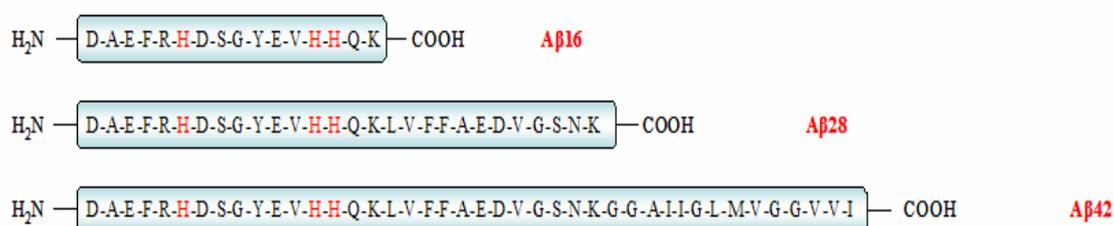


Figure 2.1. Séquence des peptides A β . Les Histidines (en position 6,13,14) impliquées dans l'interaction avec le cuivre sont symbolisées en rouge

De même, un peptide plus long, l'A β 28 (constitué des acides aminés 1 à 28) est également souvent utilisé comme peptide modèle pour la fixation des métaux. Il contient aussi le site de fixation des métaux, mais présente aussi la particularité d'agréger lentement, et de pouvoir former des fibres. Il permet donc de mimer le comportement des peptides A β 40 et A β 42 pour la liaison cuivre/A β et pour l'agrégation.

L'utilisation des peptides modèles n'exclue évidemment pas la nécessité d'étudier les complexes formés avec les peptides A β 40 et A β 42. La stratégie a donc été d'utiliser dans un premier temps les peptides modèles, A β 16 et A β 28, car plus faciles à manipuler et moins chers, puis d'étendre ensuite les études aux peptides A β 40 et A β 42, directement impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Cela a permis de valider les peptides les plus courts comme modèles pour la fixation des métaux pour les formes solubles de A β 40 et A β 42 mais aussi de trouver des différences pouvant expliquer la toxicité des oligomères formés par les peptides A β 40 et A β 42.

I. Nombre de sites de fixation et constantes d'affinités

Quand on parle d'interaction métal-peptide, les premières questions qui viennent à l'esprit sont « Combien le peptide peut-il fixer d'ions métalliques ? » et « quelle est la force de ces interactions ? »

La coordination du Cu^{II} au $\text{A}\beta$ a été très étudiée. Nous avons déjà vu que les peptides $\text{A}\beta_{16}$ et $\text{A}\beta_{28}$ peuvent lier spécifiquement 2 équivalents de cuivre (chapitre 1, paragraphe IV.1) : un site de forte affinité et un site avec une affinité plus faible. Cependant, les constantes de fixation associées sont encore très discutées. Les valeurs, rapportées dans la littérature vont de 1.5 nM (Syme *et al.*, 2004; Karr *et al.*, 2005) à 6.3 μM (Atwood *et al.*, 2000) pour le site de plus grande affinité soit un rapport de grandeur de 10^9 ! Or il est important de connaître cette valeur pour expliquer les échanges d'ions métalliques entre les protéines *in vivo*. Cela permet également d'estimer si l' $\text{A}\beta$ est capable de lier le cuivre *in vivo*. La constante de fixation du second site n'est pas décrite dans la littérature.

Notre première étude a donc été de déterminer l'ordre de grandeur de ces interactions.

I.1 Vérification du nombre de sites de fixation

Pour déterminer le nombre de site de fixation du cuivre, sur les peptides, une technique classique est de faire une compétition avec un chélatant du cuivre.

La résine chelex se présente sous forme de billes à la surface desquelles ont été greffés des groupes fonctionnels iminodiacétates capables de former des liaisons de coordination avec les métaux via les atomes d'oxygène et d'azote. Cette spécificité permet de différencier les fractions de cuivre « libre » et de cuivre lié par une combinaison de facteurs cinétiques et d'exclusion par la taille (Florence et Batley, 1977). Il a une affinité faible pour le cuivre et fixe donc uniquement le cuivre libre (ions Cu^{II} en solution non fixés par l' $\text{A}\beta$) dans la solution, plus facile d'accès sans prendre celui lié à l' $\text{A}\beta$. Une simple centrifugation permet de séparer le chelex du peptide. En ajoutant du chelex à une

solution d'A β en présence d'un excès de cuivre, on peut donc en déduire la quantité de cuivre lié à l'A β , c'est-à-dire le nombre de site de fixation de cuivre sur l'A β .

Des ajouts successifs d'une solution de chlorure de cuivre (jusqu'à 4 équivalents de Cu^{II} par rapport à l'A β) ont été effectués sur une solution de A β (100 μM) dans un tampon Hepes 50mM, NaCl 100 mM pH 7,4. Les spectres UV-visible obtenus avec le peptide A β 16 sont représentés sur la figure 2.2.

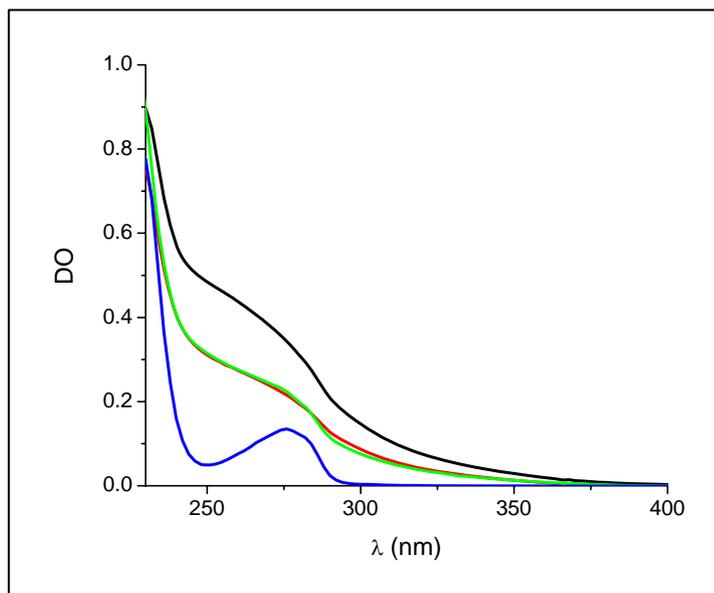


Figure 2.2. Détermination du nombre de site de fixation de cuivre sur l'A β 16 en spectroscopie UV-Visible. La solution de peptide A β 16 (courbe bleue) est de 100 μM dans un tampon Hepes 50mM, NaCl 100 μM à pH=7,4. Des ajouts de successifs de 2 et 4 équivalents de cuivre, (respectivement courbes rouge et noire), sont effectués. Après ajout du chelex (chélatant du cuivre) et séparation par centrifugation, la courbe verte est observée. Elle est similaire à la courbe correspondant à $\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-A}\beta$ 16.

La courbe bleue représente le spectre du peptide seul dans le tampon. On observe la bande d'absorption de la tyrosine à 276 nm qui permet par ailleurs de déterminer la concentration du peptide (chapitre 5). L'ajout de cuivre provoque l'apparition de nouvelles bandes, notamment des bandes dues au transfert de charge Cu-Histidine, indiquant une interaction du cuivre avec le peptide.

Une solution de chelex est ajoutée, sur un mélange A β 16 + 4 équivalents de Cu^{II} (courbe noire). Le tout est mélangé puis centrifugé. Le spectre obtenu (courbe verte) est alors similaire à celui obtenu pour l'A β en présence de 2 équivalents de cuivre (courbe rouge). Sur les 4 équivalents de cuivre initialement introduits, 2 ont été fixés par le

chelex. 2 équivalents de Cu^{II} seulement avaient donc été réellement fixés par l'A β 16. Le peptide possède donc deux sites de fixations pour le cuivre.

Les résultats obtenus sont similaires pour les 4 peptides A β 16, A β 28, A β 40 et A β 42. Tous ces peptides possèdent donc 2 sites de fixation pour le Cu^{II}.

Ce résultat concorde avec la littérature (Atwood *et al.*, 2000; Syme *et al.*, 2004). Il sera également confirmé par des études présentées ultérieurement ayant permis de déterminer les constantes de fixation associées à ces deux sites.

I.2 Constantes de fixation

Connaître la force de l'interaction entre le peptide A β et le cuivre est important pour la compréhension des transferts des métaux *in vivo*. De plus, la conception de nouveaux médicaments comme chélateurs des métaux est un axe de recherche thérapeutique important dans la lutte contre Alzheimer, comme nous l'avons décrit dans la première partie. Or de tels chélateurs ne doivent pas appauvrir l'organisme en métaux mais perturber l'interaction métal-A β . Leur affinité pour le cuivre doit donc être légèrement supérieure à celle de l'A β .

Pour déterminer les constantes d'affinité correspondant aux deux sites de fixation du cuivre, deux techniques ont été utilisées: la titration calorimétrique isotherme et la spectroscopie de fluorescence.

L'affinité du peptide pour le cuivre pour les différents peptides a été déterminée à pH physiologique (pH \sim 7,4) en présence de NaCl (50mM). Pour cela nous avons travaillé en milieu tamponné. Or le tampon a aussi une affinité (plus ou moins forte) pour le cuivre. Les constantes mesurées sont donc des constantes apparentes à pH 7,4 car il y a une compétition pour la fixation du cuivre entre le tampon et le peptide. Cependant cela suffit pour les comparer à d'autres constantes d'affinité cuivre-protéine, souvent mesurées dans des conditions similaires, et qui sont donc aussi des constantes apparentes.

I.2.a La Titration Calorimétrique Isotherme (ITC)

La titration calorimétrique isotherme (ITC) est une méthode de choix pour étudier la force d'interaction entre deux molécules (voir matériel et méthode) (Wiseman *et al.*, 1989 ; Jelesarov et Bosshard, 1999 ; Leavitt et Freire, 2001). Elle permet de mesurer directement la chaleur associée à la formation d'un complexe et d'en déduire ainsi la constante d'affinité. Les expériences sont réalisées à température constante, dans une enceinte adiabatique par titration d'une solution de peptide par une solution de chlorure de cuivre. Après chaque ajout d'une petite quantité de cuivre, la chaleur absorbée ou fournie pour maintenir la température constante est mesurée. De là, 3 paramètres fondamentaux (la stoechiométrie, les constantes d'affinité, et l'enthalpie) peuvent être déduits. L'entropie peut être ensuite calculée à partir des constantes d'affinité et de l'enthalpie.

Le choix du tampon

Les concentrations nécessaires pour étudier l'interaction varient en fonction de la constante de dissociation. Les valeurs relevées dans la littérature indiquent une constante de dissociation aux environs de 1 μM . Pour mesurer l'interaction sans difficulté, le produit de la constante K_a par la concentration en peptide (c) doit être comprise entre 10 et 200 : $10 < K_a * c < 200$. Cela se traduit par une concentration d'A β comprise entre 10 μM et 200 μM . Par ailleurs, la concentration en Cu^{II} doit être une douzaine de fois celle en peptide. L'enceinte adiabatique, qui contient la solution de peptide, a un volume de 1,3 ml. La seringue d'injection, qui contient la solution de chlorure de cuivre, a un volume de 296 μl . D'après nos expériences et la littérature, il y a deux sites de fixation pour le cuivre sur le peptide. Pour les visualiser, il faut donc utiliser une concentration en cuivre légèrement supérieure à $(1,3 / 0,296) * 2 * 80 \mu\text{M}$ soit environ 1 mM. Or, à cette concentration, le cuivre précipite dans certains tampons. Leur utilisation aboutirait donc à des valeurs erronées. Des tests de la solubilité du cuivre à 1mM dans différents tampons (Hepes, Tris, Mops, phosphate..) ont donc été réalisés en spectroscopie UV. C'est ainsi que l'utilisation du tampon phosphate a été exclue.

De plus, le tampon doit également ne pas avoir une affinité trop élevée pour le cuivre qui doit être facilement accessible par le peptide. Plus la constante d'affinité du tampon pour le cuivre est élevée, plus le peptide aura des difficultés à le lui arracher et

plus la valeur de la constante obtenue apparaîtra comme faible. Si l'interaction cuivre-tampon est trop forte, elle peut même masquer un site de fixation, la constante d'affinité peptide-cuivre devenant inférieure à la limite de détection de l'ITC. Comme nous le verrons, c'est le cas pour le second site de fixation avec le tampon le tampon Tris, qui a une affinité pour le cuivre de 10^4 M^{-1} (Martell *et al.*, 2004).

Le tampon Hepes a une affinité peu élevée pour le cuivre, $K_a = 10^2 \text{ M}^{-1}$ (Martell *et al.*, 2004). De plus, au pH considéré, la solubilité du cuivre est supérieure au millimolaire. Il convient donc pour cette étude. Les mesures d'ITC ont été effectuées à $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ dans un tampon 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH = 7,4.

Les titrations

Les mesures d'ITC nécessitent un certain temps (équilibre préalable de l'appareil, retour à l'équilibre après chaque ajout de cuivre, etc ..), elles n'ont donc été effectuées qu'avec les peptides A β 16 et A β 28. Avec les peptides A β 40 et A β 42, l'agrégation risque d'interférer avec la complexation. Il serait alors impossible de distinguer la chaleur dégagée due à la fixation du cuivre et celle due à l'agrégation. En revanche cela serait une expérience intéressante pour étudier l'agrégation. Les valeurs des constantes d'affinité pour ces deux peptides seront déterminées par spectroscopie de fluorescence, où les mesures sont beaucoup plus rapides (paragraphe II de ce chapitre).

La figure 2.3 illustre les résultats obtenus lors des titrations des solutions d'A β 16 et A β 28 avec 2,6 équivalents de Cu^{II} . La courbe A représente les résultats bruts, c'est-à-dire les chaleurs mesurées après chaque ajout de cuivre dans la cellule. La courbe B représente les données traitées, intégration des données brutes (chaleur dégagée par mole de ligand) avec le programme fourni par le fabricant Origin® pour ITC. Elle est caractéristique de deux sites de fixation avec deux constantes différentes. Après 2 équivalents de cuivre, il n'y a plus d'interaction entre le peptide et le métal et on observe juste un effet de dilution. La courbe C illustre les données traitées de l'expérience avec le peptide A β 28.

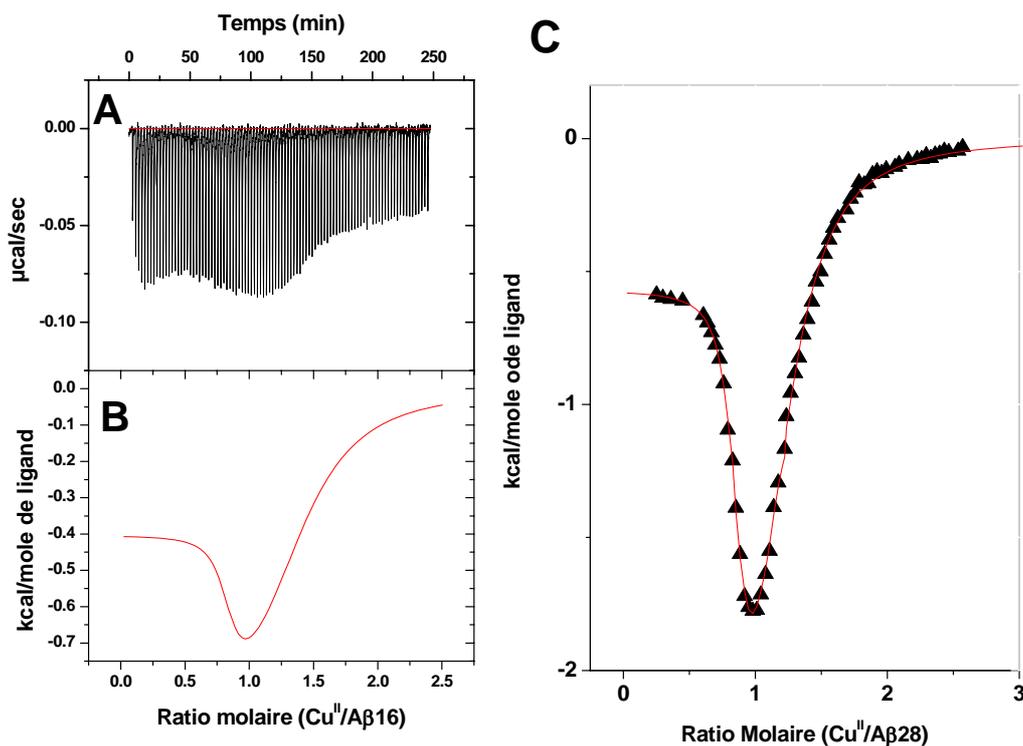


Figure 2.3. Titration Calorimétrique Isotherme d'une solution de $\text{A}\beta$ par une solution de chlorure de cuivre. La concentration initiale en peptide de $80\mu\text{M}$ et celle de cuivre 1mM . Toutes les solutions sont dans un tampon Hepes 50mM , NaCl 100mM à pH 7.4 . **A)** Données brutes d'une solution de $\text{A}\beta 16$ titrée par une solution de cuivre. **B)** et **C)** représentent respectivement les données traitées pour la titration des solutions de $\text{A}\beta 16$ et $\text{A}\beta 28$. La courbe rouge symbolise la meilleure simulation pour la détermination des paramètres enthalpiques.

Ces courbes sont ajustées avec une régression utilisant la méthode des moindres carrés pour obtenir la constante d'association (K_a), le nombre de molécules de peptide par complexe de Cu^{II} (stœchiométrie, n), et l'enthalpie associée à l'interaction (ΔH). Il a été décrit que les peptides $\text{A}\beta$ possèdent 2 sites de fixation pour le cuivre. Nos expériences avec le chelex l'ont confirmé (paragraphe I.1). Le modèle avec 2 sites de fixation a donc été utilisé. Les meilleures simulations donnent les valeurs reportées dans le tableau 2.1.

Tous ces paramètres sont évalués avec une incertitude inférieure à 10%.

Les meilleures simulations, que ce soit pour le peptide $\text{A}\beta 16$ ou $\text{A}\beta 28$, révèlent des stœchiométries 0.8 ± 0.1 et 0.7 ± 0.1 respectivement pour le premier et le second site de fixation. Ceci est légèrement inférieur à une stœchiométrie totale de 2 sites, correspondant à la formation des complexes $\text{Cu}^{\text{II}}_1\text{-A}\beta 16/28$ et $\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-A}\beta 16/28$ comme le suggère les expériences spectroscopiques effectuées dans les mêmes conditions (UV-Vis

et RPE). Cependant il est décrit dans la littérature, que lors des analyses des courbes calorimétriques avec 2 sites de fixation sur d'autres systèmes, la stoechiométrie obtenue pour la meilleure simulation diffère souvent légèrement de 1. (Zhang et Wilcox, 2002). Des simulations ont donc également été effectuées en fixant les stoechiométries de chacun des sites à 1,0. Dans ces conditions, les autres paramètres (K et ΔH) n'ont pas été significativement modifiés.

	Aβ16	Aβ28
n₁	0,82	0,84
K₁	1,1.10 ⁷ M ⁻¹	1,4.10 ⁷ M ⁻¹
ΔH₁	- 0,42 kcal.mol ⁻¹	- 0,53 kcal.mol ⁻¹
ΔS₁	31 cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹	31 cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹
n₂	0,73	0,68
K₂	1,4.10 ⁵ M ⁻¹	1,1.10 ⁵ M ⁻¹
ΔH₂	- 0,93 kcal.mol ⁻¹	- 3,60 kcal.mol ⁻¹
ΔS₂	21 cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹	11 cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹

Tableau 2.1. Valeurs des paramètres obtenus avec la meilleure simulation pour les peptides Aβ16 et Aβ28.

Les constantes apparentes de fixation pour le site fort et le site faible sont similaires pour les deux peptides Aβ16 et Aβ28. Pour le site de forte affinité, les meilleures simulations aboutissent à des valeurs comprises entre 1 * 10⁷ et 1,5 * 10⁷ M⁻¹. Cela revient à des constantes de dissociation apparentes K_{d,app} entre 60 et 100 nM.

Pour le site de plus faible affinité, les constantes apparentes obtenues sont environ 100 fois plus faible, c'est-à-dire un K_{d,app} aux environs de 10 μM.

Un autre paramètre thermodynamique obtenu est l'enthalpie. L'enthalpie de la réaction est relativement faible, -0.42 et -0.53 kcal.mol⁻¹ respectivement pour les deux solutions Aβ16 et Aβ28. En revanche, la contribution entropique calculée est assez élevée, environ 31 cal.mol⁻¹.K⁻¹ dans les deux cas.

Des différences notables apparaissent sur le second site de fixation. Dans le cas de l'Aβ16, la meilleure simulation indique une enthalpie de réaction de l'ordre de -1 kcal.mol⁻¹, alors que pour l'Aβ28 elle est trois fois plus faible (-3 kcal.mol⁻¹). En conséquence, l'entropie du second site d'affinité est de 21 cal.mol⁻¹.K⁻¹ dans le cas de Aβ16 mais seulement de 11 cal.mol⁻¹.K⁻¹ pour Aβ28.

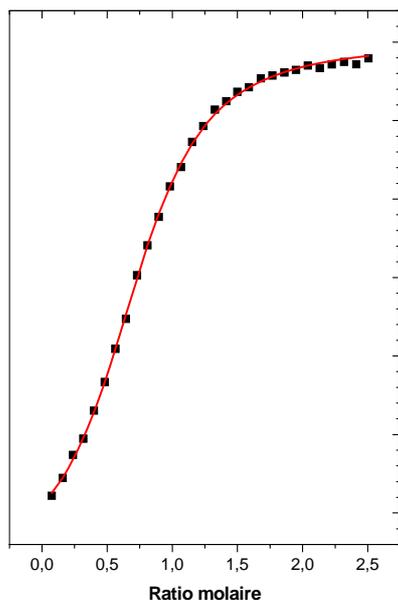
Le site de faible affinité ne peut pas être analysé aussi facilement que le site fort comme nous le verrons tout au long de ce chapitre. Il n'est pas possible de conclure exactement sur l'origine des différentes contributions de l'entropie et de l'enthalpie. Cependant le fait que ΔS_2 soit de $10 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ plus faible avec A β 28 qu'avec A β 16 peut être expliqué par le fait qu'une molécule d'eau n'est pas libérée lors de la formation de la liaison $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta$ 28 (mais libérée avec A β 16). La valeur de $9.5 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ par molécule d'eau libérée venant du cuivre a été reportée (Blasie et Berg, 2003) ; en solution le cuivre est hydraté, sous forme $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2$. Cela est en accord avec la présence d'un site labile sur le site de faible affinité avec A β 28 (mais pas A β 16). Ce phénomène sera décrit dans la partie III.2 de ce chapitre 2.

La plus forte contribution entropique dans le cas du premier site de fixation comparativement au second pourrait être due à l'un des phénomènes suivants :

- (i) libération d'un plus grand nombre de molécules d'eau venant du Cu^{II} hydraté ou du peptide lors de la formation du complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta$.
- (ii) changements de conformations, correspondant à une plus grande organisation lors de la fixation du second Cu^{II} , induisant une diminution du degré de liberté.
- (iii) changements entropiques dus à la protonation du tampon. Des protons originaires du ligand pourraient être déplacés lors de la formation de la liaison entre le Cu^{II} et le peptide.

Des expériences ont également été réalisées dans le tampon Tris qui a une constante d'affinité pour le cuivre estimée 100 fois supérieure à celle du tampon Hepes (Martell *et al.*, 2004). Cela influe sur les résultats obtenus (figure 2.4).

La courbe obtenue est très différente des précédentes, étant caractéristique d'un seul site de fixation. Cela s'explique par la forte affinité du Tris pour le cuivre ($K_a = 10^4 \text{ M}^{-1}$). Elle est si forte que la fixation du cuivre sur le second site du peptide ne peut pas être détectée. En effet, le $K_{d,\text{app}}$ obtenu dans le Tris est diminué d'environ un facteur 100 par rapport à celui du tampon Hepes. Ainsi la constante apparente pour le premier site est de l'ordre de $K_{a,\text{app}} = 1,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ soit un $K_{d,\text{app}} \sim 7,2 \text{ }\mu\text{M}$. Pour le second site, le $K_{a,\text{app}}$ qui était de 10^5 M^{-1} dans l'Hepes, devrait être de l'ordre de 10^3 M^{-1} . Or la limite de détection par l'ITC est à 10^4 M^{-1} . Par conséquent, ce second site de fixation n'est pas observable et la courbe semble indiquer la présence d'un seul et unique site de fixation pour le cuivre.



Stoechiométrie (n)	0.88
K_a (M^{-1})	$1,28 \cdot 10^5$
ΔH (kcal.mol^{-1})	- 3,222
ΔS ($\text{cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)	12,56

Figure 2.4. Titration Calorimétrique Isotherme d'une solution de Aβ16 par une solution de chlorure de cuivre dans un tampon Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. A) La concentration initiale de peptide dans la cellule est de 80 μM et celle de cuivre 1 mM. L'interaction Cu-tris est beaucoup plus forte que celle entre le cuivre et l'Hepes. Le premier site de fixation de l'Aβ16 apparaît avec une constante plus faible. Le second site de fixation est quant à lui masqué, l'interaction devenant inférieure à la limite de détection de l'ITC. **B)** Paramètres obtenus avec la meilleure simulation pour la titration.

Si le Cu^{II} se fixe au ligand protoné (par exemple HisH^+), des protons H^+ sont dégagés lors de la formation de la liaison $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta$, et se fixent au tampon. Connaissant la différence d'énergie de protonation des tampons Tris et Hepes, et la différence d'enthalpie des deux réactions, on peut avoir une idée du nombre de protons dégagés lors de la formation du complexe.

L'enthalpie de protonation de l'Hepes est de $-5,18 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour une solution à 25°C et ayant une conductivité $\mu = 0,1$. Celle du Tris dans les mêmes conditions est de $-11,34 \text{ kcal.mol}^{-1}$. La différence d'enthalpie entre les réactions effectuées dans le Tris et dans l'Hepes ($-2,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$), provient principalement de la différence d'enthalpie de la protonation entre les tampons ($-6,22 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Le nombre de protons libérés par le peptide au cours de la réaction est donc égal au rapport de ces différences soit $2,8/6,22$; c'est-à-dire 0,42.

En considérant que les His en position 6, 13 et 14 sont des ligands (comme nous le confirmerons au chapitre II), il est possible de calculer le nombre H^+ libérés par les His lors de la fixation du cuivre en se basant sur leur pKa. A pH 7,4 les histidines sont partiellement protonées.



Les pKa des His, 6,13 et 14 sont respectivement 7, 6,9 et 6,8 (+/- 0,1) (Zirah *et al.*, 2006). La relation entre pH et pKa est la suivante $\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{[\text{His déprotonée}]}{[\text{His protonée}]} \right)$. On peut donc en déduire que $\frac{[\text{His protonée}]}{[\text{His déprotonée}]} = 10^{(\text{pH}-\text{pKa})}$. Le pH est égal à 7,4. A ce pH, les His 6, 13 et 14 sont majoritairement déprotonées, il reste respectivement 0,28, 0,24 et 0,20 H⁺ fixés. Au total cela fait 0,72 H⁺ qui seront libérés lors de la fixation du cuivre. Le résultat est donc légèrement différent des 0,42 déduits des expériences de calorimétrie. Cependant on ne tenait pas compte de l'interaction entre le cuivre et le tampon : $\Delta H_{\text{réaction}} = \Delta H_{\text{formation complexe}} + \Delta H_{\text{protonation-tampon}} - \Delta H_{\text{Cu}^{\text{II}}\text{-tampon}} - \Delta H_{\text{H}_2\text{O-peptide}}$. Il s'avère que celle-ci n'est en fait pas négligeable.

I.2.b La Fluorimétrie

La simulation pour l'analyse de données en ITC requiert 6 paramètres: enthalpie, constante d'affinité et stoechiométrie pour chaque site de fixation. D'autres méthodes ont été utilisées pour confirmer les résultats de l'ITC.

Les mesures spectroscopiques et la littérature suggèrent que les peptides Aβ16/28 ont deux sites de fixation pour le cuivre avec une stoechiométrie 1:1 pour chaque site. Il est difficile de déterminer l'enthalpie autrement que par ITC. Le seul paramètre qui peut encore être confirmé est donc la constante de dissociation Kd des deux sites dans les mêmes conditions expérimentales que celles de l'ITC (tampon, pH, température).

La titration du cuivre

Les peptides amyloïdes possèdent des propriétés en fluorescence dues à la présence de la Tyrosine en position 10 dans la séquence, sensible à la liaison avec le cuivre. En appliquant une excitation à une longueur d'onde de 270 nm, on observe une réémission de l'énergie absorbée à 308 nm. Lorsque le peptide fixe le cuivre, l'intensité du signal réémis diminue (figure 2.5). Ainsi, il est possible de suivre la fixation du cuivre en fluorescence. Des expériences ont donc été réalisées pour déterminer les constantes de fixation sur les différents peptides (Aβ16/28/40/42).

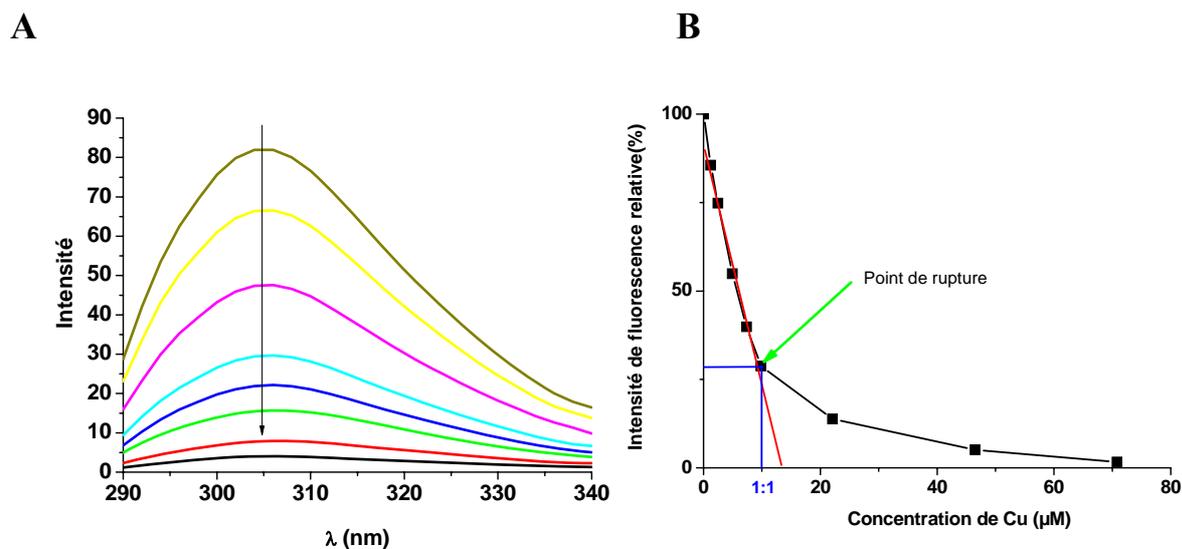


Figure 2.5. Titration d'une solution de peptide $\text{A}\beta_{40}$ par une solution de cuivre suivie en Fluorescence. (A) Les courbes représentent les spectres d'émission obtenus sur les différentes solutions après excitation à $\lambda = 270 \text{ nm}$. Plus la concentration en cuivre est importante et plus l'intensité du signal diminue. (B) Intensité de fluorescence relative au dosage d'une solution de $10 \mu\text{M}$ de $\text{A}\beta_{16}$ par additions successives de CuCl_2 .

La figure 2.5.A représente le dosage d'une solution d'amyloïde ($10 \mu\text{M}$) par une solution de cuivre. La courbe « kakie » est obtenue avec l'apo-peptide. Les ajouts successifs diminuent le signal de fluorescence de la tyrosine.

Ces résultats peuvent être traduits en fonction du nombre d'équivalent de cuivre (figure 2.5.B). La courbe ainsi obtenue peut être décomposée en 2 parties : une première où la diminution du signal est linéaire et une seconde où la diminution est logarithmique.

La première partie linéaire correspond à la fixation du cuivre sur le site de haute affinité. Ceci est en accord avec le fait que la constante de dissociation du premier site de fixation (100 nM) est plus faible que la concentration utilisée ($10 \mu\text{M}$) d'environ un facteur 100. Tout le cuivre ajouté jusqu'à un équivalent par rapport au peptide est fixé entièrement par le premier site de fixation.

Lorsque le premier site de fixation est plein, le second site va se remplir à son tour. Un point de rupture est d'ailleurs très nettement observable sur la figure 2.5.B, correspondant au changement de l'affinité du peptide pour le cuivre. Les ajouts de cuivre conduisent à une courbe de type logarithmique. Le cuivre est donc en équilibre entre une forme liée par le peptide (pour former des complexes $\text{Cu}_2^{\text{II}}\text{-A}\beta$ avec une constante de

dissociation du même ordre de grandeur que la concentration de peptide) et une forme libre. L'affinité du second site peut être estimée en se basant sur l'équilibre suivant (1):



La constante apparente de l'équilibre est donc :

$$K_{d_{\text{app}}} = \frac{[\text{Cu}_1^{\text{II}}\text{-A}\beta] [\text{Cu}^{\text{II}}]}{[\text{Cu}_2^{\text{II}}\text{-A}\beta]} \quad (2)$$

La concentration $[\text{Cu}_2^{\text{II}}\text{-A}\beta]$ est estimée par la diminution du signal en fluorescence après formation du complexe $\text{Cu}_1^{\text{II}}\text{-A}\beta$. Quand le signal a diminué de moitié alors on a $[\text{Cu}_2^{\text{II}}\text{-A}\beta] = [\text{Cu}_1^{\text{II}}\text{-A}\beta]$. La constante apparente $K_{d_{\text{app}}}$ est alors égale à la concentration de cuivre libre $[\text{Cu}^{\text{II}}]$ qui est la différence entre le cuivre total introduit moins celui lié à l'Aβ (c'est à dire $[\text{Cu}_1^{\text{II}}\text{-A}\beta]$ plus $[\text{Cu}_2^{\text{II}}\text{-A}\beta]$).¹

La constante apparente $K_{d_{\text{app}}}$ ainsi déduite est de 10 μM. Ce résultat est en accord avec celui obtenu en ITC.

L'expérience est réalisée avec tous les peptides, c'est-à-dire Aβ16, Aβ28, Aβ40 et Aβ 42. Les résultats pour les constantes de dissociation sont similaires, variant entre 40 et 100 nM pour le premier site de forte affinité et entre 5 et 10 μM pour le site le plus faible. L'affinité des peptides Aβ40 et Aβ42 pour le cuivre semble légèrement supérieure à celle des peptides Aβ16, Aβ28.

Compétition avec la L-Glycine et l'Histidine

Une méthode efficace pour déterminer une constante de fixation entre un peptide et un métal est d'effectuer une compétition avec un chélatant de ce métal dont l'affinité est connue. La L-Glycine et l'Histidine forment avec le cuivre des complexes, de stoechiométrie 2:1, décrit dans la littérature (Dawson *et al.*, 1986). Quand la Glycine (Gly) ou la L-Histidine sont introduites, elles entrent en compétition avec le peptide Aβ

¹ Dans l'exemple ci-dessus, une diminution de la moitié du signal est observée pour une concentration totale en Cu^{II} dans la solution $[\text{Cu}^{\text{II}}]_0$ à 25 μM. La concentration initiale en peptide $[\text{A}\beta]_0$ est de 10 μM. La concentration de cuivre liée à l'équilibre $[\text{Cu}_2^{\text{II}}\text{-A}\beta] + [\text{Cu}_1^{\text{II}}\text{-A}\beta]$ est donc de 15 μM. La concentration de cuivre libre est alors égale à $[\text{Cu}^{\text{II}}]_0 - ([\text{Cu}_2^{\text{II}}\text{-A}\beta] + [\text{Cu}_1^{\text{II}}\text{-A}\beta])$ soit 10 μM.

pour la fixation du cuivre et le signal de la Tyrosine va réapparaître. A pH 7.4, les constantes apparentes sont de $7.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ pour $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Gly}_2$ et de $2.4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ pour $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-His}_2$.

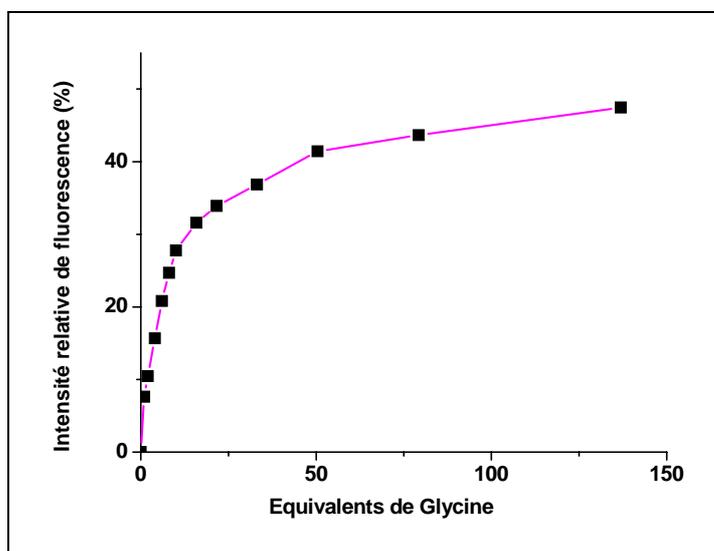


Figure 2.6. Intensité de fluorescence relative du dosage d'une solution de $100 \mu\text{M}$ de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta 16$ par additions successives de Glycine. Expérience réalisée dans un tampon Hepes 50 mM , $\text{NaCl } 100 \text{ mM}$, pH 7,4.

Comme nous l'avons montré précédemment, l'addition du premier équivalent de cuivre diminue le signal de fluorescence d'environ 70%. L'ajout du second équivalent de Cu^{II} annihile les 30% restant. La Glycine est ajoutée sur une solution de $\text{A}\beta$ contenant 2 équivalents de Cu^{II} liés, c'est-à-dire à $\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-A}\beta 16$. Pour s'assurer que le second équivalent est quantitativement fixé à l' $\text{A}\beta$, les expériences sont réalisées à une concentration plus élevée ($100 \mu\text{M}$). La titration avec la Glycine fait réapparaître la fluorescence de la tyrosine (figure 2.6).

Ici encore, deux parties distinctes apparaissent sur la courbe. La première correspond à la réapparition des 30% de fluorescence après l'addition de quelques équivalents seulement. La Gly est capable de prendre le Cu fixé par le second site de fixation. Après l'addition d'un peu plus de 2 équivalents de Gly, l'intensité de fluorescence est revenue à plus de 15 % ; c'est-à-dire qu'environ la moitié du Cu est arraché après l'addition d'un peu plus de 2 équivalents de Gly. Cela indique que le K_a de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Gly}_2$ est au moins aussi fort que le site de faible affinité. Ce résultat est en accord avec un K_a autour de 10^5 M^{-1} déduit des expériences en ITC et par les mesures directes en fluorescence (paragraphe précédent). Après l'addition 120 équivalents de Gly (seconde partie de la figure 2.6), les 70% réapparaissent lentement, en accord avec un K_a

de Cu^{II}-Gly₂ plus petit que le site de forte affinité de Aβ. Ce résultat corrobore les études précédentes avec un K_a aux environs de 10⁷ M⁻¹. Les résultats sont similaires pour les peptides Aβ_{16/28/40} et 42.

L'étude portant sur le premier site de fixation a montré que la moitié du signal maximal de fluorescence réapparaît avec environ 20 équivalents de glycine. Il faut 2 molécules de Glycine pour un ion cuivre pour former le complexe Cu^{II}-Gly₂. Cela implique que l'affinité de l'Aβ pour le Cu^{II} est donc au moins 10 fois supérieure à celle de la glycine. La constante pour le site fort est donc au moins dans le submicromolaire (K_d << 0,5 μM)

Des titrations analogues de solutions de Cu^{II}-Aβ ont été effectuées avec la L-Histidine. Dans ce cas, la fluorescence de la tyrosine revient à son maximum après l'addition d'un peu moins de 2.5 équivalents de L-Histidine. Deux molécules de L-Histidine fixent un seul ion cuivre Cu²⁺ avec une constante apparente de 4.2 nM à pH 7,4. Cela signifie donc que l'affinité pour le cuivre de la L-His est environ 8 fois plus forte que celle de l'Aβ.

Ainsi la constante d'affinité du premier site de fixation du cuivre des peptides Aβ a pu être encadrée. Elle est plus forte que 7,5 * 10⁵ M⁻¹ mais plus faible que 2,4 * 10⁸ M⁻¹. Cela confirme donc bien un K_{d,app} de ~ 0,1 μM pour le site de forte affinité. Des expériences de compétitions à un pH de 7,8, figurent déjà dans la littérature (Syme *et al.*, 2004) et ont abouti à des conclusions similaires.

Les analyses spectroscopiques vont dans le même sens que l'ITC. Elles confirment bien la stoechiométrie : présence de 2 sites de fixation sur tous les peptides Aβ avec des constantes de dissociation respectives de l'ordre de 100 nM et 10 μM.

Ces résultats sont particulièrement intéressants car ils nous renseignent sur la capacité de l'Aβ à lier le cuivre *in vivo*.

La concentration extracellulaire de cuivre est en moyenne de 10 μM dans le plasma avec des pics atteignant même 15 μM (Lovell *et al.*, 1998). La constante déterminée pour le site de fixation le plus fort est entre 100 et 1000 fois plus faible que ces concentrations. Principalement, l'Aβ est donc capable de fixer le cuivre *in vivo* dans son site de forte affinité.

La constante apparente du second site est par contre 100 fois inférieure à celui du premier site; elle est donc du même ordre de grandeur que la concentration en cuivre dans le domaine extracellulaire. En théorie, une fixation du cuivre sur le second site de l'A β est possible, mais dans la réalité, il y a probablement d'autres protéines avec des constantes de fixation plus forte. Il n'y aura donc pas de cuivre dans ce second site. On peut donc s'interroger sur le rôle effectivement joué in vivo par ce second site.

De plus la « concentration » maximale d'A β sous forme de fibre peut être estimée à 100 mM, en se basant sur le modèle de Tycko *et al.*, 2003 qui est relativement dense. La densité des fibres dans les plaques est mal connue, mais elle semble aussi dense. Les concentrations de métaux dans les plaques sont de l'ordre de 1 mM pour le zinc et le fer et de 0,4 mM pour le cuivre. Cela laisse donc supposer que les métaux sont en sous stoechiométrie par rapport à l'A β . Des études récentes ont confirmé cette impression. L'analyse des plaques séniles a montré que le ratio pour A β /métal était entre 1/1 et 1/200 pour le Fe et le Zn et entre 1/10 et 1/2000 pour le Cu. (Beauchemin et Kisilevsky, 1998). Les sites de fixation ne sont que partiellement remplis. Dans le cas du cuivre, seul le site de plus forte affinité devrait être occupé, puisque le second site a une affinité plus faible. Cependant on ne peut pas exclure totalement la possibilité de fixation à ce second site dans le cas de concentrations locales fortes ou quand le premier site de fixation est endommagé, par exemple par la production d'espèces réactives de l'oxygène.

II. Les ligands mis en jeu

Il a été mis en évidence que les peptides A β possèdent 2 sites de fixation pour le cuivre. Une question intéressante est la détermination de la coordination du cuivre, de la nature des ligands mis en jeu dans chacun de ces deux sites.

Le site de forte affinité est déjà bien caractérisé. Comme nous l'avons vu au chapitre 1 paragraphe IV.2, il a été montré que les Histidines en position 6,13 et 14 sont des ligands du cuivre (Curtain *et al.*, 2001; Syme *et al.*, 2004; Schoneich et Williams 2002; Kowalik-Jankowska *et al.*, 2004; Karr *et al.*, 2004; Karr *et al.*, 2005; Tickler *et al.*, 2005). Cependant le 4^{ème} ligand fait toujours débat. Plusieurs acides aminés ont été proposés. Syme *et al.* ont montré par des analyses RMN que le NH_2 terminal peut être impliqué. Les 4 ligands du cuivre seraient alors 4 azote (3N d'histidine + NH_2 terminal). Cependant, les études RPE ont montré que l'environnement du Cu^{II} à pH 7 semblait être

3N/10. Les études suivantes ont pour but de déterminer quel est le 4^{ème} ligand oxygène et d'expliquer comment le NH_2 terminal pourrait lui aussi être impliqué.

Le site de faible affinité n'est pas décrit dans la littérature. Nous essayerons de déterminer les ligands mis en jeu ou du moins d'obtenir un maximum d'information sur ceux-là.

Les complexes peptide-métal ont été caractérisés par des études spectroscopiques (UV-Vis, RPE, RMN).

II.1 La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

La première information apportée par les spectres RPE est que les deux sites de fixation du cuivre sur les peptides sont assez éloignés l'un de l'autre. En effet, l'intensité des spectres correspondant aux ajouts successifs de cuivre augmente linéairement de 0 à 2 équivalents de cuivre (voir figure 2.7). Dans le cas d'un couplage entre les deux atomes de cuivre, il y aurait un élargissement des spectres et/ou l'intensité du signal serait diminuée. Or ce phénomène n'est pas observé. Il n'y a donc pas de couplage magnétique entre le premier et le second équivalent de cuivre (c'est-à-dire entre les deux sites de fixation). La distance qui sépare les 2 atomes de cuivre peut donc être estimée comme supérieure à 7 Å.

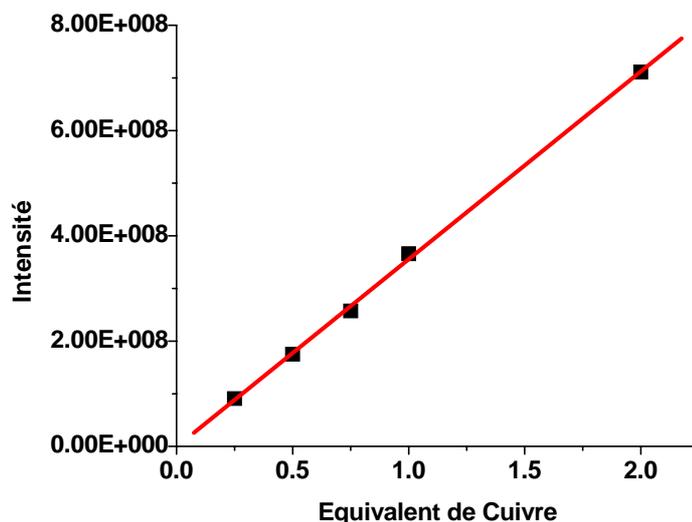


Figure 2.7. Double intégration des spectres RPE. L'intensité augmente linéairement avec le nombre d'équivalent de cuivre. Les expériences ont été réalisées RPE à 110K à pH=7.5 dans un tampon Hepes 50mM, NaCl 100mM, Glycérol 10%.

II.1.a Site de forte affinité

Le spectre RPE du complexe $Cu-A\beta_{16}$ à pH 7,4 est un spectre hétérogène (figure 2.8), avec au moins deux espèces mises en jeu. Deux espèces distinctes ont été isolées à pH 6 et pH 9. A pH 7,4 les paramètres des spectres RPE (A_{\parallel} , g_{\parallel} et g_{\perp}) sont intermédiaires entre ceux obtenus à pH 6 et pH 9. En effectuant une simulation, on remarque que les spectres obtenus à pH 7.4 sont des mélanges des formes à pH 6 (80%) et à pH 9 (20%). Les paramètres correspondent et les spectres sont superposables.

Le spectre RPE à pH 6 donne un signal caractéristique d'un complexe de cuivre de type II axial plan carré légèrement déformé. Les valeurs de A_{\parallel} , g_{\parallel} et g_{\perp} sont respectivement 168G, 2,27 et 2,06. Peisach et Blumberg ont montré que la combinaison des valeurs des paramètres A_{\parallel} et g_{\parallel} indiquent la nature des ligands impliqués. A ce pH, ils correspondent préférentiellement à trois atomes azotes et un d'oxygène (3N/1O) bien qu'une coordination faisant intervenir 2 azotes et 2 oxygènes (2N/2O) ne puisse totalement être écartée.

Lorsque le pH augmente, les spectres obtenus sont modifiés avec l'apparition de nouveaux jeux de paramètres. A pH 9, $A_{\parallel} = 203G$, $g_{\parallel} = 2,20$ et $g_{\perp} = 2,05$ sont caractéristiques d'un environnement avec 4 azotes (4N). A pH 7,4, les valeurs des paramètres sont intermédiaires avec $A_{\parallel} = 175G$, $g_{\parallel} = 2,26$ et $g_{\perp} = 2,06$.

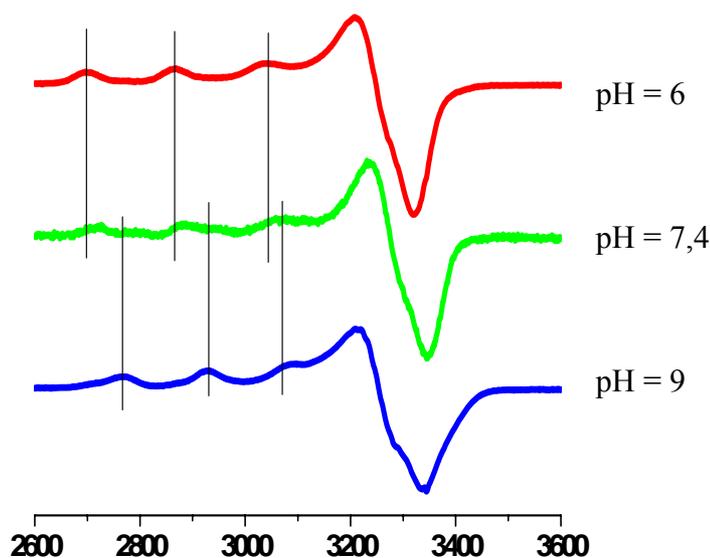


Figure 2.8. Spectres RPE des complexes $Cu^{II}-A\beta_{16}$ aux différents pH. Les courbes représentent de haut en bas les spectres recueillis à pH 6, 7,4 et 9 respectivement. Il apparaît clairement que la coordination des complexes change en fonction du pH.

Le complexe est donc hétérogène. Ces résultats sont intéressants mais avaient déjà été décrits dans la littérature (Syme *et al.* 2004 ; Kowalik-Jankowska *et al.* 2003; Karr *et al.* 2004). Nos spectres, à pH 7,4, sont d'ailleurs très similaires à ceux de Syme *et al.* .

La coordination 4N (minoritaire à pH 7,4) peut s'expliquer par la liaison des 3 His et du NH₂ terminal au cuivre. De plus en plus de preuves s'accumulent dans ce sens. Cependant, elle n'explique pas la forme majoritaire à pH 7,4 (3N/1O). Il est donc important de noter qu'un ligand participant par un oxygène à la liaison du cuivre n'est toujours pas élucidé.

Toujours dans l'optique de déterminer l'environnement des sites de fixations, le second site de fixation du cuivre a été étudié en RPE.

II.1.b Site de faible affinité

Ce second site est intéressant car il n'a été que peu étudié dans la littérature, seul Syme *et al.* s'y sont intéressés et uniquement à pH 7,4. L'étude de ce second site se fait par soustraction des spectres Cu^{II}₂-A β - Cu^{II}₁-A β . L'addition du second équivalent de Cu^{II} aux solutions d'A β 16, d'A β 28 et d'A β 40 à pH 7,4 induit également un spectre RPE caractéristique d'un mélange hétérogène. Ce second site de coordination montre des paramètres similaires à ceux du premier site à pH 7,4. Cela signifie qu'il y a là encore au moins 2 espèces, une avec un environnement 3N/1O et une avec un environnement 4N. Pour améliorer la résolution, les spectres ont été aussi réalisés à pH = 6 et 9, comme pour le premier site.

A pH 6 les spectres RPE de A β 16 et A β 28 sont très similaires et homogènes. Les paramètres obtenus $g_{\perp} = 2,06$, $g_{\parallel} = 2,27$ et $A_{\parallel} = 157$ G indiquent la formation d'un complexe plan carré légèrement déformé dans un environnement 3N/1O (Peisach et Blumberg, 1974).

A pH 9 les spectres RPE du site de faible affinité de A β 16 et A β 28 sont différents. Pour A β 28, le spectre est relativement homogène avec des paramètres $g_{\perp} = 2,06$, $g_{\parallel} = 2,23$ et $A_{\parallel} = 172$ G en accord avec une coordination 4N. Au contraire, le site de faible affinité de l'A β 16 est plus hétérogène avec au moins deux composants auxquels

correspondent deux jeux de paramètres $g_{\perp} = 2,07$, $g_{\parallel} = 2,28$ et $A_{\parallel} = 154$ G (3N/1O) et $g_{\perp} = 2,06$, $g_{\parallel} = 2,23$ et $A_{\parallel} = 173$ G (4N).

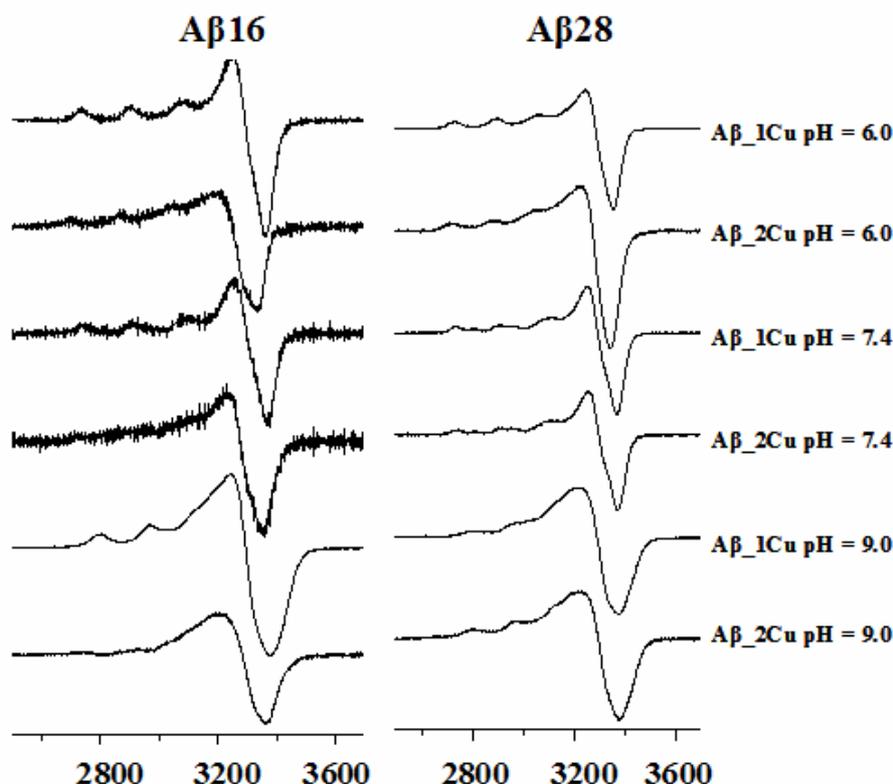


Figure 2.9. Spectres RPE des complexes $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta 16/28$ aux différents pH. Les courbes représentent de haut en bas les spectres recueillis à pH 6, 7,4 et 9 respectivement. Il apparaît clairement que la coordination des complexes change en fonction du pH. Les spectres $\text{A}\beta_2\text{Cu}$ correspondent à la différence entre les spectres obtenus avec 2 équivalents de cuivre et ceux avec un équivalent ($\text{A}\beta_1\text{Cu}$). Il s'agit en fait de l'effet du second équivalent.

Les résultats obtenus pour $\text{A}\beta 40$ sont proches de ceux obtenus pour $\text{A}\beta 28$. La coordination du cuivre du second site est similaire pour $\text{A}\beta 28$ et $\text{A}\beta 40$ mais différente pour $\text{A}\beta 16$. Le peptide $\text{A}\beta 16$ ne peut pas être utilisé comme modèle pour mimer la fixation du second équivalent de cuivre pour $\text{A}\beta 40/42$.

II.2 Spectroscopie UV

La liaison du cuivre sur le peptide se traduit en UV non seulement par l'apparition de nouvelles bandes autour de 270 nm dues au transfert de charge cuivre-Histidine mais aussi par l'apparition de la bande d-d du Cu^{II} aux environs de 600 nm. Cette bande est

caractéristique de l'environnement du cuivre : sa position dépend du type de ligands (soufre, azote ou oxygène). (Sigel et Bruce Martin, 1984)

La titration d'une solution de peptide amyloïde par une solution de cuivre permet d'observer les résultats suivants :

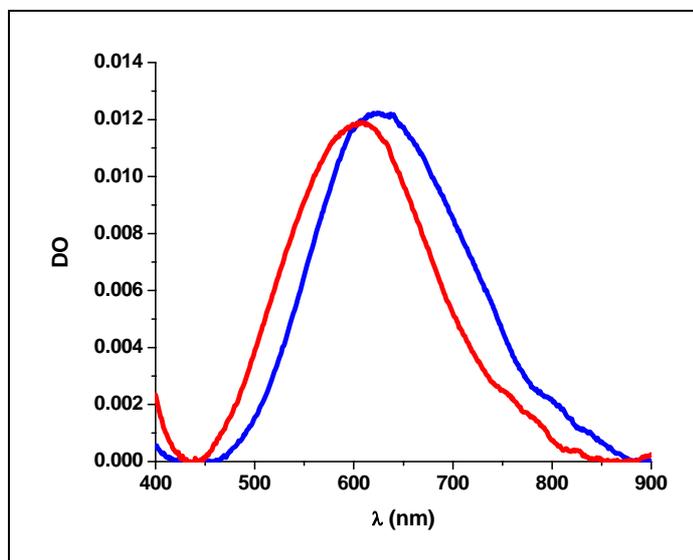


Figure 2.10. Bande d-d du cuivre en UV pour le premier et le second site de fixation du peptide $\text{A}\beta 16$. La courbe bleue représente le spectre obtenu pour le complexe $\text{Cu}_1^{\text{II}}\text{-A}\beta 16$ avec un maximum à 620 nm. La courbe rouge représente l'effet du second équivalent de cuivre. Elle correspond à la différence des spectres de $\text{Cu}_2^{\text{II}}\text{-A}\beta 16 - \text{Cu}_1^{\text{II}}\text{-A}\beta 16$ et montre un maximum à 600 nm.

Un maximum d'absorption à ~ 620 nm pour les bandes d-d du Cu suggère un site de fixation préférentiel avec l'une des configurations suivantes 3N/1O ou 4N. La configuration 2N/2O ne peut être totalement exclue. Cependant, nous savons que les His participent à la fixation du cuivre par 3 N imidazoliques. Le 4^{ème} ligand est soit un oxygène soit un azote. Ce résultat est en accord avec les études RPE.

Pour le second site, le maximum à 600 nm implique qu'au moins deux atomes d'azote sont impliqués c'est-à-dire 2N/2O, 3N/1O ou 4N. Cependant on ne peut pas trancher pour l'une ou l'autre des trois formes.

Dans le cas de $\text{A}\beta 28$, les maxima ont été respectivement obtenus à 610 nm et 600 nm pour les sites de forte et faible affinité avec des coefficients d'extinction molaire d'environ $60 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La méthode empirique de Sigel et Martin permet de dire qu'au moins 2 atomes d'azote sont impliqués comme ligands dans chacun des sites de fixation.

Ces résultats restent très limités et les expériences n'ont donc pas été réalisées avec les peptides A β 40 et A β 42. Cependant, ils vont dans le même sens que les études RPE.

En conclusion, à pH 7.4 le complexe Cu^{II}-A β est hétérogène. La forme majoritaire correspond à une coordination 3N/1O. Il a été montré que les 3 Histidines participent à la liaison du cuivre. Elles apportent donc 1N chacune. Quel est ce 4^{ème} ligand oxygène ? Pour le déterminer, nous avons utilisé la résonance magnétique nucléaire (RMN).

II.3 La RMN

Le Cu^{II} est paramagnétique (configuration de la couche externe d⁹). Lorsqu'il se lie au peptide, les résonances RMN ¹H des protons situés à proximité vont s'élargir à cause de l'augmentation du temps de relaxation de ¹H. Le temps de relaxation est fortement dépendant de la distance entre le Cu et le proton (1/r⁶) et les signaux des acides aminés coordonnés au métal ou les plus proches du centre métallique seront donc beaucoup plus affectés que les autres.

Des études RMN reportées dans la littérature ont montré que l'addition de Cu^{II} sur A β 16, A β 28 et A β 40 (Curtain *et al.* 2001, Hou *et al.* 2006) affecte principalement les résonances des histidines (Syme *et al.*, 2004; Curtain *et al.*, 2001). Elles ont donc été proposées comme ligands. Cependant, aucune indication sur le ligand oxygène, mis en évidence par RPE, n'a été obtenue.

La première étape a été l'attribution des différentes résonances aux acides aminés de la séquence. Comme le montre le tableau 2.2, la plupart des signaux ont été attribués. Ensuite, les titrations avec le cuivre ont été effectuées.

Residu	NH	αH	βH	γH	δH	ϵH	Autres
Asp ₁	*	4,18	2,72 ; 2,86				^{2,6} H : 7,23 ^{3,5} H : 7,30
Ala ₂	*	4,36	1,44				
Glu ₃	8,56	4,25	*	2,20; 2,27			
Phe ₄	*	4,65	v				
Arg ₅	*	4,34	1,71 ; 1,81	1,57			
His ₆	*	4,58	3,12 ; 3,17				² H : 7,89 ⁴ H : 7,08
Asp ₇	8,55	4,72	2,70 ; 2,82				
Ser ₈	*	4,45	3,93 ; 3,98				
Gly ₉	*	3,94 ; 4,02					
Tyr ₁₀	*	4,58	2,99 ; 3,10				^{2,6} H : 7,13 ^{3,5} H : 6,85
Glu ₁₁	8,49	4,28	*	2,27 ; 2,34			
Val ₁₂	8,15	4,03	2,02	0,85; 0,94			
His ₁₃	*	4,65	3,07 ; 3,16				² H : 7,87 ⁴ H : 7,01
His ₁₄	*	4,66	3,07 ; 3,10				² H : 7,85 ⁴ H : 7,00
Gln ₁₅	*	4,33	2,94 ; 2,12	2,39			
Lys ₁₆	7,99	4,23	1,78 ; 1,89	1,46	1,74	3,07	
Leu ₁₇	8,32	4,31	1,52; 1,64 et 1,68		0,91 ; 0,98		
Val ₁₈	8,05	4,10	1,98	0,82 ; 0,90			
Phe ₁₉	*	*	*				7.24 + 7.35
Phe ₂₀	*	*	*				7.24 + 7.35
Ala ₂₁	8,32	4,30	1,44				
Glu ₂₂	8,45	4,28	*	2,23 ; 2,24			
Asp ₂₃	*	4,81	2,84 ; 2,93				
Val ₂₄	8,22	4,22	2,26	1,03			
Gly ₂₅	8,59 ; 8,63	*	4,05				
Ser ₂₆	8,25	4,53	3,95				
Asn ₂₇	7,70 ; 7,01	4,68	*				
Lys ₂₈	*	4,34	1,80 ; 1,88	1,46	1,74	3,04	

 Tableau 2.2. Attribution RMN ¹H pour le peptide A β 28.

 II.3.a RMN ¹H de Cu^{II}- A β 16 à pH = 7.4

Les figures 2.11 et 2.12 montrent l'apo-A β 16 et les additions de 0,05 et 0,2 équivalent de cuivre. Comme on peut le constater toutes les résonances sont affectées mais à des degrés plus ou moins importants. Par ailleurs, contrairement à des dosages avec le Zn^{II}, il n'y a pas de déplacement des résonances (Mekmouche *et al.*, 2005).

Le plus grand élargissement est observé pour les Histidines 6,13 et 14 (étoile verte) et l'Aspartate 1. Alors que l'élargissement sur les signaux des 3 Histidines a déjà été observé, rien de tel n'a été décrit sur aucun autre acide aminé du peptide $\text{A}\beta$.

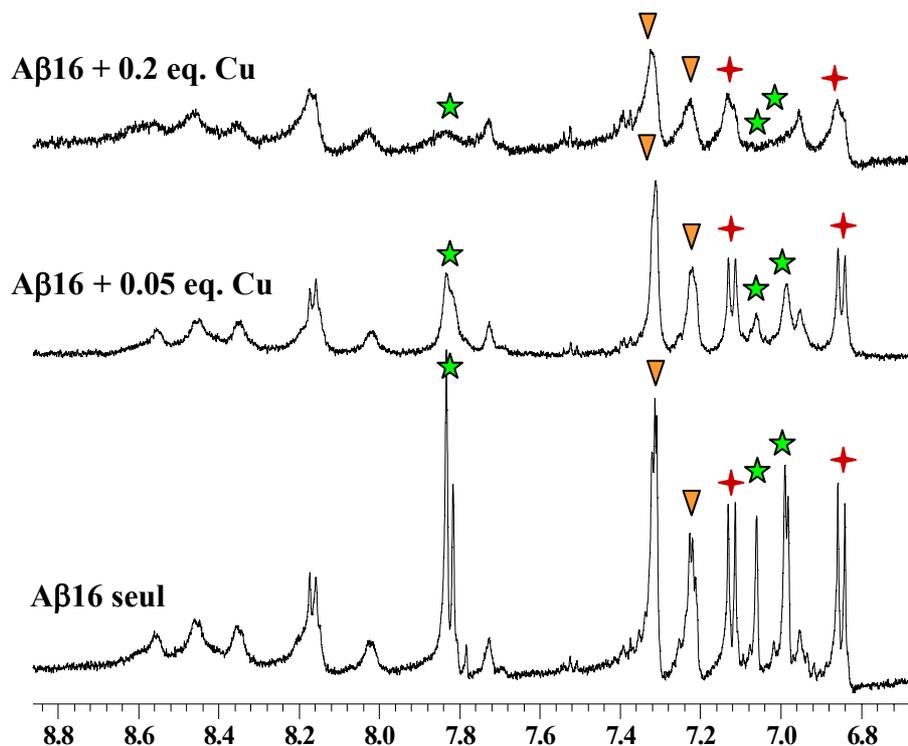


Figure 2.11. RMN ^1H de l'apo- et de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{16}$ à pH 7.4. Les spectres ont été effectués à une concentration de $500 \mu\text{M}$ en peptide $\text{A}\beta_{16}$, dans un tampon $50 \text{ mM Tris-}d_{11}$, pH 7,4, 10% D_2O à $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Les résonances des 3 His 6,13 et 14 (étoile verte) sont affectées par l'addition de Cu^{II} , contrairement à la Phe4 (étoile rouge) ou à la Tyr10 (triangle orange).

L'Ala2, l'Arg5 et la Val12 sont aussi légèrement plus affectées que le reste du peptide. Ces trois acides aminés ne sont pourtant pas des ligands potentiels. Les chaînes latérales de la Val et de l'Ala sont aliphatiques. La chaîne latérale de l'Arg possède une fonction amine mais son pKa est élevé $\sim 12,5$. Elle n'est donc pas considérée comme un ligand potentiel. De plus, à notre connaissance, la chaîne latérale arginine n'a jamais été clairement identifiée comme ligand du métal pour aucune protéine ou peptide. Même s'il est concevable qu'une liaison de l'arginine puisse être imposée par une protéine aussi flexible que le peptide $\text{A}\beta$, cela semble quand même peu vraisemblable. Cependant ces trois acides aminés sont juste à côté des résidus les plus affectés (Asp1, His 6,13 et 14). Ils sont donc assez proches eux aussi du centre métallique. Cela peut expliquer le fait que leurs résonances soient elles aussi un peu plus affectées par l'addition du cuivre que les autres acides aminés de la séquence.

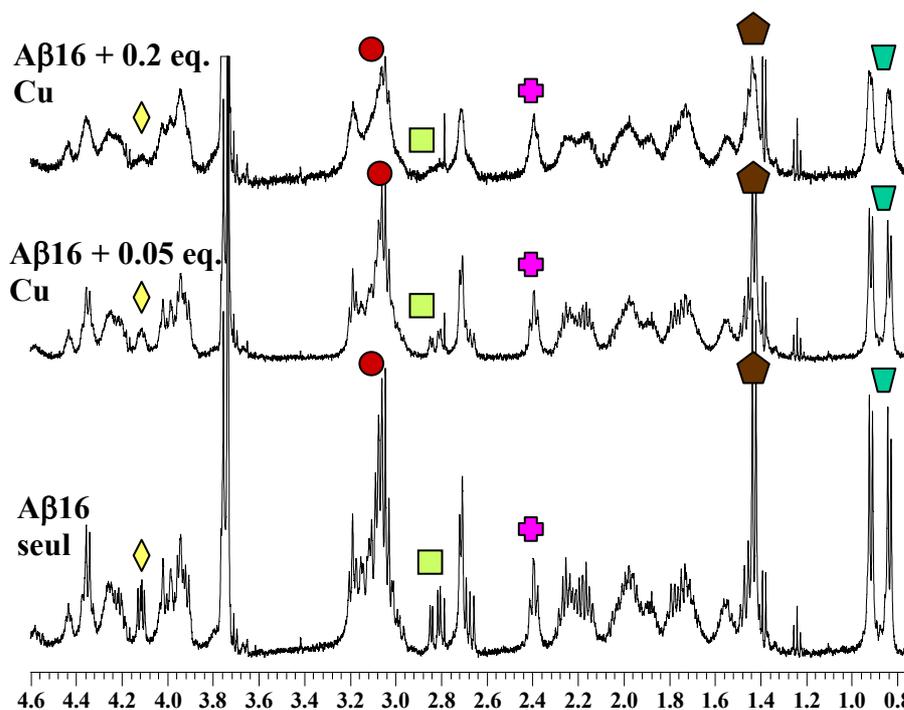


Figure 2.12. RMN ^1H de l'apo- et de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta$ 16 à pH 7,4. Les spectres ont été effectués à une concentration de 500 μM en peptide $\text{A}\beta$ 16, dans un tampon 50 mM Tris- d_{11} , pH 7,4, 10% D_2O à 20 °C. Les résonances des 3 His6,13 et 14 sont marquées avec un rond rouge et un carré vert, l'Asp1 avec un losange jaune, la Val12 avec un trapèze turquoise, la Tyr10 avec un triangle orange et l'Ala2 par un pentagone marron. Les résonances de l'Asp1 (losange jaune) sont très affectées par l'addition du Cu^{II} .

La Tyr10, qui a été évoquée comme ligand potentiel (Curtain *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2000) pour le métal est relativement épargnée par l'addition du cuivre. Elle ne semble donc pas être directement impliquée dans la coordination du cuivre.

Les 4 acides aminés qui semblent être les ligands sont donc l'Asp1 et les 3 His. Comme nous l'avons vu précédemment, la RPE à pH 7,4 a montré que le Cu est lié dans une géométrie plane carrée avec une coordination mixte (3N/1O et 4N).

Pour la forme minoritaire 4N, les 3 His et le N-terme de l'Asp1 sont les ligands. Des preuves de la liaison du N-terme ont été reportées. (Syme *et al.*, 2004 ; Kowalik-Jankowska *et al.*, 2003). La liaison du N-terme pourrait donc expliquer à elle seule l'influence de l'addition du Cu^{II} sur la résonance de l'Asp1.

Pour la forme majoritaire 3N/1O, le ligand oxygène pourrait être la fonction carboxylate de la chaîne latérale de l'Asp1.

Pour s'affranchir de l'existence d'un mélange hétérogène de complexes à pH 7,4, les expériences ont également été réalisées à pH 6,5 où seul le complexe avec une coordination 3N/1O était observé en RPE. Ainsi, il a été possible d'obtenir des informations sur le ligand oxygène.

II.3.b RMN ¹H de Cu^{II}- Aβ16 à pH = 6,5

D'une manière générale, les résonances sont légèrement moins affectées et les différences moins marquées qu'à pH 7,4. Les acides aminés les plus affectés par l'addition de Cu^{II} sont les mêmes qu'à pH 7,4 c'est-à-dire les 3 His et l'Asp1. Cela implique que l'Asp1 est aussi un ligand du métal à pH 6,5. Les 3 His contribuent à la liaison par un atome d'azote chacune. Le ligand oxygène peut donc venir de l'Asp1 et de sa fonction carboxylique. L'idée de l'importance de l'Asp1 pour la fixation du cuivre est renforcée par les expériences de Karr *et al.* qui ont montré en RPE qu'en l'absence des 3 premiers acides aminés, alors il n'y plus de la liaison d'un oxygène avec le Cu^{II}.

Cela signifie que la différence entre la forme majoritaire à haut pH 4N et la forme majoritaire 3N/1O à bas pH est juste un changement entre la fonction amine N-terminale et le groupement carboxylate de la chaîne latérale de l'Asp1.

II.3.c RMN ¹H de Cu^{II}- Aβ28 à pH = 7,4

L'addition progressive de Cu^{II} sur une solution de Aβ28 permet d'obtenir les spectres représentés par les figures 2.13 et 2.14. On peut répartir les acides aminés en 4 classes en fonction de l'élargissement de leur résonances.

- (i) Les acides aminés les plus affectés sont les 3 His 6,13 et 14 et l'Asp1 en accord avec le fait qu'ils sont des ligands du cuivre.
- (ii) L'Ala2, l'Arg5 et la Val12 sont également touchés mais à un degré inférieur. Comme nous l'avons vu précédemment, cela est du à leur proximité avec le centre Cu^{II}.
- (iii) Les 16 premiers acides aminés sont légèrement influencés par la présence de cuivre. Ceci est en accord avec le fait que la portion 1-16 du peptide possède le site de fixation.
- (iv) Les résidus 17 à 28 sont très peu affectés par les ajouts de cuivre. La région 17-28 est bien séparée du centre métallique.

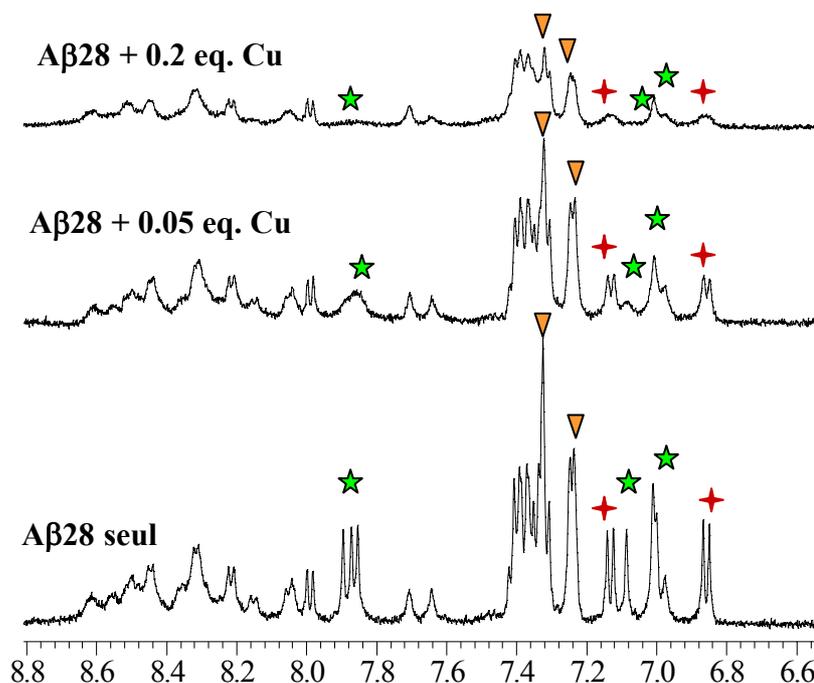


Figure 2.13. RMN ^1H de l'apo- et de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta 28$ à pH 7,4. Les spectres ont été enregistrés à une concentration de 500 μM en peptide $\text{A}\beta 28$, dans un tampon 50 mM Tris- d_{11} , pH 7,4, 10% D_2O à 20 °C. Les résonances des 3 His6,13 et 14 sont marquées avec une étoile verte, la Phe4 avec une étoile rouge et la Tyr10 avec un triangle orange. Les résonances de la Tyr10 sont relativement peu affectées par l'addition de Cu^{II} contrairement aux 3 His.

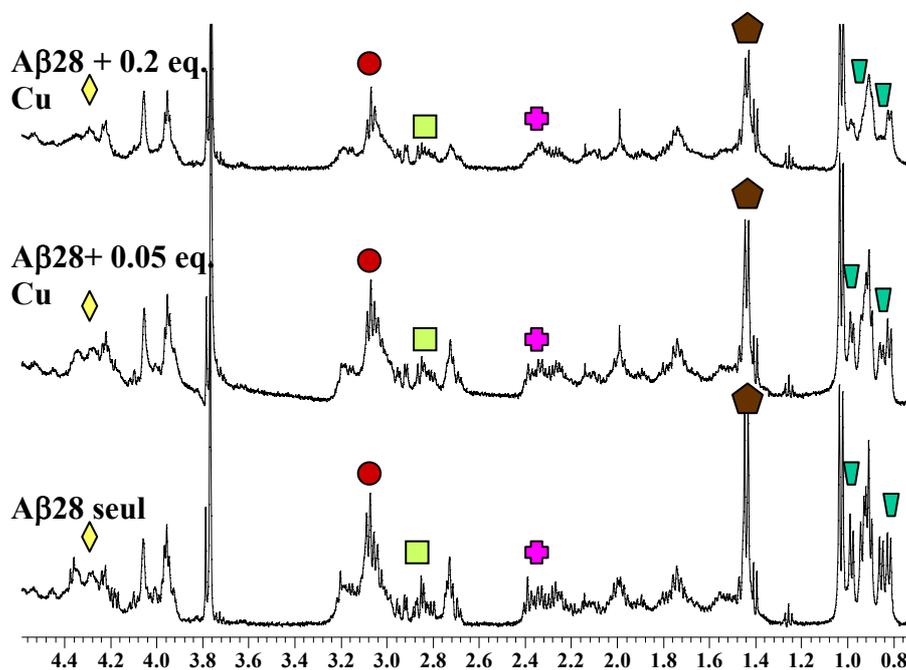


Figure 2.14. RMN ^1H de l'apo- et de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta 28$ à pH 7,4. Les spectres ont été réalisés à une concentration de 500 μM en peptide $\text{A}\beta 28$, dans un tampon 50 mM Tris- d_{11} , pH 7,4, 10% D_2O à 20 °C. Les résonances des 3 His6,13 et 14 sont marquées avec un rond rouge et un carré vert, l'As 1 avec un losange jaune, la Val12 avec un trapèze turquoise, l'Ala2 avec un pentagone marron. Les résonances de l'Asp1 sont très affectées par l'addition de Cu^{II} .

Ces expériences suggèrent une grande similarité de l'effet du cuivre sur $\text{A}\beta_{16}$ et $\text{A}\beta_{28}$, soulignant que l' $\text{A}\beta_{16}$ est un bon modèle pour étudier la liaison $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta$. Cependant, il y a aussi quelques différences mineures. Les 16 premiers acides aminés sont plus affectés dans le peptide $\text{A}\beta_{28}$ et $\text{A}\beta_{40}$ que dans l' $\text{A}\beta_{16}$. Cela peut être dû à une plus grande structuration autour du site de fixation et/ou un site moins dynamique.

L'addition substoechiométrique de Cu^{II} sur l' $\text{A}\beta_{16}$ et l' $\text{A}\beta_{28}$ affecte tous les signaux. De plus, l'addition de 0,2 équivalent annihile totalement le signal des histidines alors qu'en théorie l'intensité ne devrait diminuer que de 20% (sur l'échelle RMN) s'il y avait une liaison fixe. Il y a donc un échange rapide du cuivre entre les peptides. En raison de cet échange, on ne peut pas conclure si les 3 His et l'Asp1 sont affectés par une liaison simultanée ou par une liaison transitoire au métal. En effet, une collision avec les His individuellement et tour à tour donnerait un résultat similaire. Cependant, comme avec l' $\text{A}\beta_{16}$, ce résultat concorde avec la forme majoritaire 3N/1O déduite des expériences RPE, effectuées en solution gelée à 100K, où il n'y a pas d'échange du cuivre entre les peptides. La coordination qui explique le mieux l'ensemble de ces résultats est une liaison du cuivre par les 3 His et par l'Asp1, par sa fonction carboxylique et par le N-terme.

Ces résultats nous ont amené à proposer le modèle de fixation de la figure 2.15

La fonction carboxylate COO^- et le N-terme pourraient d'ailleurs s'échanger rapidement. Cet échange ne serait pas visible en RPE, les mesures étant effectuées à des températures trop basses pour qu'il s'opère. Les données RPE indiquent clairement 2 coordinations distinctes pour le site de forte affinité pour le cuivre, 3N/1O (3His/ COO^- de l'Asp1) et 4N (3His/N-terme).

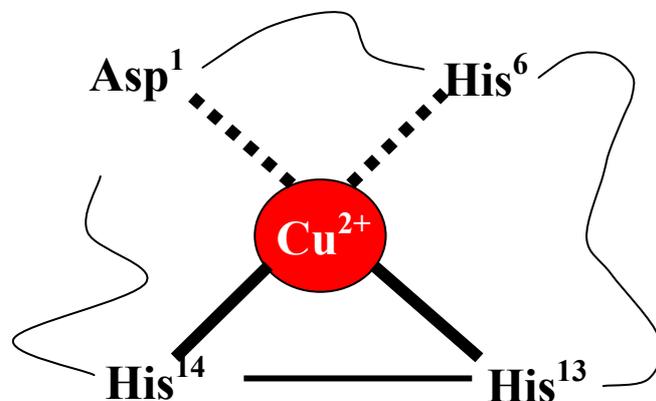


Figure 2.15. Schéma proposé de la fixation du cuivre sur le site de plus grande affinité.

Les analyses présentées ont permis d'étudier l'effet paramagnétique de 0,05 à 0,2 équivalents de Cu^{II}. Des conclusions similaires peuvent être émises pour 0,5 équivalents. Après 0,5 équivalent, l'addition de Cu^{II} élargit tellement l'ensemble des résonances, qu'aucune conclusion directe ne peut être émise. Cependant, la titration (0,25 équivalent par 0,25 équivalent de Cu^{II}) de l'Aβ16/28 suivie en RPE et en spectroscopie UV/Vis n'indique pas de changement du site de fixation entre 0,05 et 1 équivalent. Le mode de fixation est donc probablement le même entre 0,05 et 1 équivalent.

L'élargissement des résonances avec 1 équivalent de Cu^{II} pose cependant un problème. Il ne sera pas possible d'étudier les effets de l'addition d'un second équivalent de cuivre. Il faut donc trouver une autre méthode pour essayer de caractériser le complexe Cu^{II}₂-Aβ28. Une alternative possible est l'utilisation du Ni^{II} (paragraphe II.3.e).

II.3.d RMN 2D de Cu^{II}- Aβ28/40

L'implication de l'Asp1 comme ligand dans les peptides Aβ28 et Aβ40 devrait être confirmé. Les résonances en RMN ¹H de l'Asp1 pour l'Aβ28 et Aβ40 sortent dans un massif et il n'est pas aisé de voir facilement l'effet des ajouts du cuivre sur cet acide aminé en particulier. Des expériences en RMN 2D ont donc été réalisées de manière à augmenter la résolution. Des spectres RMN 2D ont été obtenues sur des solutions de Aβ28 et Aβ40 à pH 6,5, pour qu'il n'y est qu'un complexe homogène de coordination 3N/1O.

La figure 2.16 montre clairement que l'Asp1 est l'un des acides aminés les plus affectés avec les 3 His par l'addition de Cu^{II}, suggérant ainsi que c'est sans doute le quatrième ligand oxygène recherché.

La RMN 2D confirme également que les acides aminés voisins de ceux invoqués comme ligands sont plus affectés que les autres. En effet, l'ajout de cuivre diminue assez fortement l'intensité des pics attribués à l'Asp2, l'Arg5 et Val12.

Enfin, les expériences en RMN 2D sont assez similaires pour les peptides Aβ28 et Aβ 40. Il a été observé que les résidus 17 à 28 (pour l'Aβ28), ou 17 à 40 (pour l'Aβ40) sont moins affectés que les 16 premiers acides aminés. Cela confirme que le site de fixation du cuivre se situe bien dans la première partie du peptide. Par ailleurs, cet effet

est encore plus marqué avec le peptide le plus long. Cela indique que le complexe est plus structuré ou que le site est moins dynamique.

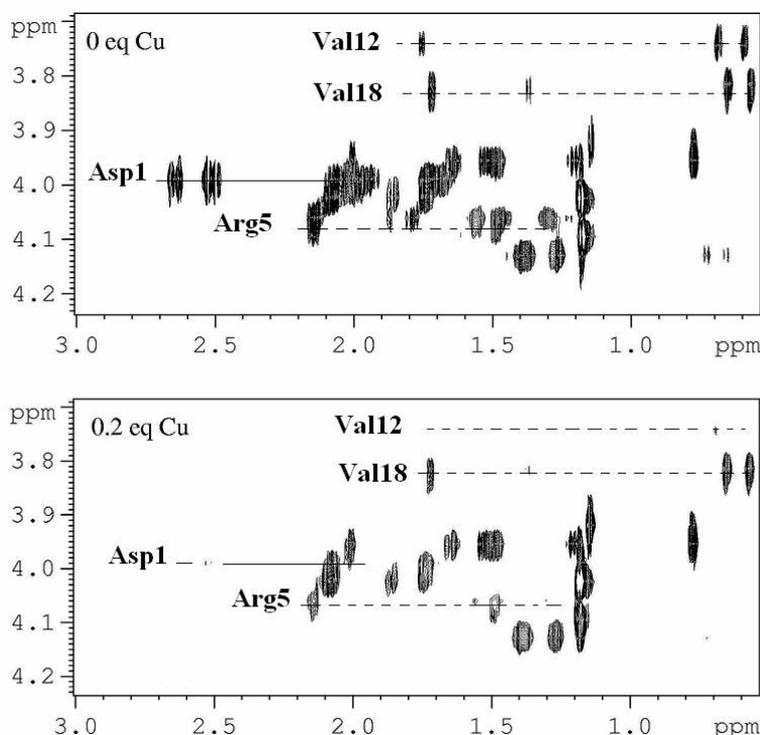


Figure 2.16. RMN 2D de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{28}$. Les spectres ont été réalisés à une concentration de 500 μM en peptide $\text{A}\beta_{28}$, dans un tampon 50 mM Tris- d_{11} , pH 7,4, 10% D_2O à 20 °C. Les résonances de l'Asp1 disparaissent après l'ajout de 0,2 équivalent de cuivre. Les résonances des acides aminés voisins des ligands sont aussi touchées (Arg5, Val12). La région 17-40 est très peu affectée par l'addition du cuivre.

II.3.e RMN ^1H de $\text{Ni}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{16}$

L'effet paramagnétique du cuivre permet uniquement l'étude du premier site de fixation. Pour obtenir des informations sur le second site, des essais ont été réalisés en utilisant le Ni^{II} . Le Ni^{II} a déjà été utilisé dans certains cas pour mimer le Cu^{II} dans des sites de fixation plans carrés. C'est le cas avec l'albumine de sérum humain (Sadler *et al.*, 1994) et pour le site de fixation du cuivre sur la protéine du prion autour des His96 et His111 (Jones *et al.*, 2005). Ni^{II} , dans un environnement plan carré, est normalement bas spin et donc diamagnétique. Les résonances des acides aminés en RNM ne devraient donc pas être élargies par l'addition de quantités substoechiométriques, comme nous l'avons observé avec le Cu^{II} . Cependant, la fixation du Ni^{II} au peptide devrait déplacer les résonances des ligands. Ainsi l'identification du second site de fixation devrait être réalisable.

Les spectres RMN ¹H de l'Aβ16 avec des ajouts croissants de Ni^{II} ont été enregistrés. Malheureusement, toutes les résonances sont élargies et il n'a pas été observé de déplacement des résonances. Il n'y a donc aucune preuve de la formation d'un complexe Ni^{II}-Aβ16 bas spin, diamagnétique, plan carré. Cela suggère la formation d'un complexe haut spin, paramagnétique, tétraédrique ou octaédrique. Ces observations sont en accord avec l'absence de bande d'absorption d-d autour de 450 nm, caractéristique des complexes de Ni^{II} plans carrés. Un comportement similaire a été récemment décrit dans la littérature, où le Ni^{II} a été utilisé pour caractériser la liaison du cuivre avec l'octapeptide de la protéine du prion (Garnett *et al.*, 2006).

II.3.f Exclusion de la Tyrosine

La Tyr10 a été évoquée comme jouant un rôle important dans la chimie et la biologie de Aβ. En particulier, elle a été proposée comme ligand pour Cu^{II}, et Zn^{II}, mais aussi comme impliquée dans les réactions radicalaires (de Cu^{II}-Aβ), en formant des dityrosines (Miura *et al.*, 2000 ; Barnham *et al.*, 2004) .

Pour étudier son rôle dans la complexation du Cu^{II}, l'absorption de la Tyr10 en fonction du pH a été mesurée en présence ou non de Cu^{II} (figure 2.17). A pH physiologique, l'addition de Cu^{II} (jusqu'à 4 équivalents) n'influence pas de manière significative le spectre d'absorption de la tyrosine. Il faut noter que la Tyr10 est la seule tyrosine de la séquence et qu'aucun tryptophane n'est présent, l'absorption aux environs de 250 nm est donc exclusivement due à la chaîne latérale phénolique de la Tyr10. Si la Tyr10 était un ligand du Cu^{II}, des transitions de transfert de charge du tyrosinate au Cu^{II} autour de 400 nm sont attendus (Jazdzewski *et al.*, 2001), mais rien de tel n'a été observé avec Aβ16/28 (Kowalik-Jankowska *et al.*, 2003). En augmentant le pH, le maximum d'absorption de la tyrosine passe de 275 nm à 290 nm. Ce comportement est typique des tyrosinates (non liés au Cu). Cela indique que la Tyr10 ne forme pas de tyrosinate lié au Cu^{II}. Cependant, il reste la possibilité que la Tyr10 coordine le Cu^{II} (au moins faiblement) sans perdre ses protons phénoliques. Pour le vérifier, nous avons mesuré si la liaison du Cu à l'Aβ16 a une influence sur l'acidité du proton phénolique de la Tyr10. Un proton plus acide est attendu dans le cas d'une liaison Cu-oxygène. Nous avons donc mesuré la pH-dépendance de l'absorption du peptide Aβ16. En se basant sur les spectres de la tyrosine complètement protonée et complètement déprotonée (figure 2.17), le pKa a été déterminé. Le pKa de la Tyr10 dans l'apo-Aβ16 est environ 11,3. Il faut noter que ce pKa

est relativement haut pour une tyrosine. Des mesures potentiométriques de $\text{A}\beta_{16/28}$ avaient reporté des pK_a plus faibles de l'ordre de 9.76-9.96 (Kowalik-Jankowska *et al.*, 2003). L'origine de cette différence dans la détermination du pK_a n'est pas élucidée. Cependant, notre méthode a l'avantage de bien séparer les formes protonées et déprotonées de la tyrosine.

En présence de Cu (de 1 à 4 équivalents), le pK_a apparent ne change pas significativement (figure 2.17). La Tyr10 ne lie pas le Cu^{II} dans le site de forte affinité. Cela est en accord avec ce qui a été observé en RMN ^1H . La même observation pour le Cu^{II} dans le site de fixation de plus faible affinité peut être faite, c'est-à-dire que la Tyr10 n'est pas un ligand. De plus, la fixation d'un ou deux équivalents de Cu^{II} n'influence pas le pK_a de la Tyr10. Il n'y a aucun changement structural.

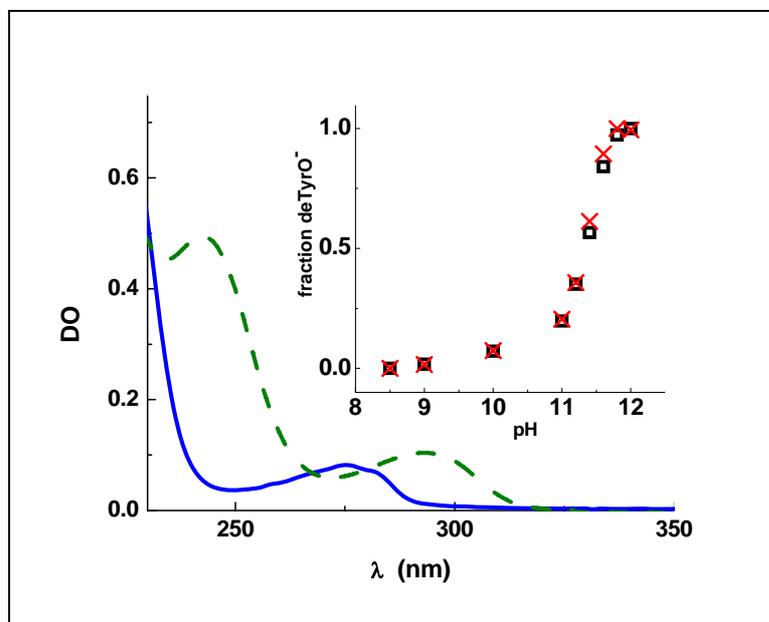


Figure 2.17. pK_a de la Tyr10 dans l'apo- $\text{A}\beta_{16}$ et pour le $\text{A}\beta_{16}$ lié au cuivre. Le spectre d'absorption de $\text{A}\beta_{16}$ ($60 \mu\text{M}$) à pH 7,4 avec la Tyr10 sous forme tyrosine (ligne bleue) et à pH 12 avec la Tyr10 sous forme de tyrosinate (pointillés verts). En haut, dépendance en pH de l'état de protonation du proton phénolique de Tyr10 en l'absence (carré) et en présence de 1 équivalent de Cu^{II} (croix) estimée sur l'absorption du tyrosinate à 290 nm.

III. Ligand labile

Les expériences RPE ont révélé que les complexes $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta$ étaient des complexes plans carrés légèrement déformés. Cependant la RPE est peu sensible à la détection d'un ligand en position axiale. Nous nous sommes donc intéressés à la présence éventuelle d'un tel ligand. La présence en position axiale d'un ligand labile (molécule d' H_2O par

exemple) ou d'un site vacant peut être particulièrement intéressant pour un mécanisme catalytique.

III.1 Le site de forte affinité

Une méthode pour déterminer la présence d'un ligand labile ou d'un site vacant sur un complexe de cuivre est de faire une substitution de celui-ci par l'azoture de sodium NaN_3 . La liaison de l'azoture au cuivre (liaison $\text{N}_3\text{-Cu}$) possède une bande d'absorption caractéristique visible en spectroscopie UV-Vis à 373 nm ($\epsilon \sim 2700 \text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$). (Fee et Gaber, 1972)

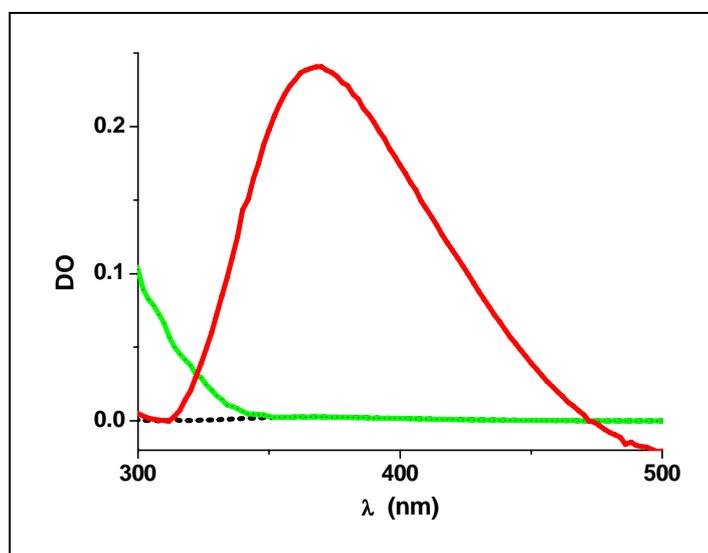


Figure 2.18. Spectre d'absorption du complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta 16$ en présence d'azoture de sodium. La courbe noire représente le spectre d'absorption de la solution d'azoture de sodium seule. En présence de cuivre, il y a formation de la liaison $\text{N}_3\text{-Cu}$. Le spectre (courbe rouge) possède une bande caractéristique de cette liaison à 373 nm. Lors de l'ajout de la solution d'azide sur une solution de complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta 16$ (courbe verte), cette bande n'apparaît pas

La figure 2.18 montre les spectres obtenus lors des ajouts de solution d'azoture de sodium, en large excès (200 équivalents par rapport au cuivre), sur des solutions de cuivre seul et de complexe de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta 16$. Lorsque la solution de NaN_3 est additionnée sur une solution de cuivre, une bande apparaît à 373 nm. C'est la bande caractéristique de la liaison Cu-N_3 . L'ajout de NaN_3 sur la solution de complexe donne la courbe verte. Aucune bande d'absorption n'est observable à 373 nm. Le spectre obtenu est en fait superposable à l'addition des spectres du complexe seul (courbe non montrée sur la figure) et de l'azide seul (courbe noire). Il n'y a donc pas de fixation de l'ion N_3^- sur le

cuivre du complexe. Par conséquent, le complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{16}$ ne possède pas de site vacant ou de ligand labile.

Le même résultat a été observé pour l'ensemble des peptides, c'est-à-dire que les complexes $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{16}$, $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{28}$, $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{40}$ et $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{42}$ ne possède ni site vacant ni ligand labile.

III.2 Le site de faible affinité

Nous avons réalisé le même type d'expérience sur le second site de fixation du cuivre (site de faible affinité). Des ajouts d'azoture de sodium (toujours en large excès) ont été effectués sur les solutions de $\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-A}\beta$. Cette fois ci les résultats observés diffèrent selon les complexes étudiés.

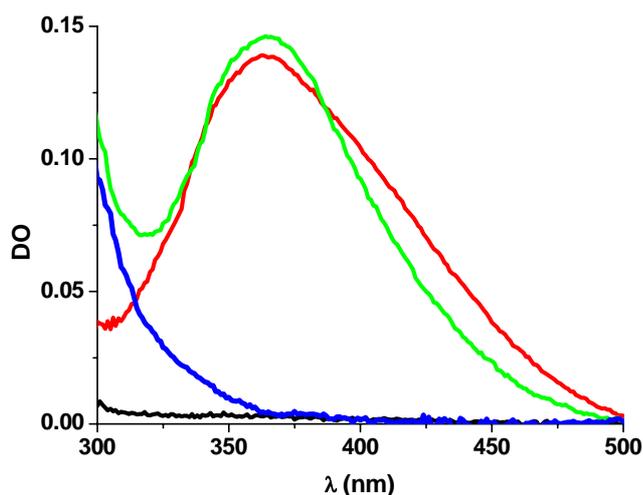


Figure 2.19. Spectre d'absorption du complexe $\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-A}\beta_{28}$ en présence d'azoture de sodium. La courbe noire représente le spectre d'absorption de la solution d'azoture de sodium seule. Lorsqu'il y a formation d'une liaison $\text{N}_3\text{-Cu}$, on observe un spectre du type de la courbe rouge avec une bande d'absorption caractéristique à 373 nm. Lors de l'ajout de la solution d'azide sur une solution de complexe $\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-A}\beta_{28}$ (courbe verte), cette bande apparaît. La courbe bleue représente le spectre du peptide $\text{A}\beta_{28}$ seul.

Dans le cas de $\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-A}\beta_{16}$, l'ajout de NaN_3 n'a eu aucun effet. Aucune bande n'apparaît à 373 nm. Comme pour le site fort, il n'y a donc pas de ligand labile sur le complexe. Par contre dans les cas de $\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-A}\beta_{28}$, $\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-A}\beta_{40}$, $\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-A}\beta_{42}$, l'ajout de NaN_3 se traduit sur les spectres par une bande d'absorption à 373 nm, comme le montre la figure 2.19. Le spectre de l'addition d'une solution de NaN_3 sur le complexe $\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-A}\beta_{28}$ (courbe verte) correspond à l'addition du spectre obtenu par l'addition de NaN_3 sur

une solution de cuivre seul (courbe rouge) et de celui d'une solution de peptide seul (courbe bleue). L'intensité de la bande correspond à une concentration en cuivre de 10 μM, soit un seul équivalent de cuivre lié. En supposant que le premier site de fixation n'est pas modifié par l'ajout du second équivalent de cuivre, la substitution du ligand labile a donc lieu uniquement sur le second site de fixation du cuivre.

Les complexes Cu^{II}₂-Aβ28 Cu^{II}₂-Aβ40 et Cu^{II}₂-Aβ42 possèdent donc soit un site vacant soit un ligand labile. Ce ligand pourrait d'ailleurs être une molécule d'eau. Ce qui correspondrait avec la différence d'enthalpie observée en ITC pour le second site, ΔS2. (chapitre II.1)

IV. Conclusion

Ce premier chapitre a permis de caractériser l'interaction entre le cuivre et le peptide amyloïde d'un point de vue thermodynamique et structural.

Les peptides, sous forme soluble, possèdent 2 de site de fixation pour le cuivre caractérisés par des constantes de dissociations apparentes à pH 7,4 respectivement de 100 nM et 10 μM environ. Les peptides amyloïdes seraient donc capables de lier le cuivre in vivo dans le domaine extracellulaire. La stratégie de chélation de ces ions métalliques semble donc être un axe de recherche intéressant : des espèces perturbant les interactions entre Aβ et les métaux (redox-actifs notamment) seraient susceptibles d'empêcher les phénomènes engendrant de la neurotoxicité.

Par ailleurs, la coordination du site de fixation a été établie pour le site de forte affinité. A pH 7,4 le complexe est hétérogène avec une forme majoritaire impliquant les 3 His en position 6,13 et 14 et la partie COO⁻ de l'Asp1. La forme minoritaire fait intervenir les mêmes acides aminés mais diffère seulement par la région de l'Asp1 liant le métal : N-terme.

Pour confirmer les ligands proposés, l'idéal serait de cristalliser le complexe ce qui n'a encore jamais été réalisé. Malgré cela, il se pourrait que seule la forme minoritaire cristallise, prouvant seulement l'existence de celle-ci.

Peu d'informations ont été obtenues sur ce second site, difficilement caractérisable. La coordination est hétérogène là aussi. Elle diffère selon les peptides impliqués. Le second site possède un site libre ou un ligand labile.

Ainsi les modèles suivants ont été proposés :

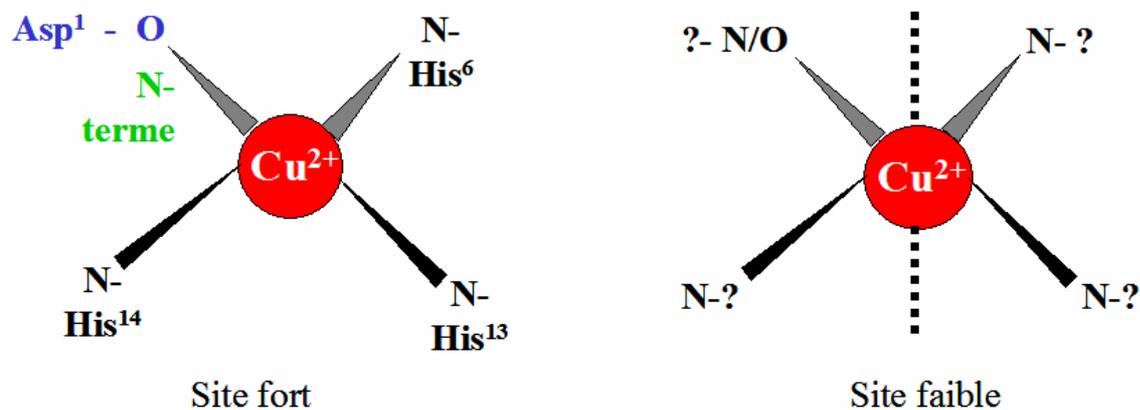


Figure 2.20. Modèles de fixation proposés pour les sites de fixation du Cu^{II} sur l' $\text{A}\beta$. Le premier site de fixation est hétérogène à pH 7,4. La forme majoritaire figure en bleu alors que la forme minoritaire est en vert. La coordination du second site de fixation n'a pu être établie mais il possède un ligand labile ou un site vacant en position axiale.

Globalement, les peptides $\text{A}\beta_{16,28,40}$ et 42 ont des caractéristiques assez proches. Même si quelques petites différences sont apparues, la majorité des conclusions présentées précédemment sont communes pour le premier site de fixation.

Les différences qui sont apparues entre $\text{A}\beta_{16}$ et $\text{A}\beta_{28/40/42}$ sont sur le deuxième site de fixation du cuivre. Celui-ci est différent. Les acides aminés 17 à 28 seraient donc impliqués dans ce second site de fixation pour $\text{A}\beta_{28/40/42}$.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Biological Inorganic Chemistry* qui figure en annexe à la fin du manuscrit.

La caractérisation structurale est la base pour la compréhension de la réactivité de ces complexes. Or, un point essentiel dans la compréhension du mécanisme de la maladie est de savoir comment les complexes pourraient être impliqués dans la toxicité. La principale hypothèse serait via la génération d'espèces réactives de l'oxygène qui sont toxiques pour un grand nombre d'espèces biologiques (lipides, protéines, ADN). C'est le thème abordé dans le second chapitre.

V. Bibliographie

- Atwood, C.S., Scarpa, R.C., Huang, X., Moir, R.D., Jones, W.D., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (2000) Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid β peptides: Identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid β 1-42. *J. Neurochem.* **75**: 1219-1233.
- Barnham, K.J., Haeffner, F., Ciccotosto, G.D., Curtain, C.C., Tew, D., Mavros, C., Beyreuther, K., Carrington, D., Masters, C.L., Cherny, R.A., Cappai, R., and Bush, A.I. (2004) Tyrosine gated electron transfert is key to the toxic mechanism of Alzheimer's disease β -amyloid. *FASEB J.* **18**: 1427-1429.
- Beauchemin, D., and Kisilevsky, R. (1998) A method based on ICP-MS for the analysis of Alzheimer's amyloid plaques. *Anal. Chem.* **70**: 1026-1029.
- Blasie, C.A., Berg, J.M. (2003) Kinetics and Thermodynamics of Copper(II) Binding to Apozurin. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 6866-6867.
- Curtain, C.C., Ali, F., Volitakis, I., Cherny, R.A., Norton, R.S., Beyreuther, K., Barrow, C.J., Masters, C.L., Bush, A.I., and Barnham, K.J. (2001) Alzheimer's disease amyloid- β binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *J. Biol. Chem.* **276**: 20466-20473.
- Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliott, W.H., and Jones, K.M. (1986) *Data for Biochemical Reaserch*, Claredon Press
- Fee, J.A., and Gaber, B.P. (1972)_Anion Binding to Bovine Erythrocyte Superoxide Dismutase. Evidence for multiple binding sites with qualitatively different properties. *J. Biol Chem* **247**: 60-65.
- Florence, T.M., and Batley, G.E. (1977) Determination of the chemical forms of trace metals in natural waters. *Talanta* **24**: 151-158.
- Garnet, A.P., Jones, C.E., and Viles, J.H. (2006) A survery of diamagnetic probes for copper(2+) binding to the prion protein. 1H NMR solution structure of the palladium(2+) bound single octarepeat. *Dalton Transactions* 509-518.
- Garzon-Rodriguez, W., Yatsimirsky, A.K., and Glabe, C.G. (1999) Binding of Zn(II), Cu(II), and Fe(III) ions to Alzheimer's A β peptide studied by fluorecence. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**: 2243-2248.
- Hou, L., and Zagorski, M.G. (2006) NMR Reveals Anomalous Copper(II) Binding to the Amyloid A β Peptide of Alzheimer's Disease. *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 9260-9261.
- Huang, X., Atwood, C.S., Moir, R.D., Hartshorn, M.A., Vonsattel, J.-P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1997) Zinc-induced Alzheimer's A β 1-40 aggregation is mediated by conformational factors. *J. Biol. Chem.* **272**: 26464-26470.
- Jazdzewski, B.A., Holland, P.L., Pink, M., Young, V.G.Jr, Spencer, D.J., Tolman, W.B. (2001) Three-Coordinate Copper(II)-Phenolate Complexes. *Inorg. Chem.* **40**: 6097-6107.
- Jelesarov, I., and Bosshard, H.R. (1999) Isothermal titration calorimerty and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recogn.* **12**: 13-18.

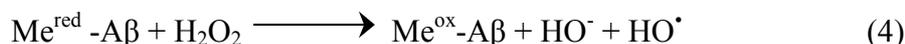
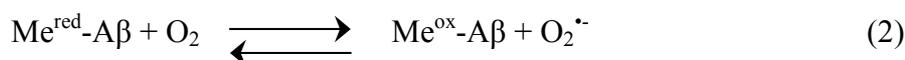
- Jones, C.E., Klewpatinond, M., Abdelraheim, S.R., Brown, D.R. and Viles, J.H. (2005) Probing copper(2+) binding to the prion protein-using diamagnetic nickel(2+) and ¹H NMR: The unstructured N terminus facilitates the coordination of six copper(2+) ions at physiological concentrations. *J. Mol. Biol.* **346**: 1393-1407.
- Karr, J.W., Kaupp, L.J., Szalai, V.A. (2004) Amyloid- β Binds Cu²⁺ in a Mononuclear Metal Ion Binding Site *J. Am. Chem. Soc.* **126**:13534-13538
- Karr, J.W., Akintoye, H., Kaupp, L.J., and Szalai, V.A. (2005) N-terminal deletions modify the Cu²⁺ binding site in amyloid- β . *Biochemistry* **44**: 5478-5487.
- Kowalik-Jankowska T, Ruta M, Wisniewska K, Lankiewicz L (2004) Products of Cu(II)-catalyzed oxidation in the presence of hydrogen peroxide of the 1–10, 1–16 fragments of human and mouse β -amyloid peptide. *J. Inorg. Biochem.* **98** : 940-950.
- Kowalik-Jankowska T, Ruta M, Wisniewska K, Lankiewicz L (2003) Coordination abilities of the 1–16 and 1–28 fragments of β -amyloid peptide towards copper(II) ions: a combined potentiometric and spectroscopic study *J. Inorg. Biochem.* **95** : 270-282.
- Leavitt, S., and Freire, E. (2001) Direct measurement of protein energetics by isothermal titration calorimetry. *Curent. Opin. Struct. Biol.* **11**: 560-566.
- Lovell, M.A, Robertson J.D., Teesdale, W.J., Campbell J.L., and Markesbery, W.R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* **158**: 47-52
- Martell A.E., Smith, R.M., and Motekaitis, R.J. (2004), Database 46: NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, version 8.0 For Windows
- Mekmouche, Y., Coppel, Y., Hochgräfen, K., Guilloreau, L., Talmard, C., Mazarguil, H., and Faller, P. (2005) Characterization of the Zn^{II} binding to the peptide Amyloid- β ¹⁻¹⁶ linked to Alzheimer's disease. *ChemBioChem* **6**: 1663-1671.
- Miura, T., Suzuki, K., Kohata, N., and Takeuchi, H. (2000) Metal binding modes of Alzheimer's amyloid β -peptide in insoluble aggregates and soluble complexes. *Biochemistry* **39**: 7024-7031.
- Peisach, J., and Blumberg, W.E. (1974) Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **165**: 691–708.
- Schoneich, C., and Williams, T.D. (2002) Cu(II)-Catalyzed Oxidation of β -Amyloid Peptide Targets His¹³ and His¹⁴ over His⁶: Detection of 2-Oxo-histidine by HPLC-MS/MS *Chem. Res. Toxicol.* **15**: 717-722.
- Sadler, P.J., Tucker, A., and Viles, J.H. (1994) Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni²⁺ and Cu²⁺ binding site of serum albumins. Comparison with Co²⁺, Cd²⁺ and Al³⁺. *Eur. J. Biochem.* **220**: 193-200.
- Sigel, H. and Bruce Martin, RR. (1982) Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands. *Chem. Rev.*, **82**: 385-426.
- Syme, C.D., Nadal, R.C., Rigby, S.E.J., and Viles, J.H. (2004) Copper binding to the amyloid- β (A β) peptide associated with Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **279**: 18169-18177.

- Syme, C.D., and Viles, J.H. (2006) Solution ¹H NMR investigation of Zn²⁺ and Cd²⁺ binding to amyloid-beta peptide (A β) of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**: 246-256.
- Tickler, A.K., Smith, D.G., Ciccotosto, G.D., Tew, D.J., Curtain, C.C., Carrington, D., Masters, C.L., Bush, A.I., Cherny, R.A., Cappai, R., Wade, J.D., Barnham, K.J. (2005) Methylation of the Imidazole Side Chains of the Alzheimer Disease Amyloid- β Peptide Results in Abolition of Superoxide Dismutase-like Structures and Inhibition of Neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **280**: 13355-13363.
- Tycko, R. (2003) Insights into the Amyloid Folding Problem from Solid-State NMR. *Biochemistry*. **42**: 3151-3159.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., and Lin L.-N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**: 131-137.
- Zhang, Y., and Wilcox, D.E. (2002) Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **7** : 327-337.
- Zirah, S., Kozin, S.A., Mazur, A.K., Blond, A., Cheminant, M., Segalas-Milazzo, I., Debey, P., and Rebuffat, S. (2006) Structural Changes of Region 1–16 of the Alzheimer Disease Amyloid -Peptide upon Zinc Binding and *in Vitro* Aging. *J. Biol. Chem.* **281**:2151-2161.

**Génération de radicaux hydroxyles
par les complexes Cu^{II} -A β**

La concentration du cuivre dans les plaques amyloïdes est très importante (~ 0.4 mM) (chapitre 1). Nous venons de voir dans le chapitre 2 que l'Aβ était capable de fixer 2 équivalents de Cu^{II} avec des constantes apparentes de dissociation K_d de ~ 0.1 μM et 10 μM. De plus, la plupart des études ont prouvé que le cuivre augmentait la toxicité de l'Aβ sur des cultures cellulaires de neurones (Huang *et al.*, 1999). Il joue donc un rôle clé dans la maladie. Cependant, le mécanisme précis de la toxicité qui conduit à la mort des neurones dans les cerveaux des patients d'Alzheimer n'est toujours pas élucidé. De plus en plus de preuves semblent néanmoins indiquer que la mort neuronale pourrait être liée à un excès de production de radicaux libres (Bush, 2003). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS), tels que HO•, O₂^{•-} générées sous des conditions de stress oxydant peuvent jouer un rôle majeur dans la neurotoxicité de l'Aβ. En raison de la relation privilégiée entre les métaux à activité redox (Fe et Cu) et les ROS, le complexe Cu^{II}-Aβ pourrait être impliqué dans la toxicité de l'Aβ envers les neurones (Bush, 2003).

Cela pourrait être expliqué par le mécanisme suivant :



Dans le cerveau, toutes les conditions sont réunies, avec la présence d'agents réducteurs tels que l'ascorbate ou le glutathion, capables de donner un électron aux complexes de Cu^{II} et l'approvisionnement continu d'oxygène. L'ascorbate est disponible à de fortes concentrations dans les cellules du cerveau (neurone 10 mM, cellules glia 1 mM). Il est aussi abondant dans le milieu extracellulaire. Des concentrations de l'ordre de 500 μM dans le fluide cérébrospinal et de 200 à 400 μM dans le fluide extracellulaire ont été rapportées (Rice *et al.*, 2000).

Dans le cas de Fe^{III}-Aβ (Tabner *et al.*, 2002), la production de HO• en présence de réducteur (c'est à dire réactions 1-4) a déjà été étudiée. En revanche, dans le cas de Cu^{II}-Aβ, les parties n'ont été analysées qu'indépendamment. La génération de H₂O₂ en présence de réducteur (réaction 1-3) ou bien la production de HO• en présence de H₂O₂

(réaction 4). Or l'investigation sur la totalité (réaction 1-4) est particulièrement importante :

- (i) Elle traduit les conditions biologiques du cerveau, qui contient des concentrations d'ascorbate entre 200 μM et 10 mM d'ascorbate.
- (ii) HO^\bullet est un des radicaux les plus réactifs en biologie.
- (iii) La séquence 1-4 ne correspond peut être pas simplement à l'addition des deux parties (réaction 1-3 et réaction 4).

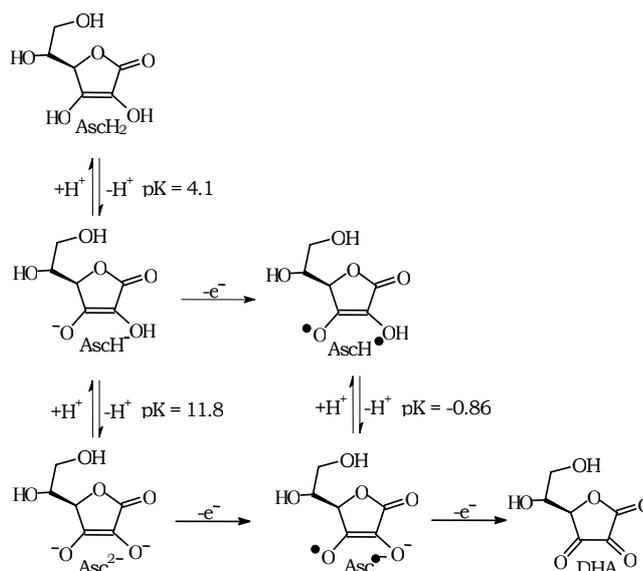


Figure 3.1. Les formes de l'ascorbate

A pH 7,4, 99,95% de l'ascorbate est présent sous la forme Ascorbate⁻ (aussi noté AscH⁻); 0,05% comme AscH₂ et 0,004% comme Asc²⁻. L'ascorbate peut jouer à la fois le rôle d'oxydant et de pro-oxydant, en raison de ses potentiels d'oxydo-réduction intermédiaire à 282 mV et -170 mV (figure 3.2).

Il peut réduire le Cu^{II} et ainsi initier le mécanisme évoqué précédemment conduisant à la production de HO^\bullet . Mais il peut aussi interférer avec la réaction 4 en réduisant HO^\bullet et agir ainsi comme antioxydant.

Il faut également noter que la réaction qui fait intervenir les deux étapes d'oxydation et une perte de H^+ (couple AscH⁻ / DHA) peut aussi intervenir.

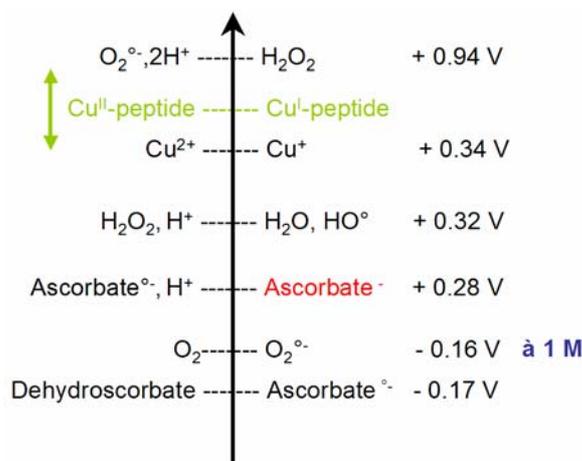
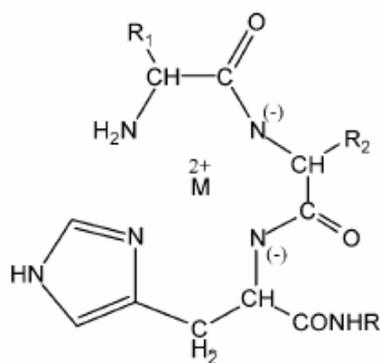


Figure 3.2. Les potentiels d'oxydo-réduction des espèces mises en jeu.

Dans ce chapitre, nous allons montrer que les complexes Cu^{II}-Aβ sont capables de produire des espèces réactives de l'oxygène (et notamment HO[•]) en présence d'agent réducteur tel que l'ascorbate à des concentrations physiologiques. Cette production sera comparée avec celle d'autres complexes Cu^{II}-peptides physiologiques bien caractérisés Cu^{II}-GHK et Cu^{II}-DAHK (Perckins *et al.*, 1984; Pickart *et al.*, 1980; Laussac *et al.*, 1983). Ceci est important car si le complexe Cu^{II}-Aβ joue un rôle dans la neurotoxicité, il devrait produire plus de radicaux que les autres complexes de Cu^{II}.

Le peptide Gly-His-Lys (GHK) intervient sous la forme complexe de cuivre dans le plasma et est impliqué dans la cicatrisation. En solution, le complexe Cu^{II}-GHK est hétérogène. La forme majoritaire semble monomérique, avec un environnement plan carré constitué de 3 atomes d'azote et de 1 d'oxygène comme ligands pour le Cu^{II}. Un ligand azote vient de l'imidazole de l'histidine (Laussac *et al.*, 1983; Freedman *et al.*, 1982).

Le térapeptide Asp-Ala-His-Lys, DAHK, (séquence N-terminale de la sérum albumine humaine) lie le cuivre avec un motif ATCUN bien connu (figure 3.3). Il possède un site de très forte affinité, peu échangeable pour le cuivre ($K_{a_{absolue}} = 6,61 \cdot 10^{-17} \text{ M}^{-1}$) qui rend le Cu^{II} moins vulnérable pour la réduction en Cu^I. Cela semble conférer à l'albumine de sérum humain (HSA) la capacité d'inhiber la formation des ROS induite par le cuivre. Les effets protecteurs contre les dommages oxydants ont été prouvés (Gum *et al.*, 2004; Bar-Or *et al.*, 2001). La «séquestration» du Cu^{II} est certainement responsable de ce comportement. (Bar-Or *et al.*, 2001).



Structure 1: M = Cu, Ni

Figure 3.3. Modèle ATCUN

Dans le mécanisme proposé ci-dessus, le cuivre subit un cycle redox complet (Cu^{II}, Cu^I puis Cu^{II} à nouveau). Nous avons donc déterminé le potentiel redox de plusieurs complexes Cu-peptides afin de les corrélés à leur réactivité.

I. Détection des radicaux hydroxyles

Pour étudier la réaction du Cu^{II} en présence de O₂ et d'ascorbate, nous nous sommes basés sur la détection des radicaux hydroxyles. Pour cela, les radicaux sont piégés par réaction avec des molécules dont le produit peut être analysé en fluorescence ou en RPE.

I.1 Utilisation de la deferroxamine (ou desferral)

Les tampons, même après une préparation minutieuse et filtration sur une résine de chelex, possèdent des traces de Cu^{II} et de Fe^{III}, estimées à environ 1 μM (Huang *et al.*, 2004). Ces traces sont susceptibles de générer des radicaux hydroxyles et donc de modifier les résultats, en interférant avec la production due aux complexes. Par exemple, il a été initialement rapporté que l'Aβ pouvait produire des radicaux spontanément en l'absence de métaux (Hensley *et al.*, 1994). Cependant d'autres travaux ont montré par la suite que des traces de métaux étaient nécessaires à la production de HO[•] par l'Aβ et qu'elles avaient influencé les résultats de la première étude (Dikalov *et al.*, 1999; Turnbull *et al.*, 2001).

Un chélateur des métaux, la deferroxamine (aussi nommée desferral), permet d'éviter ce phénomène. Les mesures effectuées, sans addition de chélateur, détectent,

toujours la production de HO[•] en l'absence d'ajout de Cu^{II}. Ce phénomène a été attribué à la présence de traces de fer et de cuivre dans le tampon. Ces traces sont chélatées par le desferral qui inhibe leur capacité à générer des radicaux OH[•] en présence d'ascorbate (Buettner, 1988; Buettner, 1990). Ajouté dans toutes nos expériences à hauteur de 1 μ M, il est raisonnable de considérer que seules les traces de métaux sont chélatées et que le cuivre ajouté (10 μ M) est fixé par le peptide (10 μ M) pour former un complexe 1:1. Il est néanmoins possible que le desferral chélate aussi une partie du cuivre ajouté si les traces de cuivre et de fer dans le tampon ont été surestimées, mais ce ne serait qu'une partie minoritaire (ne pouvant pas excéder 10%). Ainsi, même s'il subsiste une légère incertitude sur la concentration exacte de cuivre lié aux peptides, cela ne changera pas les conclusions générales.

I.2 Détection en fluorescence

Il est possible de détecter indirectement la production de radicaux hydroxyyles en spectroscopie de fluorescence par piégeage. Pour cela, il suffit soit

- d'utiliser un réactif, possédant un signal en fluorescence, qui donne un produit n'en possédant pas après réaction spécifique avec HO[•]. La diminution de l'intensité du signal est alors représentative de la quantité de HO[•] générée.
- d'utiliser un réactif, ne possédant pas de signal en fluorescence, mais qui donne un produit en ayant un après réaction spécifique avec HO[•]. Dans ce cas, l'augmentation de l'intensité est l'indicateur de la production de radicaux. Cette seconde méthode, basée sur une preuve « positive », a été choisie.

L'acide coumarin-3-carboxylique (3-CCA) (figure 3.4) a été utilisé comme détecteur pour les radicaux hydroxyyles en solution aqueuse (Manevich *et al.*, 1997).

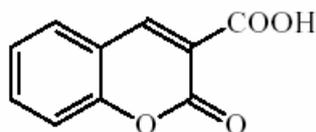


Figure 3.4. L'acide 3-coumarine carboxylique

Son hydroxylation donne le 7-OH-CCA qui est fluorescent. Si une excitation est appliquée à une longueur d'onde $\lambda=390$ nm, une bande d'émission est observée à 452 nm

(figure 3.5). L'intensité du signal fluorescent est linéairement proportionnel au nombre de molécules d'acide 7-hydroxy-coumarin-3-carboxylique formées, et donc proportionnel à la quantité radicaux HO[•] générés. Ainsi, son utilisation permet de suivre la production de HO[•].

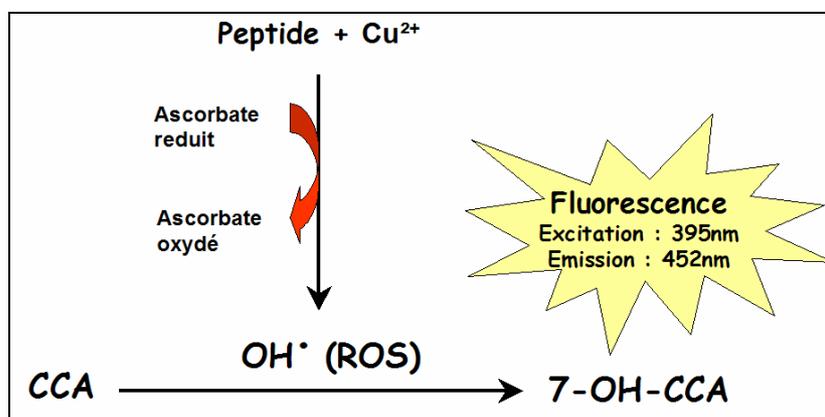


Figure 3.5. Principe de la détection des HO[•] en fluorescence

I.3 Détection des radicaux hydroxyles en RPE

Afin de confirmer les résultats obtenus en fluorescence, une autre méthode de détection des HO[•] a été utilisée. Des expériences similaires ont été effectuées en RPE avec un spin trap comme détecteur de radicaux hydroxyles. Les concentrations des produits utilisées sont les mêmes que pour les expériences de fluorescence. L'agent réducteur utilisé est l'acide ascorbique. Les solutions contiennent du desferral (1 μ M) pour s'affranchir des radicaux susceptibles d'être produits par les traces de métaux dans le tampon. La seule différence est le remplacement du 3-CCA par le 4-pyridyl 1-oxide N-ter-butylnitron (POBN), comme détecteur des HO[•].

Le POBN est un spin trap qui est utilisé pour fixer les radicaux libres. Cependant, le temps de vie des radicaux HO[•] étant très court, ils ne peuvent réagir directement sur le POBN. Une procédure standard pour résoudre ce problème est d'ajouter de l'éthanol (Ramos *et al.*, 1992). Dans un premier temps, le radical HO[•] réagit avec l'éthanol pour former un radical EtO[•], qui a un temps de vie plus long que HO[•] et va réagir avec le POBN pour donner l'hydroéthoxy-POBN qui possède un signal caractéristique en RPE. Le spectre obtenu est typique avec triplet de doublet et des constantes de couplage associées de 15 et 2,5 Gauss (Ramos *et al.*, 1992) (figure 3.6).

L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de HO^\bullet . Ainsi, il est donc possible de suivre la production de radicaux hydroxyles des différents complexes Cu^{II} -A β .

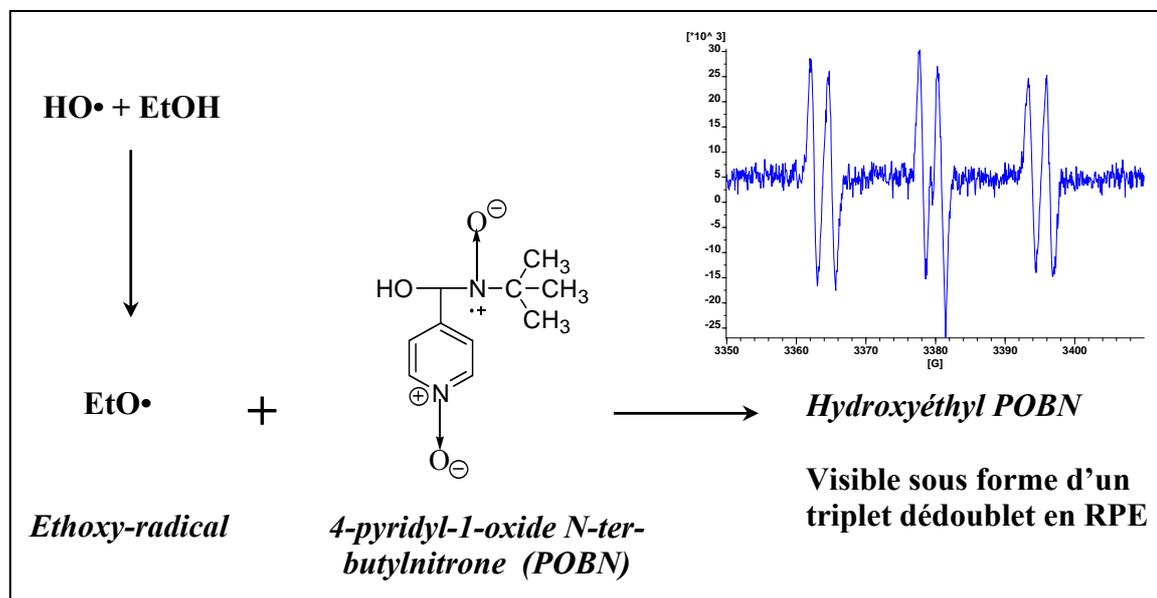


Figure 3.6. Principe de la détection des HO^\bullet en RPE.

II. Les résultats

II.1 En Fluorescence

Nos expériences ont été réalisées en milieu aérobie avec des concentrations d'ascorbate fraîchement préparé entre 300 et 500 μM , car il s'oxyde très vite et son activité redox diminue rapidement. Les concentrations en peptides (A β et peptides de comparaison) sont de 10 μM . Le cuivre est à 1 équivalent par rapport au peptide. Des vérifications ont également été effectuées avec 0,9 équivalent (pour s'assurer qu'il est fixé entièrement). Le 3-CCA est en excès (100 μM). Le desferral est à une concentration de 1 μM .

La figure 3.7 montre la cinétique de la génération de HO^\bullet mesurée par la fluorescence de 7-hydroxy-CCA. La production la plus importante HO^\bullet est celle du Cu^{II} "libre" dans le tampon (▼). La fluorescence augmente linéairement pendant 8 minutes environ et atteint un plateau à environ 30 minutes. La fin de production de HO^\bullet correspond à la consommation de la totalité de l'ascorbate. Quand de l'ascorbate frais est

ajouté, la production de HO^\bullet reprend. Cependant, le Cu^{II} n'existe pas sous forme libre dans le cerveau ou en quantité très négligeable (concentration estimée à 10^{-18} M) (Rae *et al.*, 1999); il est fixé par des chélatants biologiques (protéines, peptides, acides aminés, etc ...). Pour se rendre compte de la toxicité éventuelle de Cu^{II} -A β via la production de HO^\bullet , il faut la comparer la quantité d'hydroxyle générée à celle produite par d'autres complexes de Cu^{II} -protéines/peptides.

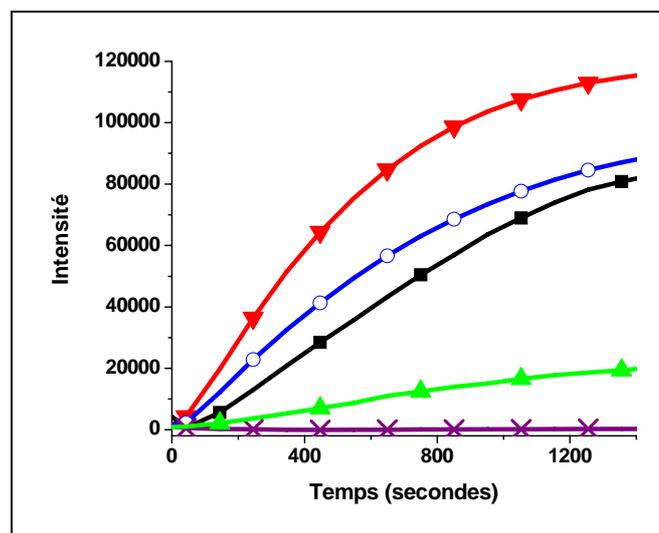


Figure 3.7. Cinétique de la génération de HO^\bullet par les complexes cuivre-peptides. La concentration des complexes est de $10 \mu\text{M}$, ascorbate ($300 \mu\text{M}$), desferral ($1 \mu\text{M}$), CCA ($100 \mu\text{M}$) dans un tampon phosphate. Les complexes étudiés sont le Cu^{II} libre (-▼-), Cu^{II} -GHK(-■-), Cu^{II} -A β 25-35(-○-), Cu^{II} -A β 16(-▲-), et Cu^{II} -DAHK(-X-).

Mais avant d'effectuer des comparaisons, nous nous sommes assurés que H_2O_2 est un intermédiaire de la réaction aboutissant à la production de HO^\bullet par les complexes de cuivre (ou le cuivre seul) en présence d'ascorbate. Une expérience simple est d'effectuer une mesure avec de la catalase. Ajoutée soit au début soit au cours de la réaction (500 nM), elle est censée empêcher la dernière étape de la réaction permettant la production de HO^\bullet à partir de H_2O_2 puisqu'elle transforme H_2O_2 en $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. C'est ce qui a été observée (figure 3.8). Il faut souligner que la concentration de la catalase utilisée est bien inférieure à celle de cuivre (< 100 fois). L'effet est donc dû à sa catalyse et non pas à une interaction directe avec le cuivre. Lorsqu'elle est ajoutée au début de la réaction, on ne détecte pas d'augmentation de la fluorescence. Cela indique qu'il n'y a pas de HO^\bullet générés. Lorsqu'elle est additionnée en cours de réaction, alors immédiatement la fluorescence stagne. La production de HO^\bullet est donc stoppée. La méthode semble bien adaptée pour la détection des ions hydroxyles puisque l'intensité du signal en fluorescence augmente uniquement avec la quantité de HO^\bullet , dont H_2O_2 est le précurseur.

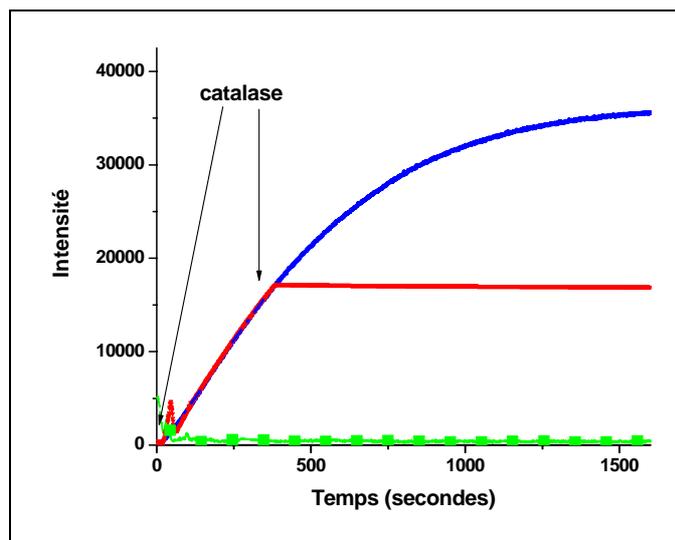


Figure 3.8. Effet de la catalase. La courbe bleue représente l'intensité de signal fluorescent obtenu pour une solution contenant 10 μM de Cu^{II} et 300 μM d'ascorbate. Lorsqu'on ajoute la catalase soit au début (courbe verte) soit en cours de réaction (courbe rouge), l'effet est immédiat.

En présence d'ascorbate, le complexe Cu^{II} -GHK génère presque autant de HO^{\bullet} que le Cu libre. Au contraire, le complexe Cu^{II} -DAHK n'en produit quasiment pas (figure 3.7). Il est clair que la différence de production de radicaux des différents complexes est intimement liée à leur chimie de coordination. En effet, l'environnement du cuivre est respectivement 3N/1O et 4N plan carré dans les complexes Cu^{II} -GHK et Cu^{II} -DAHK.

L'ensemble des complexes de cuivre des peptides A β (16,28,40,42) a également été testé. Tous produisent des quantités significatives de HO^{\bullet} , mais moins que le cuivre libre ou Cu^{II} -GHK (figures 3.7 et 3.9). La fixation du cuivre par le peptide A β aurait donc a priori une tendance protectrice par rapport au Cu^{II} libre. Ce résultat peut sembler paradoxal si on se réfère à la littérature. En effet, selon Huang *et al.*, les complexes Cu^{II} -A β produisent plus de H_2O_2 (le précurseur de HO^{\bullet}) que le Cu^{II} libre, ce qui implique que les peptides en présence de cuivre sont plus toxiques que le cuivre seul. Bien qu'une production de H_2O_2 importante n'est pas directement synonyme de production de HO^{\bullet} forte, ces résultats semblent contredire les nôtres. Cependant, ces travaux ont été effectués avec du cuivre lié par de la Glycine (complexe Cu^{II} -Gly₂) et non du cuivre libre. Nous avons donc également étudié la production de HO^{\bullet} par ce complexe. Il s'avère que celle-ci est très faible. Dans ces conditions, il n'est pas étonnant que les complexes de Cu -A β soient apparus comme toxiques. Les résultats ne sont donc en aucun cas contradictoires.

Il existe des peptides tels que le DAHK qui fixent le cuivre et qui ne produisent que très peu de HO^\bullet sous les mêmes conditions. La légère production de radicaux hydroxyles par les complexes $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta$ pourrait donc être nocive et aboutir à la destruction des neurones.

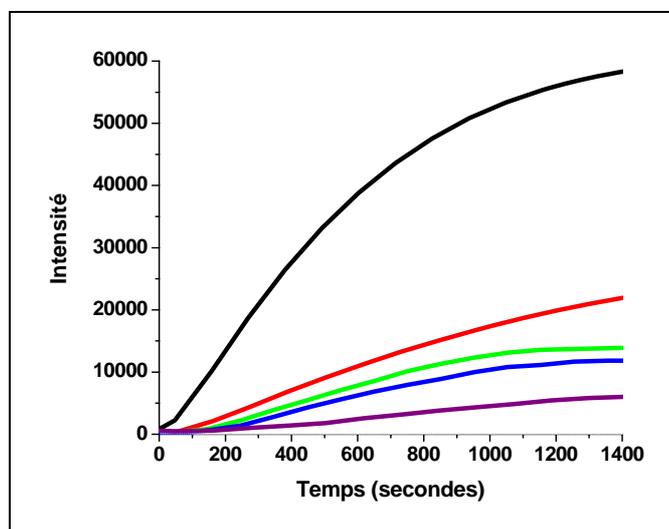


Figure 3.9. Cinétique de la génération de HO^\bullet par les complexes $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta$. La concentration des complexes est de $10\ \mu\text{M}$, ascorbate ($300\ \mu\text{M}$), desferal ($1\ \mu\text{M}$), CCA ($100\ \mu\text{M}$) dans un tampon phosphate. La courbe noire représente la cinétique réalisée avec le peptide $\text{A}\beta_{42}$ « frais » tandis que la courbe violette correspond à l'état agrégé. Les spectres pour l' $\text{A}\beta_{16/28}$ et 40 sont respectivement en rouge, vert et bleu. La courbe magenta est la cinétique obtenue avec une solution de peptide $\text{A}\beta_{42}$ mis à agréger en présence d'un équivalent de cuivre pendant une journée à 37°C .

Les deux formes tronquées $\text{A}\beta_{16}$ et $\text{A}\beta_{28}$ montrent une production très légèrement supérieure à l' $\text{A}\beta_{40}$. Les résidus 17-28 et 17-40, qui ne sont pas impliqués dans la liaison du métal, n'influencent pas non plus la production de HO^\bullet . Le fait que la production du complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{28}$ soit légèrement inférieure à ceux de $\text{A}\beta_{16}$ et légèrement supérieure à l' $\text{A}\beta_{40}$ peut être imputé à la structuration du complexe. Nous avons vu dans le chapitre 2, en RMN, une plus grande structuration avec la longueur du peptide. Une explication possible revient à dire que le métal est moins accessible pour l'ascorbate. Une autre possibilité serait que les HO^\bullet réagissent d'avantage avec le peptide (d'où une partie des HO^\bullet qui ne réagit pas avec la 3-CCA) car il est plus long. Cette réaction pourrait faire intervenir la Met35.

Pour faciliter la comparaison, la figure 3.10 traduit la quantité des radicaux générés par rapport à celle du cuivre « libre ».

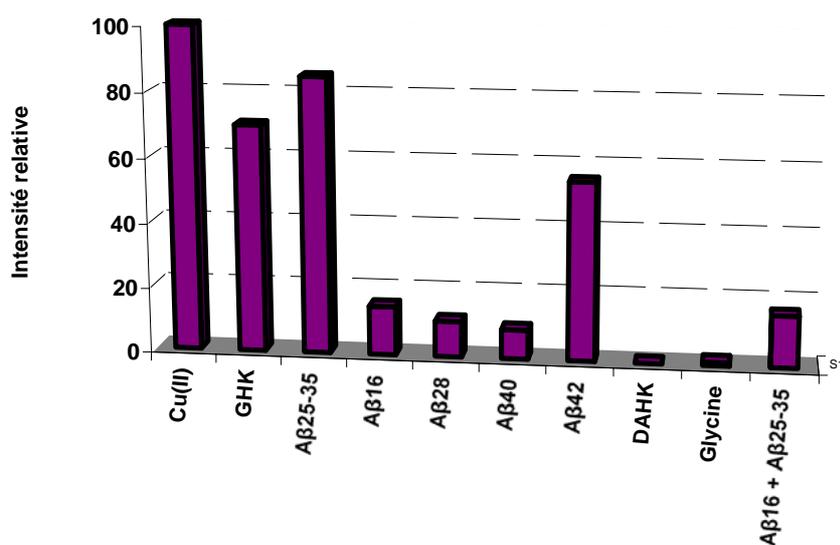


Figure 3.10. Intensité relative de fluorescence après 1500s.

La région 25-35 de l'A β a été suggérée comme étant la partie toxique du peptide amyloïde, faisant intervenir notamment la Met35. Elle possède un atome de soufre très réactif avec les radicaux, et pourrait jouer un rôle dans une cascade de réactions. Nous avons donc testé le peptide A β 25-35 mais il ne possède pas de site de fixation spécifique du cuivre. La génération de HO \cdot correspond à environ 70% de celle du cuivre libre. En l'absence d'un site de fixation spécifique pour le cuivre, la production de HO \cdot observée vient probablement du cuivre « libre ». La différence est seulement due à une interaction faible non spécifique avec le peptide. Cependant, cela ne confirme en aucun cas la toxicité de cette partie du peptide.

Pour se rendre compte si la région 25-35 a un effet sur la production de HO \cdot par le Cu^{II} fixé sur son site de l'A β , un mélange de peptide A β 16 et A β 25-35 a été étudié. Le peptide A β 16 va fixer le cuivre et des HO \cdot vont ensuite pouvoir être produits, comme on l'a déjà vu. Ainsi, il est possible de voir si l'A β 25-35 va avoir un effet sur la génération des HO \cdot . Dans ce cas, la production de HO \cdot observée a été similaire à celle du complexe Cu^{II}-A β 16. La région 25-35 n'accentue donc pas la production de HO \cdot . Cependant, la production de HO \cdot n'est pas le seul mécanisme possible de toxicité.

L'A β 42 révèle une production beaucoup plus importante que l'A β 40. Le complexe Cu^{II}-A β 42 produit moitié moins de HO \cdot que le cuivre seul alors que les complexes formés avec les peptides A β 16,28 et 40 affichent une production entre 7 et 10% de celle Cu seul.

En considérant que plus un complexe produit des HO[•], plus il est toxique alors le A β 42 serait LE peptide amyloïde le plus dangereux, en produisant notamment 5 à 6 fois plus de HO[•] que l'A β 40. Des expériences basées sur la production de H₂O₂ avaient conclu à la même tendance. Il avait été mis en évidence que les peptides A β produisaient de fortes quantités de H₂O₂, et que l'A β 42 en générait notamment 2 fois plus que l'A β 40 (Opazo *et al.*, 2002). La différence au niveau de HO[•] est encore plus accentuée.

Cette importante production de radicaux dans le cas de l'A β 42 pourrait expliquer la toxicité accrue de ce peptide vis-à-vis des neurones. Cela est aussi en accord avec le fait que la proportion de A β 42 est beaucoup plus élevée dans les plaques séniles que dans les cerveaux sains.

La question qui se pose est l'origine de ce comportement si particulier des complexes Cu^{II}-A β 42 vis-à-vis de la production des radicaux hydroxyyles. Au chapitre 2, nous avons vu que les 2 acides aminés qui diffèrent entre les peptides A β 0 et A β 42 (Isoleucine-Alanine) n'interviennent pas dans la fixation du Cu^{II}. Il n'a pas été observé de différence dans la coordination du cuivre entre A β 40 et A β 42. L'explication est donc ailleurs. Cela pourrait être en relation avec la propension du peptide à agréger. Dans le chapitre 4, qui traite de l'agrégation du peptide, nous verrons que les peptides A β 16 et A β 28 n'agrègent pas sous nos conditions opératoires (solution fraîchement préparée à 10 μ M). De même, le peptide A β 40 est entièrement soluble et sous forme d'un monomère dans ces conditions. Par contre, le peptide A β 42 agrège vite et notamment dans les conditions utilisées ici où il forme des oligomères (solution fraîchement préparée à 10 μ M).

Nous nous sommes donc également intéressé à l'A β 42 agrégé en présence de cuivre (incubation à 37°C, pendant 1 jour). La production de HO[•] devient alors beaucoup plus faible, étant du même inférieure à celle de l'A β 40. Si le phénomène d'agrégation est bien la cause de la quantité importante de HO[•] générée, alors ce sont les premiers stades de l'agrégation (oligomères, petits agrégats ou protofibrilles) qui sont les responsables et non pas l'état final (fibres). Pour s'en assurer, l'influence de l'état d'agrégation sur la production de HO[•] a été regardée de plus près. L'agrégation du peptide est intimement lié au temps d'incubation. En faisant varier le temps d'incubation, il est raisonnable de considérer que l'on fait varier le stade d'agrégation. Des expériences après 15 minutes, 30 minutes d'incubation à 37°C ont donc été réalisées.

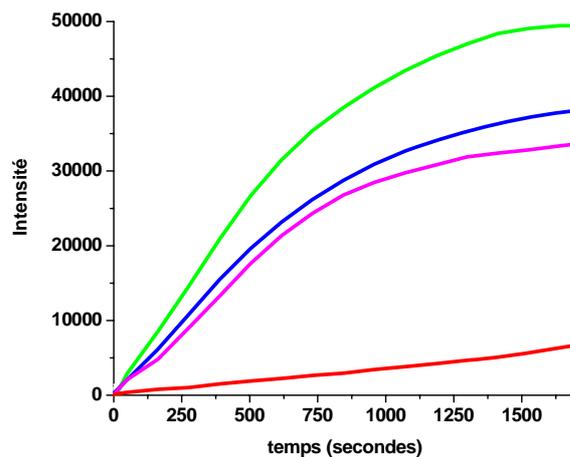


Figure 3.11. Cinétique de la génération de HO[•] par les complexes Cu^{II}-A β 42 incubés à 37°C. La concentration des complexes est de 10 μ M, ascorbate (300 μ M), desferral (1 μ M), CCA (100 μ M) dans un tampon phosphate. La courbe verte représente la cinétique réalisée avec le peptide A β 42 « frais » tandis que les courbes bleue, violette et rouge correspondent à un état d'agrégation plus avancé avec respectivement 15 minutes, 30 minutes et une journée d'incubation.

La plus grande quantité de HO[•] est générée lorsque Cu^{II}-A β 42 a été fraîchement préparé. Plus le temps d'incubation du complexe est long et moins le signal obtenu en fluorescence correspondant à la 7 OH-CCA est intense. Cela signifie que les quantités de HO[•] générées diminuent en fonction du temps d'incubation et donc de l'état d'agrégation du peptide. Il semble que plus le stade d'agrégation est avancé et moins la production de HO[•] est importante. Les premiers états d'agrégation seraient donc responsables de la différence observée entre le complexe de Cu^{II}-A β 42 et les autres complexes Cu^{II}-A β . Ils tendent à expliquer la toxicité de l'A β 42. Ces résultats sont en accord avec ceux de Tabner *et al.*, 2005 qui ont montré sur A β 40 en présence de Fe^{II} que la production de H₂O₂ est corrélée avec les tous premiers états d'agrégation. Ils expliquent l'importance des premiers stades d'agrégation dans la neurotoxicité de l'A β par leur capacité à générer des HO[•] en quantité importante.

Le zinc est présent en quantité importante dans les plaques amyloïdes (Lovell *et al.*, 1998) et possède aussi un site de fixation sur le peptide (Garzon-Rodriguez *et al.*, 1999; Kozin *et al.*, 2001). Il peut donc jouer lui aussi un rôle sur la production de HO[•]. Cela pourrait être le cas s'il donnait une structuration particulière au peptide. Une solution de A β 42 en présence de cuivre et de zinc a donc été étudiée. Les résultats ont été identiques à ceux du complexe de Cu^{II}-A β 42. Le zinc n'accélère pas, mais ne ralentit pas non plus la production de HO[•].

Tous ces résultats sont particulièrement intéressants puisqu'ils mettent en lumière que l'A β 42 a un comportement particulier vis-à-vis de la génération de HO^\bullet , sans doute en relation avec la formation rapide d'oligomères. Cette génération de HO^\bullet pourrait expliquer l'origine de la cascade amyloïde. Il est donc important de confirmer ces expériences par d'autres techniques.

II.2 En RPE

Afin de confirmer les résultats obtenus en fluorescence, des études cinétiques, suivies en RPE, ont été réalisées sur les complexes de cuivre précédemment étudiés. La figure 3.12 montre les spectres obtenus après 30 minutes du cuivre libre, et des complexes Cu^{II} -A β 16/28 et 40 en présence d'ascorbate 300 μM (mêmes conditions qu'en fluorescence).

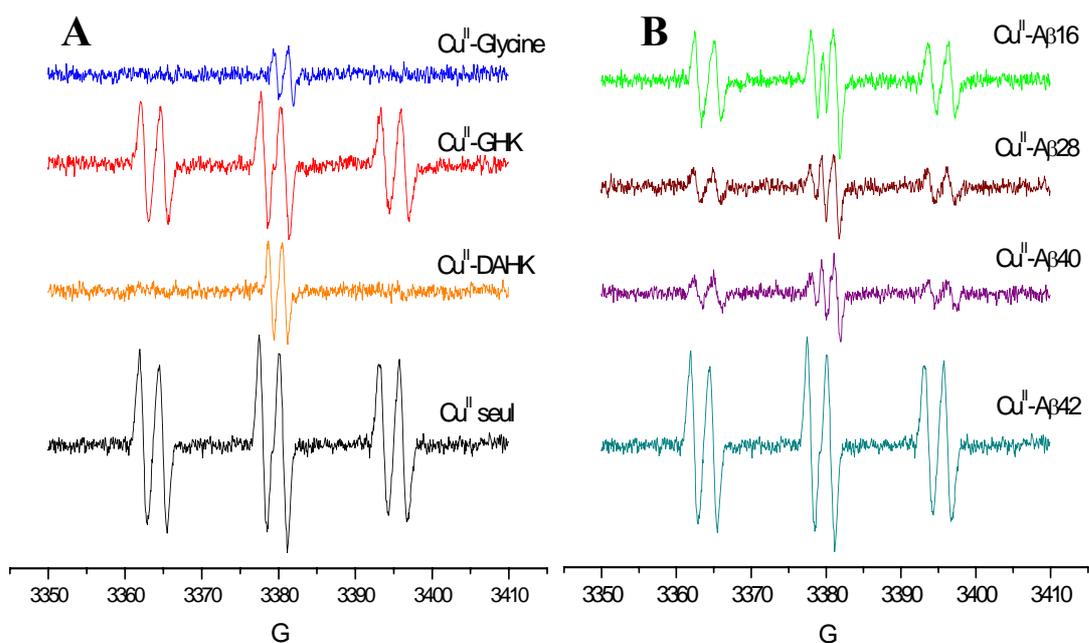


Figure 3.12. Spectres RPE caractéristiques de la génération de HO^\bullet generation par les complexes de Cu^{II} . La concentration des complexes est de 10 μM , ascorbate (300 μM), desferral (1 μM), POBN (10mM) dans un tampon phosphate. Pour un souci de présentation, les échelles d'intensité pour A) et B) ne sont pas les mêmes (il faut multiplier l'intensité des spectres de A) par 2 pour avoir la même échelle).

Pour les échantillons d'A β 16/28 et 40, un doublet au centre est observable. C'est le signal de l'ascorbate oxydé (radical ascorbyle). C'est d'ailleurs le seul signal observable pour les complexes Cu^{II} -DAHK et Cu^{II} -Gly₂, indiquant que très peu de radicaux HO^\bullet sont générés. Intense au début de la réaction, il diminue au cours du temps

alors que celui correspondant à l'hydroéthoxy-POBN augmente. L'intensité relative du signal RPE des différents complexes Cu-peptides après 30 min est représentée par la figure 3.13.

Les intensités relatives mesurées sont comparables à celles obtenues en fluorescence. Le cuivre « libre » est celui qui génère le plus de radicaux hydroxyles. Le peptide DAHK n'en produit quasiment pas et seul le signal du radical ascorbyle est observé (doublet de doublet caractéristique). Au contraire, le signal obtenu avec le GHK est assez intense, prouvant qu'une quantité importante de radicaux hydroxyles est générée, comme nous l'avons déjà observé en fluorescence.

En ce qui concerne les complexes Cu^{II} - $\text{A}\beta_{16/28}$ et 40 produisent tous des quantités non négligeables de HO^{\bullet} . Toutefois, cela est toujours moins que la production du Cu^{II} libre et de Cu^{II} -GHK. Pour l' $\text{A}\beta_{42}$, le signal obtenu est environ 5 fois plus intense que celui de l' $\text{A}\beta_{40}$, indiquant donc une production de HO^{\bullet} 5 fois plus importante.

Si comme précédemment, la quantité d' HO^{\bullet} produite par le Cu^{II} est ramenée à une valeur de 100, on obtient les résultats suivants :

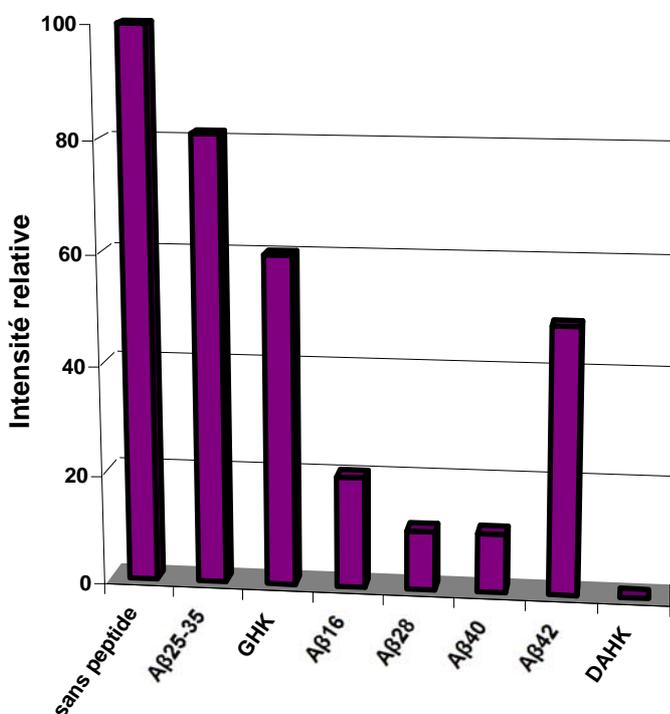


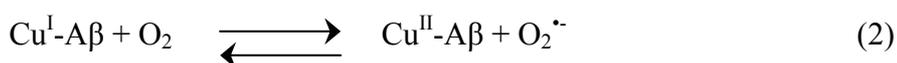
Figure 3.13. Intensité relative du signal RPE après 1500s.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux observés en fluorescence. Les complexes de Cu^{II}-Aβ produisent tous des HO• avec une mention spéciale pour l'Aβ42 qui semble de loin le peptide amyloïde le plus toxique. Tout produit capable d'inhiber la production de HO• du complexe est un médicament potentiel. Nous nous intéresserons donc au paragraphe IV à de tels composés.

Mais avant, pour mieux comprendre le mécanisme de la production de HO• par des complexes Cu^{II}-peptides, nous avons essayé de voir s'il y avait une relation entre les potentiels d'oxydo-réduction des complexes et leur capacité à générer des radicaux hydroxyyles. C'est le sujet abordé par le chapitre III.

III. Potentiels d'oxydo-réduction des complexes cuivre-peptide

Puisque la production de HO• à partir de l'oxygène moléculaire et de l'ascorbate requiert l'oxydation et la réduction des centres cuivre des complexes Cu^{II}-peptides, il est intéressant de savoir, si les réactions redox mises en jeu sont thermodynamiquement favorisées ou défavorisées.



Il est possible de le savoir en déterminant les potentiels d'oxydo-réduction des différents complexes Cu^{II}-peptide en électrochimie.

Des concentrations élevées (~ 1 mM) sont nécessaires et seules les analyses avec les peptides Aβ16 et Aβ28 ont été réalisées. Cependant, nous avons vu au chapitre 2, qu'ils étaient de bons modèles, au moins pour la forme soluble de Aβ40.

La figure 3.14 montre les mesures voltamétriques de Cu^{II}-GHK, Cu^{II}-DAHK et Cu^{II}-Aβ16. Le voltamogramme obtenu avec Cu^{II}-Aβ28 est très similaire à celui de Cu^{II}-

A β 16. Les valeurs déduites pour les potentiels d'oxydation et réduction pour Cu^I/Cu^{II} sont reportées dans le tableau 3.1.

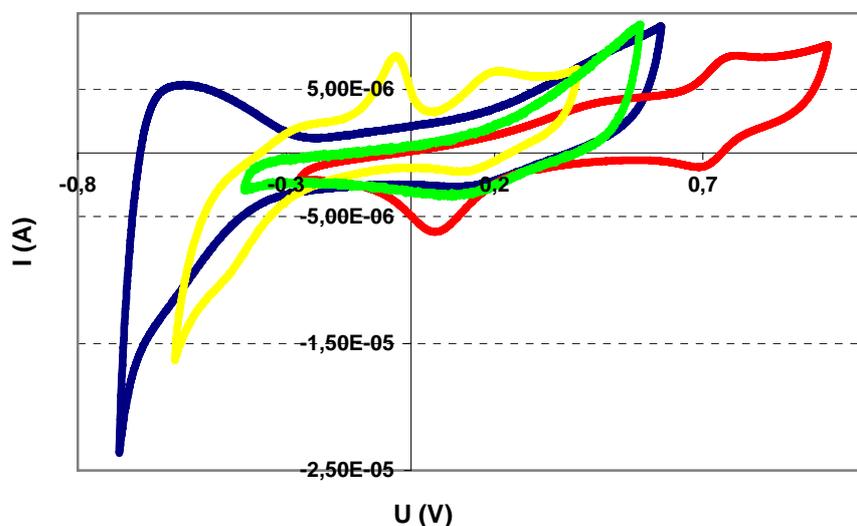


Figure 3.14. Voltamétrie cyclique. Le spectre rouge est celui du complexe Cu^{II}-DAHK, le jaune celui de Cu^{II}-GHK, le bleu celui de Cu^{II}-A β 16 et enfin le vert celui de Cu^{II}-A β 28.

Peptides	Potentiel (ENH) de réduction des complexes de Cu ^{II}	Potentiel (ENH) d'oxydation des complexes de Cu ^I
DAHK	0,295 V	0,710 V
GHK	0,385 V	0,445 V
A β 16	0,336 V	0,646 V
A β 28	0,328 V	0,625 V

Tableau 3.1. Potentiels d'oxydo-réduction des complexes cuivre-peptides déduits de l'électrochimie (ENH). Plus le potentiel de réduction est élevé et plus le complexe est facile à réduire. Plus le potentiel d'oxydation est bas et plus le complexe est facile à oxyder.

Les données électrochimiques peuvent être corrélées avec la chimie de coordination et à la production de HO[•] par les différents complexes Cu^{II}-peptide. En effet, pour Cu-GHK, les couples Cu^I/Cu^{II} et Cu⁰/Cu^I sont observables. La réduction (Cu^{II} en Cu^I) intervient à 0,385 V (potentiel le plus fort) et l'oxydation à 0,445 V (potentiel le plus faible). La différence entre les deux pics est de seulement 60 mV, ce qui correspond à un processus quasi-réversible. Pour Cu^{II}-DAHK, le potentiel de réduction est de 0,295 V. La différence entre les pics d'oxydation et de réduction est de 0,415 V. Cette grande différence indique un réarrangement important suite à la réduction du complexe. C'est ce qui est attendu, puisque le site de coordination relativement rigide et plan carré du motif

ACTUN n'est pas favorable pour l'accommodation du Cu^I. Le Cu^I ne se fixe donc pas dans le même site que le Cu^{II}. Cette modification de coordination le rend non « réversible » et explique la large différence entre les potentiels d'oxydation et de réduction.

Il y a une grande différence sur les potentiels de ces 2 complexes cuivre-peptide. Or, il y en a un qui produit beaucoup de radicaux hydroxyles alors que l'autre n'en produit pas. Il y a donc bien un parallèle entre les potentiels d'oxydo-réduction et la production de radicaux expliquant ce phénomène. Cela vient du fait qu'en raison des potentiels d'oxydation et de réduction des complexes de cuivre, les réactions (1-4) aboutissant à la formation de HO[•] sont plus ou moins favorisées.

Le potentiel de l'ascorbate (+ 0,28 V) est bien inférieur aux potentiels de réduction de tous les complexes Cu^{II}-peptides mesurés, il est donc capable de les réduire. La réaction (1) est donc très favorable thermodynamiquement (figure 3.2). Cependant plus la différence entre le potentiel de réduction des complexes de cuivre et celui d'oxydation de l'ascorbate est grande et plus la réaction est favorisée. Elle se fait donc très facilement dans le cas de GHK, un peu moins bien pour les peptides A β et encore moins bien pour le DAHK.

La seconde étape pour arriver à HO[•] est la réduction de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde, qui a un potentiel relativement bas à -0,16 V (lorsque la concentration en O₂ est de 1M). Thermodynamiquement, c'est l'étape la plus difficile et donc l'étape limitante de la production de HO[•]. Cependant, -0,16 V correspondent au potentiel standard du couple O₂/O₂^{•-}. Pour être rigoureux, il faut considérer l'équation de Nernst, selon laquelle le potentiel $E = -0,16 + 0,06 \log [O_2]/[O_2^{\bullet-}]$. Le potentiel est de -0,16 V uniquement dans le cas où $[O_2] = [O_2^{\bullet-}]$ (définition du potentiel standard). En considérant les conditions habituellement estimées dans une cellule de mesure, $[O_2] = 200 \mu\text{M}$ et $[O_2^{\bullet-}] = 10^{-10} \text{ M}$, alors le potentiel du couple O₂/O₂^{•-} devient égal à +0,22 V! Dans nos échantillons on ne connaît pas exactement les concentrations $[O_2]$ et $[O_2^{\bullet-}]$, par conséquent on ne connaît pas le potentiel, mais il est vraisemblable qu'il soit plus élevé que -0,16 V. Il en résulte que cette seconde étape est moins défavorable qu'il n'y paraît.

Plus le potentiel d'oxydation du complexe Cu^{II}-peptide sera élevé et plus cette étape sera défavorisée. Dans le cas du DAHK, où le potentiel d'oxydation est très élevé,

il est probable que la réaction se fasse très difficilement. Cela expliquerait pourquoi il n'est pas observé de production de HO[•] avec ce peptide. En revanche pour GHK, le potentiel du complexe formé avec le cuivre est de 0,445 V. La réaction est beaucoup moins défavorisée et pourra se faire au moins partiellement. Or avec le GHK, il y a une production de HO[•] importante.

Pour Cu^{II}-A β 16 et Cu^{II}-A β 28, les résultats sont très similaires. Leurs potentiels d'oxydation sont intermédiaires entre ceux des complexes de cuivre du GHK et du DAHK : GHK (0,44 V) < A β (0,63 V) < DAHK (0,70 V). La production de HO[•] résultante est également intermédiaire. Il y a une différence importante (300 mV environ) entre les potentiels d'oxydation et de réduction. Le processus de réduction n'est donc pas totalement réversible. Cela semble dû, comme dans le cas de DAHK, à une modification de la coordination du cuivre. L'environnement du Cu^I dans les complexes Cu^I-A β n'a pas été caractérisé (aucune étude n'est reportée dans la littérature) mais il est certainement différente de celle du Cu^{II} qui est plan carré. Il y aurait donc un réarrangement autour du Cu^I. L'étude des ligands pour le Cu^I reste un axe de recherche à développer.

La réaction (3) est elle très favorable puisque le potentiel de réduction de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène est très élevé (0,94 V) par rapport au potentiel d'oxydation de tous les complexes Cu^{II}-peptides testés.

L'étape finale (4), qui conduit à HO[•], n'est pas non plus très favorable car les potentiels d'oxydation des complexes Cu^{II}-peptide et de réduction de H₂O₂ sont très proches. Elle est tout de même beaucoup moins défavorisée que la réaction (2).

Il y a bien une relation entre les potentiels d'oxydo-réduction et leur capacité à générer des radicaux hydroxyyles en présence d'ascorbate. Plus les réactions (1) et (2) du mécanisme sont facilitées et plus la production de HO[•] est importante.

Les potentiels du complexe Cu^{II}-A β 42 n'ont pas été mesurés, mais on peut supposer, avec les résultats présentés ici, qu'ils sont plus proches de ceux de Cu^{II}-GHK que de Cu^{II}-A β 16 et Cu^{II}-A β 28. Les mesures qui figurent dans la littérature, E^o = 780 mV (par rapport au potentiel de l'électrode normal d'hydrogène) (Huang *et al.*, 1999) semblent donc assez élevées.

IV. Inhibition des ROS

La production de ROS semble être l'un des principaux facteurs de la maladie d'Alzheimer. Tout composé capable de réduire cette production est donc un médicament potentiel. C'est sur cette hypothèse que nous nous sommes intéressés à divers composés.

IV.1 Le Clioquinol

Le Clioquinol (CQ) est un chélateur du cuivre et du zinc. In vitro, il a été montré qu'il était capable de dissoudre partiellement des plaques amyloïdes issues de cerveaux humains *post-mortem* (Cherny *et al.*, 1999). In vitro, il permet également d'inhiber de près de 50 % l'accumulation de Aβ chez des souris transgéniques APP Tg2576 (Cherny *et al.*, 2001). De plus, il a été montré qu'il était capable de prendre le cuivre fixé par l'Aβ ; sa constante de fixation pour le Cu^{II} est de l'ordre de 10⁹ M⁻¹ contre 10⁷ M⁻¹ pour l'Aβ. Cependant, pour considérer que ce composé a un effet positif contre les ROS, il faut que le cuivre lié au CQ ne puisse pas générer de radicaux, sinon il serait aussi dangereux que les complexes Cu^{II}-Aβ. Sa capacité à réduire la production de HO[•], en reprenant le cuivre fixé à l'Aβ, a donc été testé.

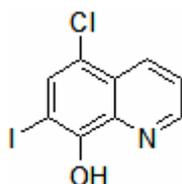


Figure 3.15. Le clioquinol

En spectroscopie de fluorescence, lorsqu'il est ajouté au cours d'une réaction alors l'intensité du signal arrête d'augmenter. Cela indique qu'il y a arrêt de la production de HO[•]. D'une part, la réaction ne se fait plus et d'autre part, le complexe Cu-CQ ne génère pas non plus de radicaux hydroxyles. Il a donc un effet bénéfique contre les ROS. En fixant le cuivre, il est capable d'inhiber le mécanisme de génération des HO[•]. Ces résultats confirment des études qui ont montré qu'il était capable d'inhiber la production de H₂O₂ par le peptide Aβ₄₂ (Cuajungco *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 1999b).

Il est donc très regrettable que ce composé ait du être arrêté en phase II clinique pour sa toxicité car il possède un vrai potentiel pour empêcher les radicaux libres de causer des dommages.

IV.2 La Métallothionéine-3 (MT-3)

Des protéines complexant les métaux et localisées au même endroit que l'A β dans le cerveau pourraient intervenir dans l'échange du cuivre et ainsi avoir une influence directe sur la toxicité de celui-ci. Une telle protéine, la métallothionéine 3 (MT-3), est dérégulée chez les patients atteints par la maladie, sa concentration étant inférieure à la normale (Uchida *et al.*, 1991).

La MT-3 est l'isoforme la plus spécifique du cerveau des métallothionéines (MT) (chapitre 1). En raison de sa propension à lier les métaux, elle pourrait avoir des fonctions physiologiques telles que l'homéostasie des métaux essentiels comme le cuivre et le zinc. Elle est capable de lier jusqu'à 8 équivalents de cuivre (Vasak, 2005). Il a aussi été démontré qu'elles jouent, entre autre, un rôle de protection contre la toxicité de l'A β (Irie et Keung, 2001).

Aux vues de ces propriétés particulières, nous nous sommes intéressés au rôle de la MT-3 dans la maladie d'Alzheimer, notamment savoir si elle pouvait inhiber la production de HO \cdot . En collaboration avec l'équipe du Professeur Vasak à Zürich, la relation entre la MT-3, les peptides, A β 28/40 et 42 a été étudiée.

IV.2.a MT-3 et production de HO \cdot

Comme la catalase ou le clioquinol, l'ajout de MT-3, stoppe l'augmentation du signal en fluorescence de la 7-OH-CCA. Elle empêche donc la génération d'HO \cdot à partir de l'ascorbate et de l'oxygène moléculaire. L'explication la plus probable est qu'elle fixe le cuivre et qu'une fois fixé, il ne peut plus participer à la génération des HO \cdot , même si l'hypothèse d'une réaction de la MT-3 avec les HO \cdot ne peut être totalement écartée. Elle pourrait donc jouer un rôle particulier dans la MA. Il est probable que l'augmentation des ROS chez les patients atteints de la maladie soit en relation avec la diminution de sa concentration chez ces personnes.

IV.2.b MT-3 et A β

Pour essayer d'élucider le mécanisme de suppression des HO \cdot par la MT-3, nous avons essayé de voir si elle est capable de chélater le cuivre couplé à l'A β . Ces travaux ont été initiés dans notre équipe sur le peptide A β 16 par Tamara Delaine et Audrey Gilet.

UV-Visible

Les spectres d'absorption UV-Visible de la MT-3 en présence de cuivre et celle des peptides Aβ avec et sans Cu^{II} sont connus. Il est intéressant de voir si le cuivre lié au Aβ(28/40/42) peut être déplacé par la MT-3 (0,25 équivalents). L'allure du spectre résultant de l'addition de la métallothionéine-3 sur le complexe Cu^{II}-Aβ40, représentée sur la figure 3.16 (courbe rouge) ne peut être expliquée par la seule présence de MT-3 dans le milieu. L'allure du spectre résultant n'est pas la somme des spectres de la MT-3 et de Cu^{II}-Aβ40. Un changement s'est donc produit.

En effet, il apparaît un épaulement à 260 nm, caractéristique de la liaison du Cu^I sur la MT-3 (Roschitzki et Vasak, 2002). De plus la bande de faible intensité à 620 nm environ, caractéristique d'une transition d-d du Cu^{II}, disparaît. Les résultats sont similaires pour tous les peptides amyloïdes Aβ16/28/40/42.

Etant donné que la MT-3 est un meilleur chélatant du cuivre que l'Aβ, les constantes de fixation diffèrent d'un rapport 100, elle est capable de le lui prendre. De plus, il ne semble plus y avoir de Cu^{II}. Le Cu^{II} fixé par la MT-3 serait en Cu^I.

Pour vérifier ces hypothèses, des investigations ont été menées en chromatographie d'exclusion stérique, résonance paramagnétique électronique (RPE) et en phosphorescence.

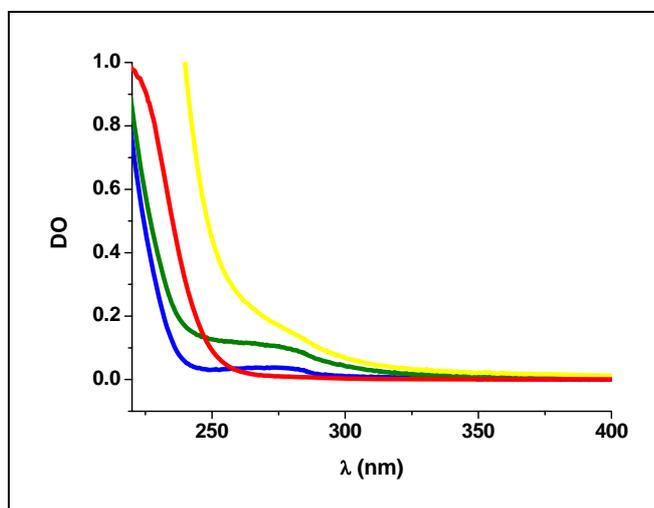


Figure 3.16. Etude du mélange Cu^{II}-Aβ40 + MT-3 en spectroscopie UV-Visible. Spectre d'absorption de la MT-3 (5 μM) rouge, du peptide Aβ40 (20 μM bleue), du complexe Cu^{II}-Aβ40 (20 μM) vert et du mélange Cu^{II}-Aβ40 + MT-3 (jaune)

Chromatographie d'exclusion stérique

Pour s'assurer que le Cu^{II} n'est plus fixé à l'Aβ, une analyse séparative du mélange de protéines par chromatographie d'exclusion stérique a été effectuée. Le

chromatogramme obtenu avec A β 28 (figure 3.17.A) montre la possibilité de séparer 3 produits différents. Le premier a une masse apparente de 21 kDa, le deuxième de 11 kDa et le troisième de 2 kDa. Ce dernier a la masse apparente du peptide A β 28 qui avait été préalablement passé sur la colonne dans les mêmes conditions d'éluion. De plus, le spectre UV-Vis de cette fraction correspond à celui de l'apo-peptide. D'après les masses apparentes, les deux autres produits ayant des masses supérieures proviendraient de la MT-3 sous forme de monomère et de dimère. Le spectre d'absorption des fractions montre clairement l'épaule à 260 nm, en accord avec la fixation du Cu^{I} à la MT-3.

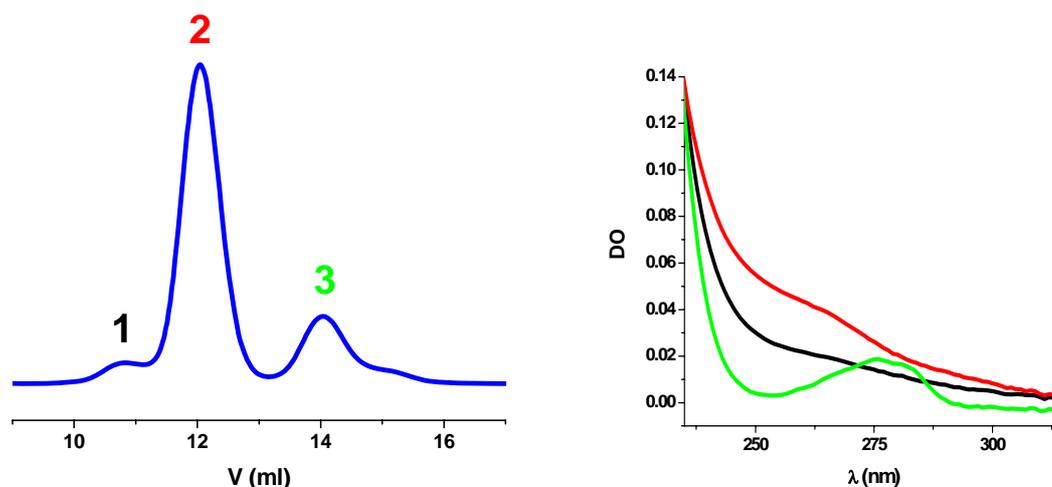


Figure 3.17. Séparation par chromatographie d'exclusion stérique du mélange MT-3 + Cu^{II} -A β 40. A) Chromatogramme à 220 nm de la colonne d'exclusion stérique du mélange (MT-3 + Cu^{II} -A β 28). B) Spectre d'absorption des 3 fractions. La courbe noire représente celui de la première fraction, la rouge celle de la seconde et la verte, la troisième.

Ces expériences de transfert du cuivre de l'A β vers la MT-3 sont très similaires pour tous les peptides amyloïdes A β 16/28/40 et 42 confirmant qu'ils ne lient plus le Cu^{II} . L'échange a même été observé avec du peptide A β 42 agrégé par G. Meloni de l'équipe du Pr Vasak. Il reste à confirmer que le Cu^{II} est réduit en Cu^{I} par la MT-3. Pour cela des expériences en RPE et en luminescence à basse température ont été réalisées.

Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

La RPE est une méthode qui permet de visualiser les entités comportant un ou plusieurs électrons célibataires. Notre hypothèse avance le passage d'un complexe de Cu^{II} avec le A β , à un complexe de Cu^{I} avec la MT-3. Le Cu^{II} a une configuration électronique $3d^9$; il présente donc un électron célibataire et donne un signal en RPE. Le Cu^{I} , de configuration électronique $3d^{10}$, ne comporte que des électrons appariés et ne présentera donc pas de signal. Le signal observé pour le complexe Cu^{II} -A β devrait donc disparaître

en présence de MT-3. Le spectre du complexe Cu^{II} -A β 28, en noir sur la figure 3.18, présente un signal caractéristique d'un complexe de Cu^{II} , que nous avons détaillé au chapitre 2.

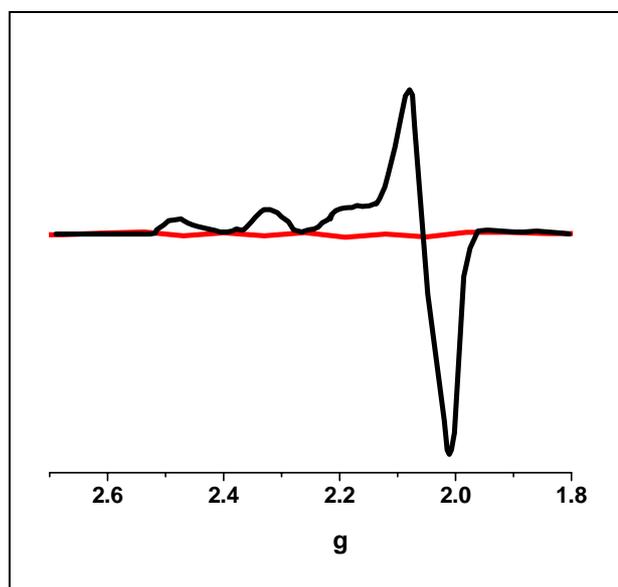


Figure 3.18. Spectre RPE (90K) du complexe Cu^{II} -A β 40 (100 μM) en présence de 0,2 équivalent de MT-3. Le spectre noir est celui du complexe Cu^{II} -A β 28, caractéristique de la présence de Cu^{II} . L'ajout de MT-3 permet d'obtenir la courbe rouge. Il n'y a plus de Cu^{II} . Il semble que le Cu^{II} a été réduit en Cu^{I}

Lors de l'addition de la MT-3 sur ce complexe (spectre en rouge), le signal du Cu^{II} disparaît. Cela tend à montrer que le Cu^{II} a été réduit en Cu^{I} par la MT-3. Cependant, il faut tout de même rester prudent quant à l'interprétation de cette absence de signal. En effet, il pourrait s'expliquer par un couplage antiferromagnétique entre deux ions Cu^{II} . Pour éliminer cette éventualité, une étude de la luminescence à basse température, pour essayer de prouver la présence de Cu^{I} .

Luminescence à basse température

La disparition des bandes d-d en UV et la disparition du signal RPE tendent à prouver la formation de Cu^{I} au cours de la réaction. Une étude de luminescence à basse température a été réalisée pour le confirmer. En effet, les complexes de Cu^{I} ont généralement une luminescence particulière. De plus, si le Cu^{I} est lié à la MT-3, il se trouve dans un cluster thiolate, ce qui lui confère des propriétés de luminescence bien caractérisées (Roschitzki et Vasak, 2002)

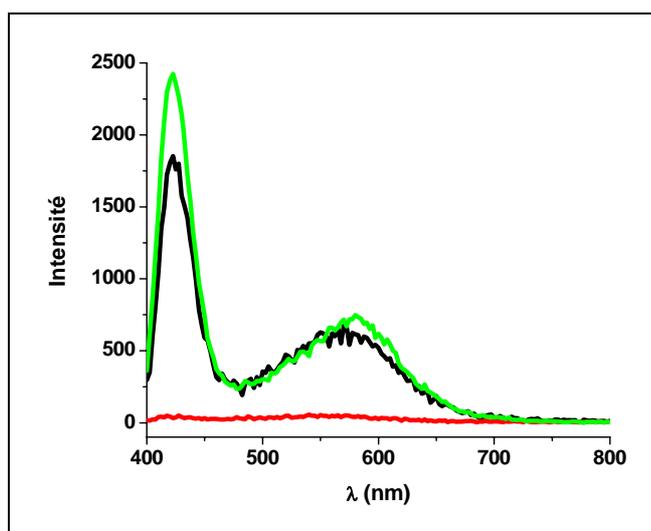


Figure 3.19. Spectres de luminescence à 77K de Cu^{I} -MT3; du complexe Cu^{II} -A β 40 et du mélange Cu^{II} -A β 40 + MT3. La courbe rouge représente le spectre obtenu pour une solution de Cu^{II} -A β 40 (50 μM). L'ajout de MT-3 (0,25 équivalent) donne le spectre noir, comparable à celui de la MT-3 (12,5 μM) en présence de 4 équivalents de Cu^{II} (courbe verte).

Le spectre de luminescence à basse température (77K) des complexes Cu^{II} -A β 40 en présence de MT-3 est représenté sur la figure 3.19 en noir. Il présente une bande d'émission de haute énergie à 425nm avec un $t_{1/2} = 30 \mu\text{s}$, en accord avec une origine d'état triplet excité. L'allure de celui-ci est similaire à celui de la MT-3 en présence de 4 équivalents de Cu^{II} (en vert). Il est donc représentatif d'un complexe de Cu^{I} . Il semble donc que le Cu^{II} fixé au A β ait été fixé puis réduit par la MT-3.

Les échanges de cuivre entre la MT-3 et les peptides amyloïdes sont réalisables in vitro. Il est fort possible qu'ils existent in vivo. Une fois fixé par la MT-3, le cuivre est réduit sous sa forme Cu^{I} . Deux atomes de soufre des thiols cèdent deux électrons à deux atomes de cuivre puis forment un pont disulfure. Le complexe formé Cu^{I} -MT-3 est très stable, la MT-3 a une affinité très élevée pour le Cu^{I} , elle le stabilise. Il semble alors que le cuivre ne subit plus le cycle catalytique aboutissant à la production de HO^{\bullet} ; ce qui est le cas lorsque le Cu^{II} est lié à l'A β . Il n'y a plus de radicaux HO^{\bullet} produits. Ainsi, la MT-3 jouerait un rôle protecteur contre les ROS. L'augmentation de la quantité de A β 42 formant avec le cuivre un complexe capable de générer de radicaux hydroxyles, couplée à la diminution de la MT-3 capable d'inhiber cette production de HO^{\bullet} pourrait être à l'origine de la destruction des neurones via les ROS.

V. Conclusion

Nos résultats indiquent que le cuivre lié aux peptides peut subir un cycle catalytique en présence d'ascorbate et de O₂ aboutissant à la génération de radicaux hydroxyyles. La quantité de HO[•] générée par les différents complexes Cu^{II}-peptides a par ailleurs été corrélée à leurs potentiels d'oxydo-réduction.

La quantité produite par les complexes Cu^{II}-A β est modérée, entre celles de Cu^{II}-GHK et Cu^{II}-DAHK, 2 complexes physiologiques. Le peptide A β 42 est le peptide amyloïde qui produit le plus de HO[•], notamment il en produit 5 fois plus que A β 40. Cependant, les cellules ont des mécanismes de défenses contre les ROS. Elles sont capables d'en éliminer une certaine quantité sans que cela ne lui soit préjudiciable. L'élimination des ROS est assurée par exemple par la SOD ou la catalase. Il faut donc tester *in vivo* si les ROS produits par les complexes de Cu-amyloïdes génèrent une quantité de ROS critique pour les cellules, aboutissant à leur mort. Des expériences sont actuellement menées sur des cellules de SH-SY5Y (cellules cancéreuses utilisées pour modéliser les cellules neuronales) dans différentes conditions expérimentales. Elles ont pour but de valider la toxicité particulière du complexe de cuivre formé avec l'A β 42. Par ailleurs des protéines tels que la MT-3 sont capables de prendre le cuivre fixé à l'A β . Leur effet protecteur contre la production de HO[•] a été mis en évidence. Or il a été montré que cette protéine était déficiente chez les patients de la MA où son taux est 10 fois moins élevé que chez le sujet sain. La recherche de protéines, n'assurant plus leur rôle dans le cas de la MA, pourrait, peut être, permettre d'expliquer l'accumulation des métaux au niveau des plaques amyloïdes.

L'effet positif du clioquinol sur la production de HO[•] a aussi été montré. La recherche de chélatant capable de prendre le cuivre à l'A β en s'inspirant de la chimie de la MT-3 serait donc un axe thérapeutique intéressant à développer.

VI. Bibliographie

- Bar-Or, D., Rael, L.T., Lau, E.P., Rao, N.K.R., Thomas, G.W., Winkler, J.V., Yulk, R.L., Kingston, R.G., and Curtis, C.G. (2001) An analog of the Human Albumin N-terminus (Asp-Ala-His-Lys) Prevents Formation of Copper-Induced Reactive Oxygen Species. *Biol. Biophys. Res. Com.* **284**: 856-862.
- Buettner, G.R. (1988) In the absence of catalytic metals, ascorbate does not autoxidize at pH 7: Ascorbate as a test for catalytic metals. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **16**: 20-40.
- Buettner, G.R. (1990) Ascorbate oxidation: UV absorbance of ascorbate and ESR spectroscopy of the ascorbyl radical as assays for iron. *Free Rad. Res. Comm.* **10**: 5-9.
- Bush, A.I. (2003) The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **26**, 207-214.
- Cuajungco, M.P., Goldstein, L.E., Nunomura, A., Smith, M.A., Lim, J.T., Atwood, C.S., Huang, X., Farrag, Y.W., Perry, G., and Bush, A.I. (2000) Evidence that the β -amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of A β by zinc. *J. Biol. Chem.* **275**: 19439-19442.
- Cherny, R.A., Atwood, C.S., Xilinas, M.E., Gray, D.N., Jones, W.D., McLean, C.A., Barnham, K.J., Volitakis, I., Fraser, F.W., Kim, Y.S., Huang, X., Goldstein, L.E., Moir, R.D., Lim, J.T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R.E., Masters, C.L., and Bush, A.I. (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* **30**: 665-676.
- Dikalov, S.I., Vitek, M.P., Maples, K.R. and Mason, R.P. (1999) Amyloid- β -Peptides Do Not Form Peptide-derived Free Radicals Spontaneously, but Can Enhance Metal-catalyzed Oxidation of Hydroxylamines to Nitroxides. *J. Biol. Chem.* **274**, 9392-9399.
- Freedman, J.H., Pickart, L., Weinstein, B., Mims, W.B., and Peisach, J. Structure of the glycyl-L-histidyl-L-lysine-copper(II) complex in solution. *Biochemistry* **21**: 4540-4544.
- Garzon-Rodriguez, W., Yatsimirsky, A.K., and Glabe, C.G. (1999) Binding of Zn(II), Cu(II), and Fe(III) ions to Alzheimer's A β peptide studied by fluorescence. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**: 2243-2248.
- Gum, E.T, Swanson, R.A., Alan, C., Liu, J., Hong, S., Weinstein, P.R., and Panter, S.S. (2004) Human Serum Albumin and its N-Terminal tetrapeptide D-A-H-K Block Oxidant-Induced Neuronal Death. *American heart association*, **35**: 590.
- Hensley, K., Carney, J.M., Mattson, M.P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, F.J., Floyd, R.A. and Butterfield, D.A. (1994) A Model for β -Amyloid Aggregation and Neurotoxicity Based on Free Radical Generation by the Peptide: Relevance to Alzheimer Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**: 3270-3274.
- Huang, X., Cuajungco, M.P., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Tyndall, J.D.A., Hanson, G.R., Stokes, K.C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Saunders, A.J., Lim, J., Moir, R.D., Glabe, C., Bowden, E.F., Masters, C.L., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1999) Cu(II) potentiation of Alzheimer A β neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **274**: 37111-37116.

- Huang, X., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Cuajungco, M.P., Gray, D.N., Lim, J., Moir, R.D., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1999) The A β Peptide of Alzheimer's Disease Directly Produces Hydrogen Peroxide through Metal Ion Reduction. **38**: 7609-7616.
- Huang, X., Atwood, C.S., Moir, R.D., Hartshorn, M.A., Tanzi, R.E., Bush, A.I. (2004) Trace metal contamination initiates the apparent auto-aggregation, amyloidosis, and oligomerization of Alzheimer's Abeta peptides. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **9**: 954-960.
- Irie, Y., and Keung, W.M., (2001) Metallothionein-III Antagonizes the Neurotoxic and Neurotrophic Effects of Amyloid β Peptides. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **282**: 416-420.
- Kozin, S.A., Zirah, S., Rebuffat, S., Hoa, G.H., and Debey, P., (2001) Zinc Binding to Alzheimer's A β (1-16) Peptide Results in Stable Soluble Complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **285**: 959-964.
- Laussac, J.-P., Haran, R., and Sarkar, B. (1983) N.m.r. and e.p.r. investigation of the interaction of copper(II) and glycyl-L-histidyl-L-lysine, a growth-modulating tripeptide. *Biochem. J.*, **209**: 533-539.
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., and Markesbery, W.R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* **158**: 47-52.
- Manevich, Y., Held, K.D., and Biaglow, J.E.(1997) Coumarin-3-Carboxylic Acid as a Detector for Hydroxyl Radicals Generated Chemically and by Gamma Radiation. *Radiat. Res.*, **148**: 580-591.
- Opazo, C., Huang, X., Cherny, R.A., Moir, R.D., Roher, A.E., White, A.R., Cappai, R., Masters, C.L., Tanzi, R.E., Inestrosa, N.C., and Bush, A.I. (2002) Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease β -amyloid. *J. Biol. Chem.*, **277**: 40302-40308.
- Perkins, C.M., Rose, N.J., Weinstein, B., Stenkamp, R.E., Jensen, L.H., Pickart L. (1984) The structure of a copper complex of the growth factor glycyl-L-histidyl-L-lysine at 1.1 Å resolution *Inorganica Chimica Acta*, **82**: 93-99.
- Pickart, L., Freedman, J.H., Loker, W.J., Peisach, J., Perkins, C.M., Stenkamp, R.E., and Weinstein B. (1980) Growth-modulating plasma tripeptide may function by facilitating copper uptake into cells. *Nature*, **288**: 715-717.
- Rae, D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., and O'Halloran, T.V. (1999) Undetectable Intracellular Free Copper: The Requirement of a Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. *Science*, **284**: 805-808.
- Ramos, C.L., Pou, S., Britigan, B.E., Cohen, M.S., and Rosen, G.M. (1992) Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J. Biol. Chem*, **267**: 8307-8312.
- Rice, M.E. (2000) Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.*, **23**: 209-216.
- Roschitzki, B., and Vasak, M. (2002) A distinct Cu-4-thiolate cluster of human metallothionein-3 is located in the N-terminal domain. *J. Biol. Inorg. Chem*, **7**: 611-616.

- Tabner, B.J., Turnbull, S., El-Agnaf, O.M.A. and Allsop, D. (2002) Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A β and α -synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Free Rad. Biol. Med.*, **32**: 1076-1083.
- Tabner, B.J., El-Agnaf, O.M.A., Turnbull, S., German, M.J., Paleologou, K.E., Hayashi, Y., Cooper, L.J., Fullwood, N.J., and Allsop, D. (2005) Hydrogen Peroxide Is Generated during the Very Early Stages of Aggregation of the Amyloid Peptides Implicated in Alzheimer Disease and Familial British Dementia. *J. Biol. Chem.*, **280**: 35789–35792.
- Turnbull, S., Tabner, B.J., El-Agnaf, O.M.A., Twyman, L.J. and Allsop, D. (2001) New evidence that the Alzheimer β -amyloid peptide does not spontaneously form free radicals: An ESR study using a series of spin-traps. *Free Rad. Biol. Med.*, **30**: 1154-1162.
- Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y., and Tomonaga, M. (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, **7**: 337-347.
- Vasak, M. (2005) Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elements Med. Biol.* **19**: 13-17.

Le processus d'agrégation

Les plaques amyloïdes sont présentes uniquement dans les cerveaux des patients atteints de la MA. Le principal constituant de ces plaques est le peptide A β agrégé, avec une structuration en fibres (figure 4.1) (Selkoe *et al.*, 2001).

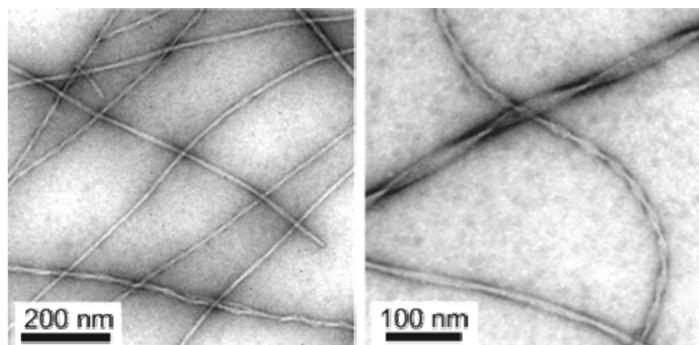


Figure 4.1. Images de fibres amyloïdes formées par le peptide A β 40 *in vitro* observées par microscope électronique. (Tycko, 2003).

Le mécanisme aboutissant à la formation des fibres est considéré comme une étape clé de la maladie. Il est donc important de le comprendre. Plusieurs intermédiaires ont été isolés et décrits dans la littérature (figure 4.2). Leur taille varie du dimère jusqu'à des architectures plus larges d'une dizaine de nanomètres de diamètres, comme les protofibrilles (Klein *et al.*, 2004). Pour simplifier, tous ces intermédiaires et les fibres seront regroupés sous le terme d'agrégat.

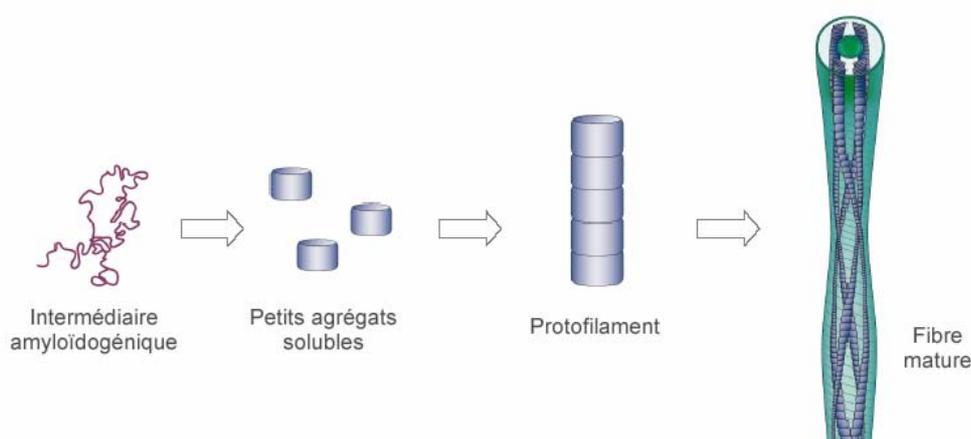


Figure 4.2. Etapes de la fibrillation de l'A β

Certains de ces intermédiaires seraient par ailleurs les formes toxiques (Hardy et Selkoe, 2002). Les conditions influençant leur formation (tampon, pH, métaux...) sont donc très importantes.

De nombreux travaux ont montré que l'agrégation du peptide A β était influencée par la présence d'ions métalliques, notamment le Zn^{II} et le Cu^{II}. Des concentrations sub-micromolaires suffisent à favoriser l'agrégation de celui-ci (Cuajungco *et al.*, 2005). Le

Zn^{II} à des concentrations physiologiques (≥ 300 nM) induit une agrégation rapide d'A β 40 en structures de type amyloïde résistantes aux protéases (Bush *et al.*, 1994a; Bush *et al.*, 1994b; Huang *et al.*, 1997). Le Cu^{II}, et dans une moindre mesure le Fe^{III} induisent également la précipitation de A β à pH = 7,4 (Atwood *et al.*, 1998).

Le phénomène d'agrégation est d'autre part amplifié à pH acide (pH = 6,6), dans le cas du Cu^{II} comme du Fe^{III} (Atwood *et al.*, 1998). Or le pH au sein du cerveau a tendance à s'acidifier légèrement lors de la maladie d'Alzheimer suite à un phénomène d'inflammation.

Le mécanisme exact n'est pas encore connu dans le détail. Cependant, un mécanisme communément admis pour les différents peptides/protéines amyloïgéniques est le suivant :

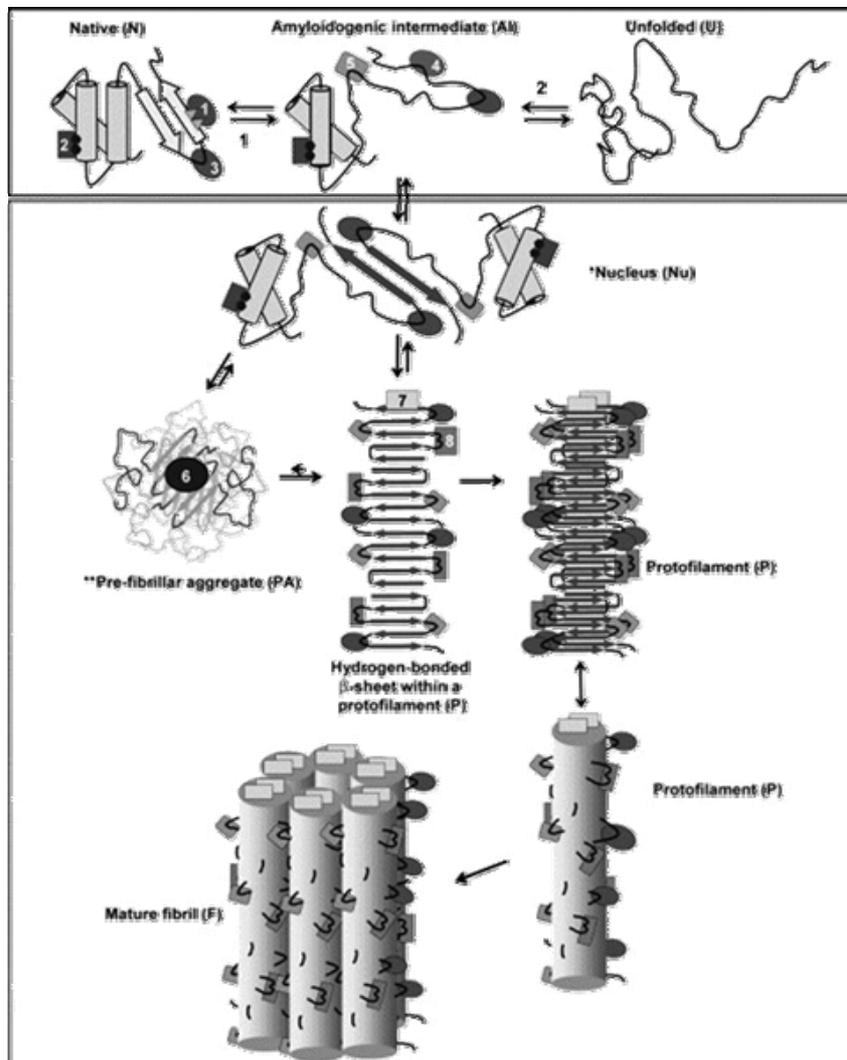


Figure 4.3. Mécanisme supposé de la formation des fibres amyloïdes. (d'après Dumoulin et Dobson, 2004)

La première étape serait la formation d'un intermédiaire amyloïde à partir de la protéine A β native ou non structurée. Celui-ci aurait une forte tendance à agréger et deviendrait stable par des liaisons intermoléculaires. De petits oligomères (dimères sur la figure 4.3) seraient alors formés et joueraient le rôle de nucleus, dirigeant ainsi la croissance des agrégats. Le processus conduirait ainsi à la formation d'oligomères « de haut degré » appelés agrégats protofibrillaires. Ces agrégats seraient ensuite convertis en protofilaments puis finalement en fibres, constituées de 2 à 6 protofilaments enchevêtrés les uns dans les autres.

Les structures des intermédiaires et des agrégats en présence des métaux sont peu décrites dans la littérature. Des études RPE ont toutefois montré que les ligands impliqués dans la fixation du cuivre étaient les mêmes pour le complexe monomérique Cu^{II}-A β 40 et pour les fibres (Karr *et al.*, 2004). Il n'y a donc pas de modification majeure de l'environnement du métal entre le début (forme monomérique) et la fin (fibres) du processus d'agrégation.

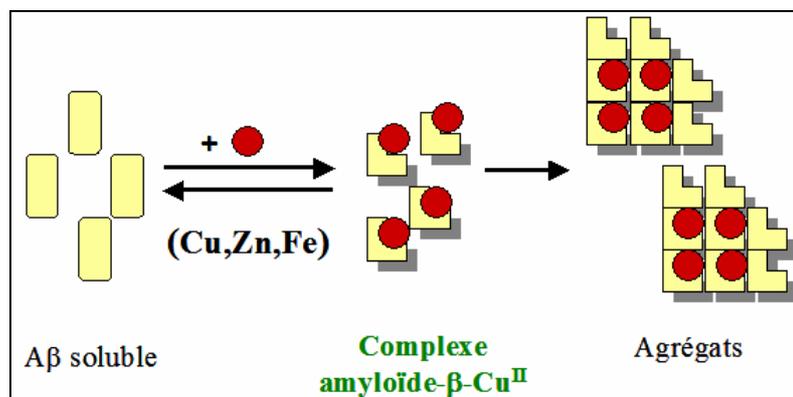


Figure 4.4. De l'A β soluble aux agrégats

Jusqu'à présent, nous nous sommes intéressés uniquement à la forme soluble des complexes de Cu-A β (coordination, réactivité ...). Il est donc temps à présent de s'attarder sur la caractérisation des agrégats, précurseurs des plaques amyloïdes (figure 4.4) et de déterminer le rôle du complexe Cu^{II}-A β . Ce chapitre traite de l'effet du Cu^{II} sur l'agrégation du peptide A β . Plusieurs points ont été étudiés : la cinétique d'agrégation, la formation des intermédiaires (dimères, trimères, oligomères) et la nature des agrégats (organisation fibrillaire ou non).

I. Effets des métaux sur l'agrégation

Des concentrations élevées de Zn^{II} et Cu^{II} ont été trouvées dans les plaques amyloïdes. Ces ions métalliques lient la partie N-terminale (acides aminés 1-16) et influencent l'agrégation du peptide. Alors qu'il a été établi que le zinc accélère l'agrégation, l'effet du cuivre est beaucoup plus controversé. Il a été rapporté, selon les différentes conditions expérimentales, qu'il accélérerait ou ralentissait le processus. (Atwood *et al.*, 1998 ; Zou *et al.*, 2001 ; Raman *et al.*, 2005). Nous nous sommes intéressés à la cinétique de l'agrégation avec les métaux dans les conditions expérimentales suivantes: tampon Hepes 50 mM, NaCl 100mM, pH 7,4.

Le peptide A β 40 à une concentration de 50 μ M a été incubé à 37°C pendant différents laps de temps (3 heures, une journée et 3 jours) dans les conditions suivantes :

- apo-A β 40
- A β 40 + 1 équivalent de Zn^{II}
- A β 40 + 1 équivalent de Cu^{II}
- A β 40 + 2 équivalents de Cu^{II}
- A β 40 + deferroxamine

Le peptide agrégé est ensuite sédimenté par centrifugation (30 minutes, 21 000 \times g, à 4 °C). En considérant que les agrégats sont plus lourds et sédimentent donc plus facilement, les différentes fractions de l'A β 40 (soluble et agrégé) sont séparées puis quantifiées (chapitre 5). Ainsi, il est possible de voir l'effet des conditions opératoires sur l'agrégation.

L'échantillon [apo-A β 40, en présence du chélateur de métaux, deferroxamine] est l'échantillon de référence pour comparer l'effet des métaux. En effet, il faut garder à l'esprit que le tampon utilisé contient souvent des traces de métaux qui peuvent influencer sur l'agrégation de l'apo-peptide. La deferroxamine permet de les chélater. Les différences observées entre les échantillons [apo-A β 40, deferroxamine] et apo-A β 40 seront donc dues à l'absence traces de métaux.

Après 3 jours d'incubation à 37 °C, les résultats pour ces 5 échantillons sont similaires. La quantité de peptide présente dans le culot (fraction de peptide supposé comme agrégé) représente environ 90% de la quantité de peptide initiale. Il reste une fraction de A β 40 (environ 4-5 μ M) soluble même après 3 jours d'incubation dans le surnageant. L'analyse UV-Vis du surnageant montre un spectre comparable à ceux de l'A β 40 « frais » à une concentration de 5 μ M. Des expériences avec des concentrations initiales en peptide différentes (10 μ M et 20 μ M) donnent un résultat similaire avec environ 5 μ M de peptide A β 40 qui reste soluble. Il resterait donc toujours une fraction soluble de A β , similaire quelque soit la quantité de A β initiale. Il est raisonnable de supposer qu'il existe donc un équilibre dynamique dans le processus d'agrégation entre la forme monomère et certains agrégats. Ce phénomène d'équilibre a été déjà observé pour l'A β sans métaux (O'Nuallain *et al.*, 2005). Des essais préliminaires, avec le peptide A β 42, ont permis d'observer le même effet. La fraction soluble est cependant inférieure, environ 2-3 μ M.

La présence de métaux Zn^{II} ou Cu^{II} ne semble donc pas inhiber l'agrégation. Ils n'ont pas d'effet sur la stabilité thermodynamique à la fin de l'agrégation où il semble y avoir un équilibre entre les agrégats et la forme soluble. En revanche, ils ont un effet cinétique sur l'agrégation. Les essais effectués après 3 heures appuient cette hypothèse (figure 4.5). Selon les conditions opératoires, la quantité de peptide présente dans le culot est cette fois différente. La classification, du plus agrégé au moins agrégé, est la suivante: [Zn^{II}-A β 40] > [Cu^{II}₂-A β 40] > [apo-A β 40] \approx [Cu^{II}₁-A β 40] > [apo-A β 40, deferroxamine].

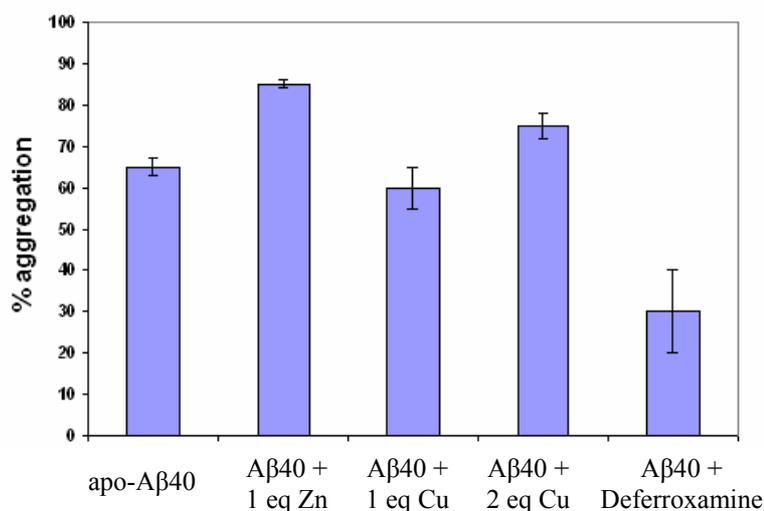


Figure 4.5. Effet des métaux sur l'agrégation de l'A β 40. Proportion de A β 40 agrégé avec ou sans métaux à pH 7,4 après une incubation de 3heures à 37°C sous agitation (3h, 37 °C) exprimée en pourcentage par rapport à la quantité de peptide initiale (50 μ M).

En présence de deferroxamine, seulement 30% de la quantité du peptide A β 40 mis à agréger est retrouvé dans le culot après 3 heures d'incubation (contre 65% pour l'apo-A β 40). Le reste se retrouve dans le surnageant sous forme soluble. La cinétique est ralentie par rapport à l'apo-peptide. L'explication la plus probable est que la deferroxamine défavorise l'agrégation en chélatant les traces de métaux présents. Il semble donc que ces traces de métaux sont bien des promoteurs de l'agrégation. (Cuajungco *et al.*, 2005). Un effet direct de la deferroxamine sur l'agrégation (indépendant de la chélation des métaux) ne peut cependant être totalement écarté.

L'agrégation pour l'A β 40 en présence d'un équivalent de zinc est plus rapide que sans zinc. Après une journée d'incubation, 90% du peptide initial mis à agréger est retrouvé dans le culot soit la même quantité qu'après 3 jours. Le zinc accélère donc le processus d'agrégation. Ces résultats sont en accord avec des études *in vitro* ont permis de montrer que le Zn^{II} induit l'agrégation rapide d'A β 40 (Bush *et al.*, 1994a; Bush *et al.*, 1994b; Huang *et al.*, 1997).

Avec un équivalent de cuivre, l'agrégation est de 60% (contre 65% pour l'apo-A β 40). Le cuivre n'accélère pas le processus d'agrégation par rapport à l'apo-A β 40. Cette légère différence n'indique pas non plus que la présence de cuivre inhibe l'agrégation dans nos conditions expérimentales. Par contre, par rapport à l'apo-A β 40 en présence de deferroxamine, il y a un effet d'accélération du cuivre. Avec 2 équivalents, l'agrégation obtenue est même de 80%, soit presque autant qu'avec le zinc.

Des essais d'agrégation avec le peptide A β 42 ont été réalisés dans des conditions similaires. Après une demie journée d'incubation, quelque soient les conditions opératoires, plus 90% du peptide A β 42 mis à incuber est retrouvé dans le culot. Cela signifie donc que plus de 90% est agrégé après seulement quelques heures d'incubation. L'agrégation pour le peptide A β 42 est plus rapide que celle de l'A β 40. De plus, cela indique que les métaux n'ont pas d'effet sur la stabilité thermodynamique des agrégats d'A β 42, comme dans le cas de A β 40.

Nous verrons au paragraphe II.1.b, que la chromatographie d'exclusion stérique a permis d'isoler moins de monomère pour le peptide A β 42 en présence de Cu^{II} que pour le peptide A β 40 dans les mêmes conditions, ou que l'apo-A β 42. Ainsi, le Cu^{II} semble accélérer l'agrégation de l'A β 42.

La cinétique de formation des agrégats est donc la suivante : $[Cu^{II}\text{-A}\beta 42] > [A\beta 42] > [Cu^{II}\text{-A}\beta 40]$. Ces résultats sont en accord avec ceux de Atwood *et al.*, 1998.

En conclusion les métaux, et le zinc en particulier, ont un effet cinétique sur l'agrégation. Il semble que la formation du nucleus (point de départ de l'agrégation), qui est apparemment l'étape limitante du processus, soit favorisée par la présence du zinc (pour l'A β 40 et l'A β 42) et du cuivre (pour l'A β 42). Le fait que l'apo-peptide agrège plus vite que l'apo-peptide en présence d'un chélatant des traces de métaux indique que des concentrations très faibles suffisent à observer cet effet. Dans la littérature, il a également été décrit que les traces de fer jouent également un rôle non négligeable (Huang *et al.*, 2004). Compte tenu de leur concentration dans le cerveau, on peut considérer que les métaux jouent un rôle majeur dans l'agrégation du peptide *in vivo*. Cependant, le mécanisme expliquant une vitesse accrue en leur présence n'est toujours pas élucidée.

D'autres questions restent également en suspens. Peut-on isoler des intermédiaires entre la forme soluble et les fibres ? Les agrégats formés en présence de métaux sont-ils les mêmes que sans ? Nous allons essayer de répondre à ces interrogations dans les paragraphes suivants.

II. Monomère, dimère, oligomère ?

L'influence des métaux sur l'agrégation d'une protéine ou d'un peptide peut être conceptuellement divisée 2 mécanismes :

(i) Le métal peut par exemple être lié par les ligands de deux molécules d'A β et former un pont (voir figure 4.6.A) (Miura *et al.*, 2000).

(ii) Il peut lier l'A β sous la forme d'un complexe monomérique et induire des changements conformationnels qui favorisent l'agrégation par des contacts peptide-peptide. (Karr *et al.*, 2005 ; Huang *et al.*, 1997) (figure 4.6.B).

Des mécanismes intermédiaires sont aussi envisageables comme la formation de dimères par un métal pontant qui ensuite agrègent en se liant aux autres dimères par un contact peptide-peptide (figure 4.6.C).

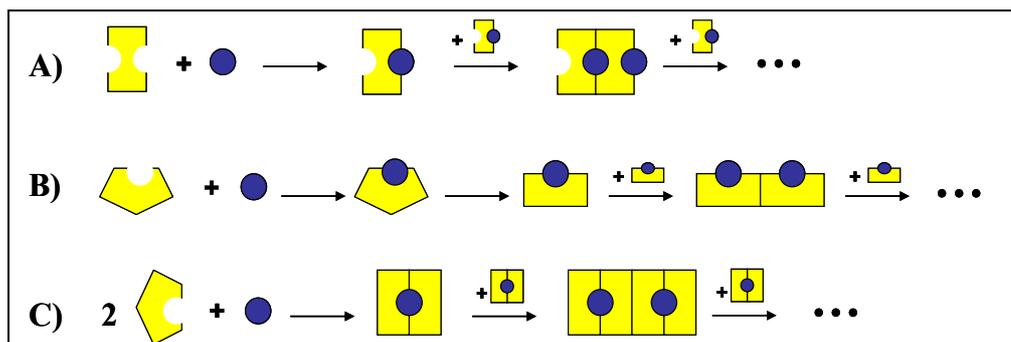


Figure 4.6. Mécanismes possibles d'agrégation de l'Aβ40

Ici, la question est de savoir si la liaison du métal au peptide peut induire la formation de dimères. Identifier le passage par un dimère dans le processus d'agrégation est d'une grande importance :

(i) Cela expliquerait en partie pourquoi les métaux peuvent accélérer l'agrégation. L'étape « lente » du mécanisme d'agrégation est la formation des premiers agrégats et notamment des dimères d'Aβ. En favorisant la formation des dimères (Schmechel *et al.*, 2003), ils accéléreraient donc le processus.

(ii) Cela pourrait expliquer pourquoi des quantités sous stœchiométriques de métaux par rapport à l'Aβ ont été trouvées dans les plaques séniles. (Huang *et al.*, 2004). (mécanisme C de la figure 4.6)

(iii) La dimérisation de peptides ou protéines induite par les métaux est un comportement souvent constaté et peut être directement relié à leur fonction (Hopfner *et al.*, 2002; Frankel *et al.*, 1988 ; Ciuculescu *et al.*, 2005).

(iv) Un dimère d'Aβ a été isolé dans un cerveau humain et sa toxicité prouvée (Klein *et al.*, 2004).

(v) Une autre étude, basée sur des mesures RPE à basse température, suggère que le Cu^{II} lie le peptide Aβ en formant un complexe dimérique de type Cu^{II}₂-Aβ₂ (Cutain *et al.*, 2001).

II.1 Chromatographie d'exclusion stérique (CES)

La chromatographie d'exclusion stérique (CES) permet de séparer les molécules en se basant sur le rayon hydrodynamique (R_h), qui dépend à la fois de la masse molaire M_r mais aussi de la structure. Elle a été utilisée pour évaluer l'effet de la liaison avec le Cu^{II} sur le R_h des peptides Aβ40/42 et des formes tronquées Aβ16 et Aβ28. La formation d'un dimère (ou trimère) devrait donc modifier le temps d'éluion sur la CES.

II.1.a $A\beta_{16, 28}$ et 40

Les expériences de CES montrent un seul pic significatif de bas poids moléculaire pour les complexes Cu^{II} - $A\beta$ des différents peptides $A\beta_{16, 28, 40}$ (figure 4.7) avec des volumes d'élution similaires aux apo-peptides.

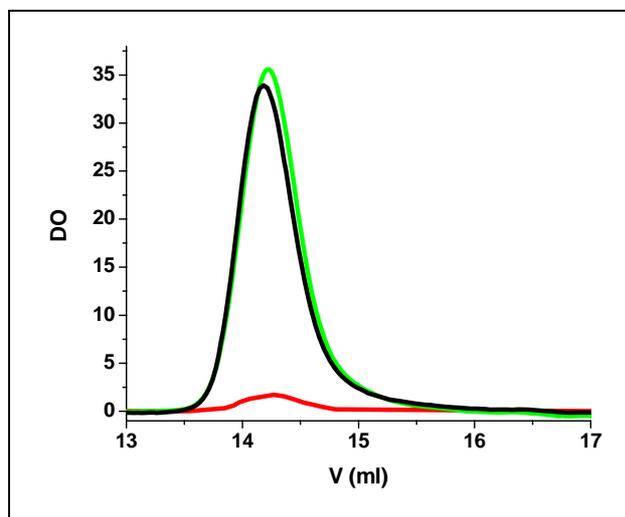


Figure 4.7. Chromatographie d'exclusion stérique de apo $A\beta_{28}$ (courbe noire) et Cu^{II} - $A\beta_{28}$ (courbe verte) basée sur l'absorption à 280 nm. La courbe rouge est l'absorption à 600 nm, caractéristique de la bande $d-d$ du cuivre, pour Cu^{II} - $A\beta_{28}$.

Les apo- $A\beta$ et les complexes Cu^{II} - $A\beta$ éluent sous la forme d'un seul pic avec un temps d'élution correspondant à celui d'une molécule de bas poids moléculaire. L'analyse par CES des apo- $A\beta$, contrairement aux complexes de cuivre correspondants, sont décrits dans la littérature. En déduisant la masse molaire par comparaison avec la masse molaire de protéines de calibration, la plupart des auteurs ont conclu que l'apo- $A\beta$ se trouve sous une forme dimérique (Garzon-Rodriguez *et al.*, 1997). Mais cette interprétation de la CES n'est pas tout à fait juste.

Normalement, la masse des protéines passées sur CES est déduite par un calibrage de la colonne avec des protéines de masse connue. En se basant sur une telle calibration, les peptides $A\beta$ et les complexes Cu^{II} - $A\beta$ correspondent à des masses molaires apparentes deux à trois fois plus élevées que les valeurs réelles, d'où une interprétation que l'apo- $A\beta$ est sous forme de dimères (ou trimères). Mais les protéines de calibration ont une structure globulaire et compacte, contrairement au peptide $A\beta$ qui est principalement « random coil ». Or, la CES permet de séparer les molécules en se basant sur le rayon hydrodynamique R_h , qui dépend à la fois de la masse molaire M_r mais aussi de la structure. En général, les protéines globulaires présentent un R_h 2 à 4 fois supérieure à ce

qui est attendu pour les protéines dénaturées. Pour démontrer l'importance de la forme et de la structure sur le temps d'élution, nous avons passé des oligonucléotides, connus pour avoir une forme allongée, sur la colonne dans nos conditions expérimentales (tampon, pH, température). Ils sortent beaucoup plus tôt que ce qui est attendu pour une molécule globulaire compacte de même masse (figure 4.8). Nos études en RMN n'ont pas montré de structuration particulière du peptide en présence du cuivre. En effet, l'ajout d'une solution de cuivre sur l'A β n'a pas provoqué de modifications importantes sur les déplacements chimiques en RMN ^1H des acides aminés de la séquence. Ainsi, il est donc normal que la CES surestime la masse de l'A β moléculaire, si on la compare avec des molécules de calibrage globulaires et compactes.

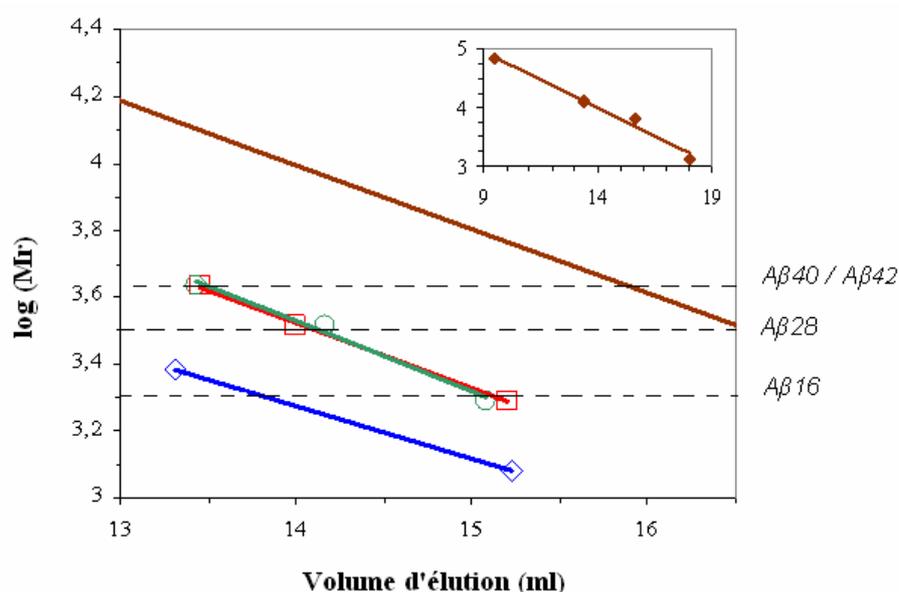


Figure 4.8. Chromatographie d'exclusion stérique d'A β (\square) et du complexe de Cu II (\circ), des protéines globulaires (marron) et des oligonucléotides (de 6 et 12 bases) (\diamond). Dans un tampon HEPES 20 mM, 100 mM NaCl, à pH 7,4.

Ce phénomène avait déjà été mis en évidence sur le peptide apo-A β . Danielsson *et al.* ont montré que les apo-A β 28 et apo-A β 40 étaient monomériques et possédaient un comportement similaire à des protéines dénaturées. Ils ont développé une formule empirique suivante $R_h \text{ (nm)} = 0.027 M_r^{0.5}$ qui donne une excellente simulation pour les peptides non structurés. Il s'agit en fait d'une modification de la formule empirique développée pour les protéines fortement dénaturées : $R_h = 2.21 N^{0.57}$ où N désigne le nombre d'acides aminés et R_h est en Å (Wilkins *et al.*, 1999).

Ces formules ont été appliquées à nos mesures de R_h par CES. Les R_h des apo-A β et des complexes Cu^{II}-A β ont été déterminés à partir des volumes d'éluion après calibration de la colonne avec des molécules dont on connaît le rayon hydrodynamique.

A β	R _h calculé à partir de la M _r (Danielsson <i>et al.</i> , 2002)		R _h expérimental déduit de la CES	
	monomère	dimère	apo	Cu
16	11.9	16.9	13.7	14.0
28	15.4	21.8	16.9	16.4
40	17.8	25.2	18.5	18.6
42	18.1	25.7	18.5	18.6

Tableau 4.1. Rayon hydrodynamique des apo-peptides et des complexes de cuivre correspondants. Les erreurs expérimentales des valeurs déduites de la CES sont inférieures à 0,1 mm.

Les expériences RMN ont montré que le complexe avec les métaux est non structuré. Dans le cas de la formation d'un dimère une structuration serait attendue, or il n'y a pas de shifts importants des déplacements chimiques lors de la fixation du métal. En tenant compte du fait que les peptides sont principalement non structurés et en appliquant une formule empirique pour les peptides non structurés, on trouve un R_h typique pour un monomère pour les divers apo-A β et les complexes de cuivre correspondants (tableau 4.1).

Les complexes Cu^{II}_{0.5}-A β , Cu^{II}₁-A β et Cu^{II}₂-A β (c'est à dire avec 0,5, 1 et 2 équivalents de cuivre par A β , respectivement) éluent à la même position que les formes apo correspondantes qui ont été traitées de manière à être sous forme de monomères. Tous ces complexes doivent donc avoir le même R_h . Il ne semble pas y avoir d'effet de la fixation du cuivre sur le R_h entre 0,5 et 2 équivalents quelque soit le peptide A β . Les R_h des peptides A β 16/28/40/42 avec ou sans cuivre sont typiques d'un monomère.

Les analyses des fractions ont montré que le cuivre était bien lié quantitativement. La quantité de cuivre a été déterminée en se basant sur la bande d'absorption à 600 nm ($\epsilon = 60 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et par un test colorimétrique avec la bathocupréine (Poillon et Dawson, 1963). Dans les deux cas, la totalité du cuivre a été retrouvé.

Les chromatographies d'exclusion stérique avec les apo-A β 16/28/40 et les complexes Cu^{II}-A β 16/28/40 éluent presque quantitativement sous un seul pic monomérique (à 50 μ M). Aucun autre pic n'a été observé. Environ 90 % du peptide injecté sur la colonne est récupéré dans ce pic ; les 10 % restants correspondent à une perte normale de matériel pour la CES. La formation d'agrégats qui ne passeraient pas sur la colonne est donc exclue. Cela suggère qu'une seule espèce est formée majoritairement. Il n'y a donc pas de dimère, ni trimère, ni autre oligomère stable observé.

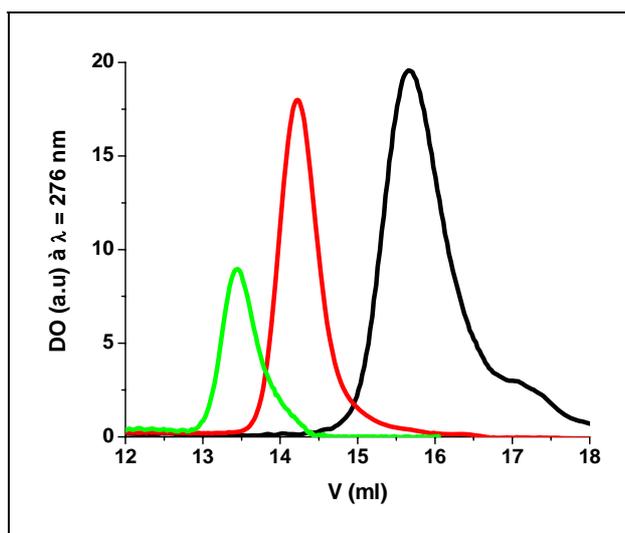


Figure 4.9. Chromatographie d'exclusion stérique des peptides A β 16,28 (100 μ M) et A β 40 (50 μ M) en présence de 1 équivalent de Cu^{II}. Hepes 20 mM, NaCl 100 mM pH 7,4. La quasi totalité (80 à 90 %) des complexes Cu^{II}-A β est sous forme de monomères. La courbe noire représente le chromatogramme pour l'A β 16, la rouge pour l'A β 28 et la verte pour l'A β 40.

Des essais, pour le complexe Cu^{II}-A β 40 avec une concentration à 100 μ M, n'ont cependant pas permis de récupérer, en sortie de colonne, 90% de peptides introduits initialement et qui sont attendus. Cela suggère qu'il y a formation d'agrégats trop grands pour entrer dans la colonne et qui restent bloqués sur le filtre. A ces concentrations élevées, il existe à la fois des agrégats et le monomère. L'échantillon est donc en cours d'agrégation. Même dans ce cas, aucun autre pic significatif, correspondant à un dimère ou à un autre oligomère, n'est observé. Il semble donc que le cuivre se fixe à l'A β 40 et forme un complexe monomérique métastable. Après l'agrégation se déclenche mais il n'y a pas formation d'un intermédiaire assez stable pour être isolé et observé.

Il est intéressant de noter qu'aucun signe de dimérisation n'a été observé même avec 0,5 équivalent de Cu^{II}, qui est une condition favorable pour la formation de dimère avec un métal pontant (figure 4.6.C). Cela indique que les complexes Cu^{II}- A β n'ont pas

tendance à former de dimères stables, même si le ligand est en excès. Ceci est important en biologie car :

(i) les ions métalliques sont supposés être en sous stœchiométrie dans les plaques amyloïdes.

(ii) Il a été montré que des traces de métaux suffisent à induire l'agrégation (Cuajungco *et al.*, 2005) et nous l'avons confirmé au paragraphe I. de ce chapitre.

Il ne semble pas y avoir de tendance à faire des métaux pontants. Cela est plutôt en faveur d'une agrégation via des interactions peptide-peptide et non via un métal pontant (figure 4.6).

II.1.b $A\beta_{42}$

Des expériences de CES avec des concentrations moins élevées de Cu^{II} - $A\beta_{42}$ ($10\mu M$) ont également été réalisées.

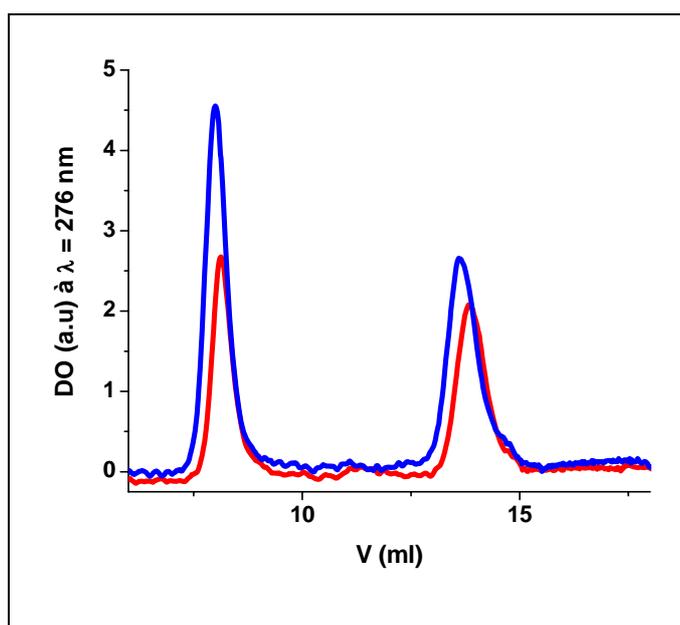


Figure 4.10. Chromatographie d'exclusion stérique de Cu^{II} ₁- $A\beta_{42}$, courbe rouge, et Cu^{II} ₂- $A\beta_{42}$, courbe bleue. La concentration en peptide est de $10\mu M$, dans un tampon Hepes 20 mM, NaCl 100 mM à pH 7,4.

La quantification par CES indique que le complexe Cu^{II} - $A\beta_{42}$ est partiellement agrégé dès $10\mu M$. Elle montre deux pics significatifs. De plus une partie du peptide (environ 50% de la quantité injectée) n'est pas récupérée en sortie de colonne. Cela signifie qu'au moins 3 espèces ont été générées :

(i) Le second pic (volume d'éluion de 13,5 ml) correspond à la masse de l'Aβ42 sous forme monomérique. Les analyses ont confirmé la présence de cuivre. Le complexe Cu^{II}-Aβ42 monomérique est donc formé transitoirement et il est assez stable pour être isolé.

(ii) Une fraction élue dans le volume mort, à 8 ml. Elle correspond à une masse supérieure à 75 kDa. Les analyses ont montré qu'il y avait aussi du cuivre dans cette fraction. Un tel pic a été décrit dans la littérature pour l'apo-Aβ40 et a été attribué à des protofibrilles. (Walsh *et al.*, 1997).

(iii) La fraction de peptide qui ne passe pas sur la colonne. On ne connaît donc pas la masse exacte mais il est raisonnable de penser qu'il s'agit d'un mélange d'agrégats de taille importante.

Le chromatogramme ne montre pas de pic significatif intermédiaire entre celui qui sort à 8 ml (oligomère) et celui à 13,5 ml (monomère) et qui correspondrait à la formation d'un dimère, trimère stable. Il est cependant clair que l'agrégation doit passer par la formation d'un dimère en l'absence ou en présence de métaux. Cependant, il est doit être instable et les agrégats se forment rapidement ensuite. La liaison avec le cuivre ne favorise pas la stabilisation de dimères même sous des conditions favorables. Il semble que la présence du cuivre n'influence pas l'Aβ40 et l'Aβ42 pour la formation de dimère. Cette observation est en faveur d'un mécanisme passant par un changement de conformation (figure 4.6.B) plutôt que par celui passant par un métal pontant (figure 4.6.A).

Ces observations peuvent être expliquées par la figure 4.11. Le cuivre forme immédiatement avec le peptide Aβ42 un complexe monomérique. Ce complexe Cu^{II}-Aβ42 est métastable. Il est donc stable pendant un temps assez long pour être observé avant de s'agréger. Cette agrégation passe par une formation d'un dimère, selon un processus faisant intervenir un changement de conformation du peptide. C'est l'étape limitante du mécanisme d'agrégation, car ensuite l'agrégation continue très rapidement. Le dimère évolue rapidement en oligomères (de masse supérieure à 75 kDa – qui correspondrait à des « vingt-mères » voire plus -) qui eux même donnent des agrégats de plus grandes tailles.

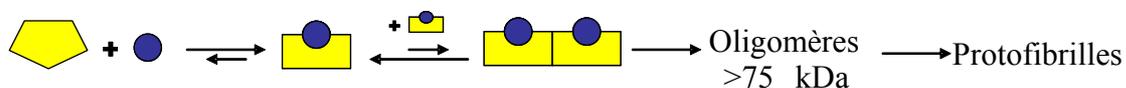


Figure 4.11. Processus d'agrégation du peptide Aβ42

II.2 Gel d'électrophorèse

La chromatographie d'exclusion stérique a permis de mettre en lumière la formation rapide d'oligomères avec le peptide A β 42 en présence de cuivre. Nous avons essayé de le confirmer par d'autres méthodes.

L'électrophorèse est une technique biochimique de séparation fondée sur le fait que des molécules portant des charges électriques différentes migrent à des vitesses différentes lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique. L'électrophorèse est réalisée sur gel de polyacrylamide.

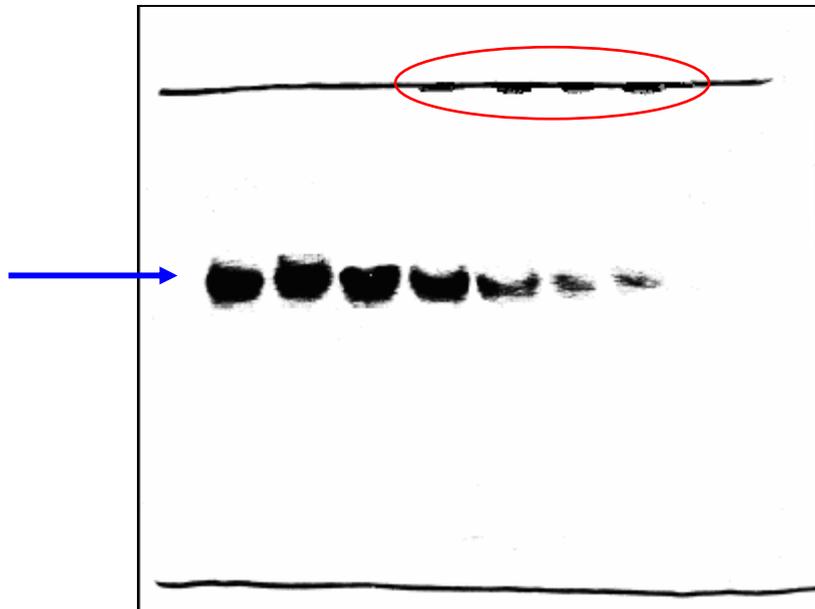


Figure 4.12. Gel d'électrophorèse. De droite à gauche, on visualise la migration des solutions de A β 42 en présence de 1 équivalent de cuivre incubées à 37°C pendant 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 et 180 minutes. Seul le monomère de A β semble migrer. Les oligomères ou agrégats, de plus grande taille, semblent rester dans les puits (cerclés en rouge) où sont déposées les solutions.

La figure 4.12 représente le gel d'électrophorèse obtenu avec le peptide A β 42 incubé avec du cuivre pendant des laps de temps différents (de 0 à 180 min.). Dans nos conditions, une seule trace (bien nette indiquée par la flèche bleue) est observable. Elle correspond probablement au monomère. Cette attribution au monomère est basée sur des expériences avec Cu^{II}-A β 40, fraîchement préparé. La trace de Cu^{II}-A β 42 apparaît dans la même zone que celle de Cu^{II}-A β 40. Or dans nos conditions, le complexe Cu^{II}-A β 40 est principalement sous forme monomérique. La trace observée sur la figure 4.12 correspondrait donc au complexe Cu^{II}-A β 42 monomérique qui avait été isolé en CES

(chapitre II.1). Lui seul semble migrer. Il n'y a pas de traces correspondant à des oligomères. On note cependant une accumulation au niveau des puits où sont déposés les échantillons qui semble indiquer que les oligomères et/ou les agrégats ne pénètrent pas dans le gel.

Plus le mélange est incubé, et moins la trace sur le gel est intense (figure 4.12). Inversement, l'intensité de la trace au niveau de puits de déposition augmente. Cela indique que la quantité de monomère diminue et celle d'agrégats augmente. C'est le processus logique de l'agrégation. L'électrophorèse confirme que le complexe Cu^{II} -A β 42 est formé transitoirement puis évolue ensuite en oligomères et/ou agrégats.

Cependant aucun autre intermédiaire du mécanisme n'a pu être mis en évidence par cette méthode. Les oligomères, isolés en CES, doivent eux aussi rester au niveau des puits de déposition.

III. Nature des agrégats

Nous avons vu dans l'introduction (chapitre 1.) que 2 types d'agrégats pouvaient être formés : les agrégats amorphes et des agrégats organisés. Seuls les agrégats organisés seraient toxiques, il est donc important de savoir si les métaux influencent l'agrégation du peptide dans cette voie.

Une méthode largement utilisée pour caractériser certains dépôts amyloïdes est l'utilisation de la Thioflavine-T (Th-T) en fluorescence (figure 4.13). Ce composé interagit spécifiquement avec la structure en feuillet- β commune aux structures amyloïdes. Il n'y a pas d'interaction de la Th-T avec les agrégats amorphes (Levine, 1993). Le mécanisme n'est cependant pas totalement compris. L'interaction des fibres formées à partir de solutions de peptide A β 42 incubées à 37 °C avec du zinc ou du cuivre a donc été évaluée par le test à la Th-T.

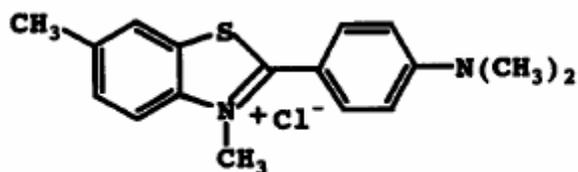


Figure 4.13. La Thioflavine-T

Différentes solutions de peptide A β 42 (50 μ M) ont été incubées à 37 °C pendant une journée dans les conditions suivantes : apo-A β 42, A β 42 + 1 équivalent de Zn^{II}, A β 42 + 1 équivalent de Cu^{II}, A β 42 + 2 équivalents de Cu^{II}. Des ajouts successifs de ces solutions ont ensuite été réalisées sur une solution de Th-T à 5 μ M. Le spectre caractéristique de fluorescence de la Th-T avec un pic d'émission à 484 nm est obtenu avec une excitation à 435 nm. (figure 4.14). L'intensité du signal de fluorescence augmente linéairement avec la quantité de A β incubés introduite (5 μ l), quelque soit l'échantillon. Cela signifie, que des protofibrilles ou des fibres organisées sont formées pour tous les échantillons. L'augmentation de l'intensité du signal n'est cependant pas tout à fait la même. L'ordre observé pour les échantillons incubés est le suivant Zn^{II}-A β 42 > Cu^{II}₂-A β 42 ~ Apo-A β 42 > Cu^{II}₁-A β 42 > Apo-A β 42 + deferroxamine. On ne peut toutefois relier exactement la quantité de fibres formées et l'augmentation du signal de fluorescence. C'est un résultat qualitatif et non quantitatif.

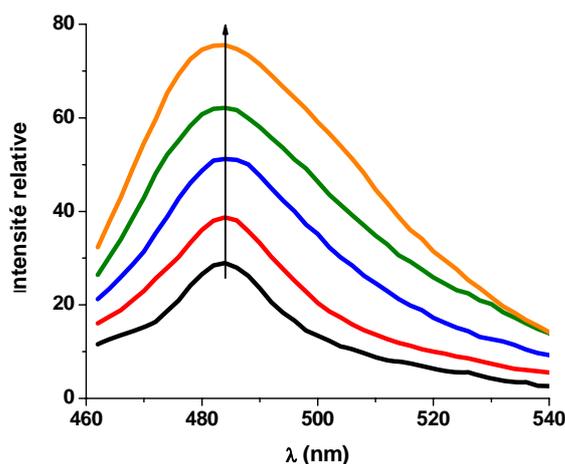


Figure 4.14. Mise en évidence de la formation de fibres en fluorescence sur une solution de A β 42 + 1 équivalent de cuivre incubée à 37 °C. A chaque ajout de solution de A β 42 incubée le signal augmente.

Il est intéressant de noter que pour tous les échantillons, la même structure est obtenue pour les agrégats. Ils interagissent avec la Th-T, donc tous possèdent des feuilletts beta, nécessaire pour l'interaction. Par ailleurs, ils sont tous potentiellement toxiques puisque ce sont des agrégats organisés.

Une autre technique pour caractériser les fibres est l'utilisation du Rouge Congo.

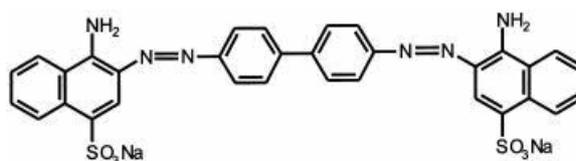


Figure 4.15. Le Rouge Congo

Il est capable de reconnaître les fibres bien formées et d'interagir avec elles. Une bande caractéristique apparaît alors en spectroscopie UV-Visible autour de 580 nm. Son mécanisme d'action n'est pas encore bien déterminé. Il semble en fait exister une grande variété des modes de fixation car il interagit avec de nombreuses architectures de type amyloïde. Plusieurs propositions ont été émises : intercalation entre les feuillets beta (Glenner *et al.*, 1972), liaison avec des feuillets- β antiparallèles. Les agrégats, même des architectures telles que les protofibrilles n'interagissent pas avec le Rouge Congo.

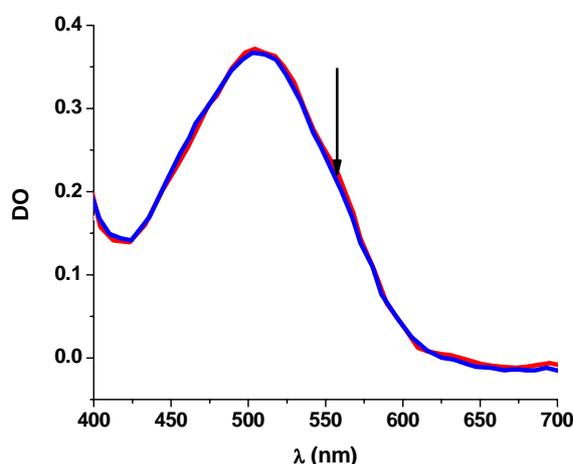


Figure 4.16. Détection de la formation de fibres en spectroscopie UV-Visible avec le Rouge Congo. La courbe bleue représente la solution de Rouge Congo (10 μ M) seule. L'ajout d'une solution de A β 42 incubée une journée est représentée par la courbe rouge. Aucune bande d'absorption n'apparaît à 580 nm.

L'ajout de nos différents échantillons incubés une journée (apo-A β 42, Cu^{II}-A β 42, Cu^{II}₂-A β 42, Zn^{II}-A β 42) à 37°C sous agitation a été réalisée sur une solution de Rouge Congo. Les résultats ont été les mêmes pour toutes les solutions et sont représentés par la figure 4.16. Lorsque les solutions de A β 42 sont ajoutées, le spectre n'est pas modifié. Aucune bande d'absorption n'apparaît autour de 580 nm. Il n'y a donc pas d'interaction entre le Rouge Congo et les agrégats formés.

Les expériences en Thioflavine-T ont prouvé la présence de structure fibrillaire. Cependant elles ne sont sans doute pas assez matures et il n'y a pas d'interaction avec le Rouge Congo. Cela expliquerait pourquoi le test au Rouge Congo s'avère négatif. En

effet, après une journée d'incubation, il n'y a presque plus de peptide sous forme monomère mais le processus qui conduit jusqu'à des fibres matures n'est pas terminé. Même la solution de Zn^{II} -A β 42 a donné des résultats négatifs, or nous avons vu que c'est dans ces conditions d'incubation que la cinétique d'agrégation est la plus rapide, il n'est donc pas étonnant que les autres solutions ne donnent aucun résultat non plus. Les solutions contiennent donc au moins partiellement des agrégats structurés en feuillet beta (détectés avec la Th-T) mais pas encore de fibres à proprement parlé. Ils doivent être au stade protofibrillaire. Il serait donc intéressant, dans le futur, de réaliser des expériences similaires et d'analyser ces échantillons par des techniques de microscopie, comme le MEB (microscope électronique à balayage) ou l'AFM (microscope à force atomique). Cela permettrait sans doute d'observer des différences.

IV. Conclusion

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre de l'élucidation des différents stades de l'agrégation du peptide A β 42 en présence du cuivre. Cette étude est particulièrement intéressante puisque si les différentes étapes étaient parfaitement isolées, la toxicité des formes correspondantes pourrait alors être testée. La ou les formes toxiques pourraient être ainsi déterminées. La recherche pourrait ensuite se consacrer à un médicament empêchant la formation de ces formes et/ou permettant de les éliminer.

Même si toutes les étapes du mécanisme n'ont pu être identifiées, nous avons mis en évidence certains intermédiaires du processus (monomère, oligomères avec le A β 42) permettant de proposer un mécanisme.

Dans un premier temps, l'A β et le cuivre forment un complexe monomérique qui évolue ensuite certainement en dimère (que nous n'avons pu isoler) puis en oligomères qui ont été observées par CES. Ces oligomères évoluent ensuite en agrégats qui ont une structure en feuillet beta. Une partie de ces travaux ont fait l'objet d'une communication qui a été acceptée par *ChemBioChem*. Elle figure dans les annexes à la fin du manuscrit. Il reste cependant encore beaucoup de choses à élucider sur le mécanisme d'agrégation de l'A β induite par les métaux

Par ailleurs, nous avons vu au chapitre précédent que les formes qui produisaient le plus de HO \cdot étaient celles avec A β 42 et notamment celles qui interviennent dans les premiers stades de l'agrégation.

Il est raisonnable de supposer que les intermédiaires de masse supérieure à 75kDa isolées en CES et trouvés uniquement avec A β 42, pourraient être la forme responsable pour la production accrue de HO \cdot . Plusieurs arguments vont dans ce sens :

- (i) Ces intermédiaires ne sont pas observés avec l'A β 40. Or, la production d'HO \cdot pour le complexe de cuivre formé avec A β 42 est bien supérieure à Cu^{II}-A β 40.
- (ii) Ces intermédiaires sont surtout présents au début de l'agrégation et il a été observé que la production de HO \cdot diminue en fonction de l'avancement de l'agrégation.

Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait réaliser des analyses couplées entre la réactivité et la CES.

Une méthode intéressante pour essayer d'isoler des intermédiaires de l'agrégation serait de partir des agrégats et d'essayer de les solubiliser. L'agrégation du peptide monomère jusqu'aux fibres est une réaction favorable, il est donc difficile d'isoler des états intermédiaires stables ou métastables. En revanche, en partant des agrégats et en essayant de les dissoudre en peptide soluble, le processus est défavorable. Il sera donc peut être plus aisé de trouver des intermédiaires métastables. L'utilisation de stabilisateurs d'espèces oligomériques de bas poids moléculaires pourrait aussi s'avérer intéressante (Ferrao-Gonzales *et al.*, 2005)

Les ions métalliques cuivre et zinc ont un effet cinétique sur l'agrégation. Ils accélèrent le processus. La disparition du monomère et l'apparition d'oligomères sont plus rapides en présence de métaux. Les agrégats obtenus en présence de métaux sont structurés en feuillet bêta (comme l'a montré le test avec la Th-T). Pour quantifier l'accélération, il serait intéressant de recommencer en prenant des temps d'incubation plus importants (au moins une semaine) pour essayer d'obtenir des fibres matures. L'analyse serait alors peut être positive avec le Rouge Congo. Par ailleurs, des différences seraient probablement observables au microscope électronique. La taille des fibres ne devraient pas être les mêmes.

V. Bibliographie

- Atwood, C.S., Moir, R.D., Huang, X., Scarpa, R.C., Bacarra, N.M.E., Romano, D.M., Hartshorn, M.A., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1998) Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J. Biol. Chem.* **273**: 12817-12826.
- Bush, A.I., Pettingell, W.H., d Paradis, M., and Tanzi, R.E. (1994a) Modulation of A β adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *J. Biol. Chem.* **269**: 12152-12158.
- Bush, A.I., Pettingell, W.H., Multhaup, G., d Paradis, M., Vonsattel, J.-P., Gusella, J.F., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Tanzi, R.E. (1994b) Rapid induction of Alzheimer A β amyloid formation by zinc. *Science* **265**: 1464-1467.
- Ciuculescu, E.D., Mekmouche, Y. and Faller, P. (2005) Metal-binding properties of the peptide APP170-188: A model of the Zn^{II}-Binding Site of Amyloid Precursor Protein (APP) *Chem.Eur.J.* **11**: 903-909.
- Cuajungco, M.P., Frederickson, C.J., and Bush, A.I. (2005) Amyloid- β metal interaction and metal chelation. *Sub-Cellular Biochem.* **38**: 235-254.
- Curtain, C.C., Ali, F., Volitakis, I., Cherny, R.A., Norton, R.S., Beyreuther, K., Barrow, C.J., Masters, C.L., Bush, A.I., Barnham, K.J. (2001) Alzheimer's Disease Amyloid- β Binds Copper and Zinc to Generate an Allosterically Ordered Membrane-penetrating Structure Containing Superoxide Dismutase-like Subunits *J. Biol. Chem.* **276**: 20466-73.
- Dumoulin, M., and Dobson C.M. (2004) Probing the origins, diagnosis and treatment of amyloid diseases using antibodies) *Biochimie* **86**: 589-600.
- Ferrão-Gonzales, A.D., Robbs, B.K., Moreau, V.H, Ferreira, A., Juliano, L., Valente, A.P., Almeida, F.C. L., Silva, J. L., and Foguel, D. (2005) Controlling β -Amyloid Oligomerization by the Use of Naphthalene Sulfonates: TRAPPING LOW MOLECULAR WEIGHT OLIGOMERIC SPECIES. *J. Biol. Chem.* **280**: 34747-34754.
- Frankel, A.D., Bredt, D.S., Pabo, C.O., (1988) Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science* **240**: 70-73.
- Glenner, G.G., Eanes, E.D and Page, D.L. (1972) The relation of the properties of Congo Red-stained amyloid fibrils to the β -conformation. *J. Histochem. Cytochem.* **20**: 821-826.
- Hardy, J., Selkoe, D.J. (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* **297**: 353-356.
- Hopfner, K.P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R.A., Usui, T., Owen B.A., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J.L., McMurray, C.T., Carney, J.P., Petrini, J.H., Tainer J.A. (2002) The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* **418**, 562-566.
- Huang, X., Atwood, C.S., Moir, R.D., Hartshorn, M.A., Vonsattel, J.-P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1997) Zinc-induced Alzheimer's A β 1-40 aggregation is mediated by conformational factors. *J. Biol. Chem.* **272**: 26464-26470.

- Huang X., Atwood, C.S., Moir, R.D., Hartshorn, M.A., Tanzi, R.E., and Bush A.I. (2004) Trace metal contamination initiates the apparent auto-aggregation, amyloidosis, and oligomerization of Alzheimer's A β peptides. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9** : 954-960.
- Karr, J.W., Akintoye, H., Kaupp, L.J., and Szalai, V.A. (2005) N-terminal deletions modify the Cu²⁺ binding site in amyloid- β . *Biochemistry* **44**: 5478-5487.
- Klein, W.L., Stine, W.B.Jr., and Teplow, D.B. (2004) Small assemblies of unmodified amyloid β -protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **25**: 569-580.
- Levine, H. (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease {beta}-amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **2**: 404-410.
- Miura, T., Suzuki, K., Kohata, N., and Takeuchi, H. (2000) Metal binding modes of Alzheimer's amyloid β -peptide in insoluble aggregates and soluble complexes. *Biochemistry* **39**: 7024-7031.
- O' Nuallain, B., Shivaprasad, S., Kheterpal, I., and Wetzel, R. (2005) Thermodynamics of A β (1-40) Amyloid Fibril Elongation. *Biochemistry* **44**: 12709-12718.
- Poillon, W.N. and Dawson, C.R. (1963) On the nature of copper in ascorbate oxidase : I. The valence state of copper in the denatured and native enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **77**: 27-36.
- Raman, B., Ban, T., Yamaguchi, K., Sakai, M., Kawai, T., Naiki, H., and Goto, Y. (2005) Metal Ion-dependent Effects of Clioquinol on the Fibril Growth of an Amyloid- β Peptide. *J. Biol. Chem.* **280**: 16157-16162.
- Schmechel, A., Zentgraf, H., Scheuermann, S., Fritz, G., Pipkorn, R., Reed, J., Beyreuther, K., Bayer, T.A., Multhaup, G. (2003) Alzheimer β -Amyloid Homodimers Facilitate A β Fibrillization and the Generation of Conformational Antibodies. *J. Biol. Chem.* **278**: 35317-35324.
- Selkoe, D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **81**: 741-766.
- Tycko, R. (2003) Insights into the Amyloid Folding Problem from Solid-State NMR. *Biochemistry*, **42**: 3151-3159.
- Walsh, D.M., Hartley, D.M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Selkoe, D.J., and Teplow, D.B. (1999) Amyloid β -Protein Fibrillogenesis. STRUCTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF PROTOFIBRILLAR INTERMEDIATES. *J. Biol. Chem.* **274**: 25945 – 25952.
- Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M., and Teplow, D.B. (1997) Amyloid β -Protein Fibrillogenesis. DETECTION OF A PROTOFIBRILLAR INTERMEDIATE. *J. Biol. Chem.* **272**: 22364-22372.
- Wilkins, D.K., Grimshaw, S.B., Receveur, V., Dobson, C.M., Jones, J.A., and Smith, L.J. (1999) Hydrodynamic Radii of Native and Denatured Proteins Measured by Pulse Field Gradient NMR Techniques. *Biochemistry* **38**: 16424-16431.
- Zou, J., Kajita, K., and Sugimoto, N. (2001) Cu²⁺ Inhibits the Aggregation of Amyloid β -Peptide (1-42) in vitro. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**: 2274-2777.

Matériels et Méthodes

I. Préparation des échantillons.

I.1 Solutions de peptides

I.1.a Peptides A β

Les peptides A β 16, A β 28, A β 40, A β 42, A β 25-35 ont soit été synthétisés par processus standard Fmoc et purifiés par HPLC avec une colonne C8 par Honoré Mazarguil (IPBS) soit achetés à EZBiolab (Westfield, IN, USA), Geneshere Biotechnologies (Paris, France) ou Activotec (Cambridge, UK). L'ESI-MS de A β 16, A β 28, A β 40, A β 42 montre des masses, pour les espèces monochargées, correspondantes aux masses calculées à moins de 0,3 unités près.

Les solutions stocks de peptides sont préparées en dissolvant les peptides dans l'eau ou directement dans le tampon de travail à pH 9-10 pour faciliter leur dissolution et s'assurer qu'ils sont sous forme monomérique. Le pH est ensuite ajusté. Les solutions sont conservées à -20 °C. Dans ces conditions, elles sont stables plusieurs semaines. Les spectres RMN ¹H des peptides A β 16, A β 28, A β 40 ont montré qu'il n'y avait aucune dégradation ni agrégation des peptides dans ce laps de temps.

La concentration des peptides est déterminée par spectroscopie d'absorption UV-Vis en utilisant le coefficient d'absorption de la Tyr à $\lambda = 276$ nm, $\epsilon = 1410$ cm.M⁻¹ (Gill et Von Hippel, 1989). La structure des peptides est principalement "random coil" et la Tyr10 se comporte donc comme une Tyr libre. Il est donc raisonnable de considérer qu'elle a le même coefficient d'absorption molaire qu'une Tyr libre. A partir de la Loi de Beer-Lambert, $A = \epsilon.l.c$ ($l = 1$ cm dans notre cas), un simple spectre permet de déduire la concentration du peptide.

I.1.b Autres peptides

Solution des acides aminés L-Glycine et Histidine

La L-Glycine et l'Histidine sont des produits commerciaux de chez Bachem. Les solutions stock sont préparées par dissolution de la masse adéquate d'acide aminé dans le

tampon de travail pour obtenir une concentration finale 0,1 M. Elles sont ensuite conservées à - 20 °C.

Ces acides aminés sont utilisés pour des expériences de compétition suivie en spectroscopie de fluorescence dans le but de déterminer les constantes d'affinité des peptides A β pour le cuivre.

Solution de peptides GHK/ DAHK

Les peptides GHK (séquence Gly-His-Lys) et DAHK (séquence Asp-Ala-His-Lys) sont des produits commerciaux de chez Bachem. Les solutions stock sont préparées par dissolution de la masse adéquate de peptide dans le tampon de travail pour obtenir une concentration finale 0,1 M. Elles sont ensuite conservées à - 20 °C.

Ces deux peptides ont été utilisés pour comparer la production des radicaux hydroxydes des complexes Cu^{II}-A β .

I.2 Solutions de métaux

Les solutions de métaux (CuCl₂·2H₂O et ZnCl₂·2H₂O) sont préparées à 10 mM (pesée de la masse nécessaire CuCl₂·2H₂O et ZnCl₂·2H₂O. en milieu acide (HCl, 10 mM) pour éviter de former des précipités hydroxydes Cu(OH)₂ et Zn(OH)₂. Les solutions stocks sont conservées à - 20 °C.

I.3 Autres solutions

Traitement au Chelex

La résine Chelex 100 est un produit commercial de Biorad. Elle est lavée au moins trois fois avec le tampon de travail avant utilisation (pour ajuster le pH de la solution de chelex).

Solution d'azide:

La solution stock d'azoture de sodium (communément appelé azide) est préparée à 1 M dans l'eau puis conservée à 4°C. A partir de cette solution stock, des aliquots sont ajoutés aux solutions de Cu^{II}-A β dans un tampon 50 mM Hepes, pH = 7,4 , 100 mM NaCl jusqu'à un large excès (200 fois). L'azide a une très faible affinité pour le Cu^{II} (K_a ~ 10² M⁻¹) et n'est pas capable d'arracher le Cu fixé par les peptides qui ont une affinité beaucoup plus grande (K_a ~

10^7 M^{-1} ou $K_a \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ suivant le site de fixation). Cependant il est capable de substituer un ligand en position axial (le cuivre adoptant en général une conformation carrée plane). La liaison de l'azote au cuivre (liaison $\text{N}_3\text{-Cu}$) possède une bande d'absorption caractéristique visible en spectroscopie UV-Vis à 373 nm ($\epsilon \sim 2700 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). (Fee et Gaber, 1972)

Solution de Deferroxamine

La deferroxamine (ou desferral) est un produit commercial de chez Sigma. Les solutions stock sont préparées en diluant la masse appropriée de poudre dans un tampon phosphate 20 mM NaCl 100 mM à pH 7,4 puis conservée à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Le desferral chélate les traces de cuivre, fer et zinc présente dans nos tampons. Ces traces de Fe^{III} et Cu^{II} pourraient être réduites et générer des radicaux HO^\bullet (Dikalov *et al.*, 1999; Turnbull *et al.*, 2001). Le desferral permet l'observation des seuls HO^\bullet générés par le cuivre introduits en solutions et lié aux peptides.

Solution de POBN

Le POBN (ou α -4-pyridyl-1-oxyde-N-terbutylnitron) est un produit commercial de chez Sigma. La solution de POBN est préparée par dilution dans le tampon adéquat peu de temps avant utilisation. La concentration de ce « spin trap » est 1000 fois supérieure à celle du cuivre dans le mélange, soit 10 mM.

Le POBN est un « spin trap » utilisé pour détecter les radicaux RPE. Les radicaux hydroxyles ont cependant un temps de vie très court et ne peuvent réagir directement avec celui-ci. Un protocole habituel est d'ajouter 5 % d'éthanol dans le milieu. Les HO^\bullet réagissent d'abord avec l'éthanol pour former des radicaux EtO^\bullet qui réagissent ensuite avec le POBN. L'hydroéthoxy-POBN ainsi obtenu possède un signal caractéristique en RPE.

Solution de 3-CCA

L'acide coumarin-3-carboxylique (3-CCA) est un produit de chez Sigma.

Une solution stock à 5mM stock solution de 3-CCA est préparée dans un tampon phosphate 20 mM, 100 mM NaCl (PBS) à pH 9. Cette solution stock est stable au moins 6 mois à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Aucune trace de précipitation ou modification du spectre d'absorption n'est observée. La solution de travail est préparée en diluant la solution stock. La concentration finale dans la mélange réactionnel est de 10 μM .

L'acide coumarin-3-carboxylique (3-CCA) est utilisé comme détecteur de radicaux hydroxyles (HO[•]) en solution aqueuse. Il permet de suivre la génération de HO[•] via une réaction de type Fenton réaction. L'hydroxylation du 3-CCA donne le 7-OH-CCA, un produit fluorescent. Lorsqu'une excitation est appliquée à 395 nm, une bande est obtenue à 452 nm. L'intensité du signal de fluorescence est linéairement proportionnelle au nombre de molécules d'acide 7-hydroxy-coumarin-3-carboxylique formées, qui correspond en fait à la quantité de radicaux produite.

Solution d'ascorbate

Pour induire une réaction de type Fenton, un agent réducteur du cuivre est nécessaire. L'acide ascorbique (vitamine C) a été choisi. Il est présent dans le cerveau à des concentrations élevées (environ 300 μM). Il semble donc être un bon choix pour mimer les conditions in vivo.

La solution d'acide ascorbique est préparée dans un tampon phosphate 20 mM, NaCl 100 mM à pH 7,4 juste avant le début de l'expérience. La préparation tardive de cette solution est particulièrement importante en raison de sa rapide dégradation (oxydation) et de la diminution de son pouvoir réducteur qui en résulte. Une nouvelle solution est préparée pour chaque expérience de manière à avoir un pouvoir réducteur équivalent et être dans les mêmes conditions expérimentales.

Solution de catalase

La catalase de foie de bœuf est un produit commercial de chez Sigma. Il s'agit d'une métalloenzyme contenant 2 hèmes et composée de quatre sous-unités (de masse totale 240 kDa). Ces propriétés oxydantes catalysent la réaction suivante : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$.

Sa concentration dans le mélange réactionnel est de 40 nM afin qu'elle n'intervienne dans la réaction que par son activité catalytique (et non en piégeant le cuivre par exemple).

Solution de MT-3

La Zn₇MT-3 (métallothionéine-3) nous a été donné par le groupe de Milan Vasak de l'université de Zurich.

La MT-3 humaine est surexprimée dans *E. coli* puis purifiée. Elle est conservée en milieu réducteur en présence de mercaptoéthanol (la MT-3 a tendance à s'oxyder à l'air, elle forme des ponts disulfures et libère du zinc). Les solutions stocks de MT-3 sont préparées en

solubilisant le peptide (~ 1mg) dans l'eau désionisée (150 µl), il est rajouté 8µl de mercaptoéthanol à 144 mM. La séparation de la MT et du mercaptoéthanol est réalisée juste avant son utilisation sur une colonne (pipette pasteur) de résine d'exclusion stérique *séphadex G-15* avec pour éluant une solution tampon de 20mM Hepes, 100mM NaCl, pH 7,4. La concentration des échantillons est déterminée par un dosage des cystéines. Ce dosage est basé sur la réaction de la dithiopyridine (en excès) avec les thiols de la MT-3 pour donner le 2-pyridinethiol, qui présente une bande d'absorption caractéristique à 343nm ($\epsilon = 7600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Sachant que la MT-3 contient 20 fonctions thiols, la concentration peut être déterminée suivant la formule suivante : $[\text{MT}] = \text{DO}_{343} / (7060 \times 20)$ (Roschitzki et Vasak, 2002).

II. Méthodes.

II.1 Spectroscopie d'absorption UV-Visible

Les spectres d'absorption UV/Visible sont réalisés à température ambiante avec un spectromètre Cary 2300 dans une cuve en quartz de 1 cm de large.

II.2 Spectroscopie de Fluorescence

Les spectres de fluorescence ont été collectés avec spectrophotomètre de fluorescence Cirad. Les échantillons sont placés dans une cuve en quartz et les données sont enregistrées à température ambiante. Pour mesurer la fluorescence de la tyrosine, une fréquence d'excitation de 275 nm a été imprimée et les données enregistrées entre 290 – 400 nm. Pour la Thioflavine T, l'excitation se fait à 435 nm, et les données sont enregistrées entre 460 – 510 nm. (voir section II.9.c)

II.3 Titration calorimétrique isotherme (ITC)

L'une des méthodes couramment utilisées pour étudier la force d'une interaction entre deux molécules est la titration calorimétrique isotherme. Elle présente de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes permettant de déterminer des constantes de fixation. Elle est rapide, facile à mettre en œuvre, les expériences sont entièrement automatisées (injection et agitation) et permet de mesurer directement les échanges de chaleur liés à la formation de liaison.

Pour notre étude, nous avons utilisé un VP-ITC de Microcal®. C'est le plus sensible des microcalorimètres actuellement disponibles sur le marché.

L'ITC permet de mettre en évidence une interaction et de déterminer la constante d'affinité K_a (comprise entre 10^4 et 10^8 M^{-1}) et la stoechiométrie du système. On peut avoir accès à des constantes plus élevées ($> 10^{10} \text{ M}^{-1}$) en ayant recours à une méthode de compétition. Par ailleurs, il est possible de mesurer et de calculer les autres paramètres thermodynamiques de l'interaction : variation d'enthalpie ΔH , d'entropie ΔS , et par voie de conséquence l'énergie libre ΔG ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) et de chaleur spécifique ΔC_p . La microcalorimétrie peut aussi se révéler utile pour étudier des phénomènes d'ionisation, ou pour mettre en évidence et quantifier une compétition entre deux ligands. Les expériences sont réalisées dans un tampon Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4. Ce tampon a été choisi en raison de sa faible affinité pour le cuivre. Le même tampon est utilisé pour les solutions de peptides et de cuivre. Les solutions sont thermostatées et dégazées par agitation sous vide pour éliminer les bulles d'air avant utilisation. Pour toutes les expériences, des solutions fraîchement préparées de peptides et de CuCl_2 sont utilisées.

Une titration typique consiste en des injections de 3 μl de CuCl_2 à 0,8 mM (96 aliquots) dans 0,07 mM peptide avec un intervalle de 5 minutes entre chaque injection. L'homogénéité de la solution est assurée par un mélange à 300 tours par minute. La chaleur de dilution a été déterminée sous des conditions identiques par injection d'une solution de CuCl_2 dans la cellule de mesure. Pour toutes les expériences, la chaleur de dilution a été déterminée et soustraite des données de titration. Les données ont été analysées avec un logiciel provenant du fabricant (Origin® pour ITC). Les isothermes de liaison obtenues ont été ajustées en utilisant la méthode des moindres carrés pour obtenir la constante de dissociation (K_{ITC}), le nombre de molécules de peptide liées par complexe de Cu^{II} (stoechiométrie, n), et la variation d'enthalpie associée à l'interaction (ΔH). La simulation a ensuite été effectuée avec un modèle avec un ou deux sites de fixation.

II.4 Spectres RPE

Les données de résonance paramagnétique électronique à bande X (RPE) sont enregistrées sur un appareil Elexsys ESP 500, en travaillant à une fréquence de $\sim 9.5 \text{ GHz}$. Pour l'étude de la coordination du Cu^{II} , les spectres ont été obtenus en appliquant une puissance de 20 mW sur 1500 Gauss (centré à 3100 Gauss) avec une modulation d'amplitude

de 10 Gauss. Les échantillons sont gelés dans un tube en quartz où 10% de glycérol sont ajoutés comme cryoprotecteur. Les expériences sont réalisées à 108 K en utilisant un cryostat à azote liquide.

Pour l'étude de la production des radicaux HO[•] avec POBN, les spectres ont été obtenus en appliquant une puissance de 10 mW de 3300 à 3500 Gauss avec une modulation d'amplitude de 10 Gauss.

II.5 Spectres RMN

Les spectres RMN ont été collectés sur un spectromètre Bruker Avance 500 ou Bruker Avance 600 équipé d'une cryosonde. Tous les déplacements chimiques de ¹H sont donnés par rapport au TMS. Les spectres NMR ¹H sont enregistrés à 293 K dans 90% H₂O / 10% D₂O.

Les signaux ¹H des peptides libres ont été attribués par des méthodes conventionnelles basées sur des expériences de 2D TOCSY, NOESY, et gs-COSY45. La suppression du signal de l'eau a été effectuée avec une séquence WATERGATE. Le spectre NOESY a été effectué avec un temps de mélange de 200 ms et celui en TOCSY a été collecté avec un « spin-lock » de 80 ms. Typiquement, 4096 points t_2 ont été enregistré pour 512 incréments t_1 . Le logiciel XWINNMR 3.5 a été utilisé pour l'enregistrement et le traitement des spectres.

L'addition de Cu^{II} aux solutions de peptides A β a été effectuée à 293 K. Le peptide (0,5 mM) a été dissout dans 0,5 ml de tampon Tris-*d*₁₁ 50 mM. Le Cu^{II} ajouté est sous forme de sel de chlore à une concentration de 10 mM de manière à garder la concentration de peptide à peu près constante (une faible variation de volume 5 %). Le pH a été vérifié après chaque addition et ajusté si nécessaire. Les additions ont été suivies par des expériences 1D RMN ¹H et 2D TOCSY avec une séquence WATERGATE pour supprimer le pic de l'eau.

II.6 Spectroscopie de Luminescence

Les spectres de luminescence à basse température (77K) sont réalisés avec un spectrophotomètre (*PTI, QMI*) avec des tubes en quartz dans un dewar cylindrique en quartz rempli d'azote liquide, chez Dominique Lavabre (IMRCP, Toulouse). Les mesures sont réalisées sur des échantillons gelés en utilisant un délai de 50 μ s et une fenêtre d'acquisition de 300 μ s. Les échantillons d'environ 150 μ l sont réalisés avec 10% en volume de glycérol. La concentration en peptide A β est environ 100 μ M, celle de MT-3 25 μ M. Le tampon utilisé est Hepes 20 mM, pH 7,4.

II.7 Mesures électrochimiques

Les mesures voltamétriques ont été effectuées avec un potentiostat Autolab PGSTAT100 contrôlé par un logiciel GPES 4.09. Les expériences ont été réalisées à température ambiante dans une cellule contenant 3 électrodes et connectée à un vacuum/argon. L'électrode de référence est une électrode au calomel saturé séparée de la solution par un compartiment pontant. La contre-électrode est en platine et a une surface apparente de 1 cm². L'électrode de travail est une électrode de platine (1 mm de diamètre). L'électrolyte est le tampon Tris 50 mM NaCl 100 mM pH = 7.4. Les solutions utilisées pour les études électrochimiques sont à des concentrations de l'ordre de 10⁻³ M en peptides.

Le cycle voltamétrique est réalisé dans une gamme de potentiel comprise entre - 0,8 to 0,8 V contre l'électrode au calomel saturé à un balayage de 0,1 V/s. Avant chaque mesure, les solutions sont dégazées par bullage d'argon et l'électrode de travail est polie avec un appareil Presi P230.

II.8 Chromatographie d'exclusion stérique (CES).

L'analyse séparative des mélanges de protéines est réalisée par chromatographie d'exclusion stérique couplée à une FPLC. Elle permet l'apo-peptide et ses complexes avec le Cu^{II}. Elle est effectuée à température ambiante sur une colonne superdex 75 10/300 GL avec une instrumentation AKTA (Amersham Pharmacia Biotech) sous conditions isocratiques. L'éluant utilisé est une solution tampon de 20 mM de Hepes à pH 7,4 contenant 100mM de NaCl. Son débit est de 0,4 ml.min⁻¹. L'absorption a été enregistrée aux 3 longueurs d'ondes : 220 nm, 276 nm et 600 nm. Le système est calibré avec les molécules, globulaires et compactes de rayons hydrodynamiques connus suivantes: l'albumine (35,5 Å, 67kDa), la ribonucléase A (17,5Å ; 13,7 kDa), le cytochrome C (17 Å ; 12,3 kDa), l'aprotinine (13,5 Å; 6,5 kDa), la vitamine B12 (8,5 Å ; 1,35 kDa). Les oligonucléotides (de séquences 5'-CGTACG et 5'-TCCATATCACAT) ont été donnés par G. Pratviel et B. Meunier (LCC, Toulouse).

Après équilibration de la colonne avec élution du tampon 20 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7.4 (2 volumes de colonne), 100 µl d'échantillons de protéines (concentration comprise entre 10-200 µM) sont injectés. Le pic de Aβ est collecté puis quantifié par absorption.

La quantité de cuivre présente dans la fraction a été estimée par l'absorbance à 600 nm ($\epsilon = 60 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et par test colorimétrique test avec la bathocuproïne (Poillon et Dawson, 1963). Dans ce test, le Cu^{II} est d'abord réduit en Cu^{I} par addition d'un excès d'acide ascorbique (30 équivalents). Le Cu^{I} est ensuite complexé par la bathocuproïne, qui exhibe alors une bande de transition à 480 nm ($\epsilon = 13500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). L'acide bathocuproïne disulfonique (Acros) est 10 fois en excès.

II.9 Expériences d'agrégation

II.9.a Quantification

Les solutions d'A β (40 ou 42) sont incubées, en présence ou en l'absence de métaux (cuivre ou zinc), à 37 °C sous agitation (1400 tours par minute) avec un Thermometer Comfort de chez Eppendorf. Le surnageant (fraction soluble de A β) et le culot (contenant les agrégats) sont séparés par centrifugation.

La quantification de la concentration en protéine dans chaque fraction est réalisée à l'aide d'un kit Micro BCA Protein Assays (Pierce) à partir de gammes étalon réalisées avec des quantités connues d'albumine de sérum bovin (BSA) (Smith *et al.*, 1985).

Les composants du réactif de détection sont l'acide bicinchonique (BCA) et du Cu^{II} en milieu alcalin. Le principe du test repose sur la réaction de réduction du Cu^{II} en Cu^{I} par les protéines en milieu alcalin. Le Cu^{I} formé est alors chélaté par 2 ligands BCA, produisant un complexe qui absorbe à 562 nm et peut être détecté par spectrophotométrie à cette longueur d'onde (figure 5.1).

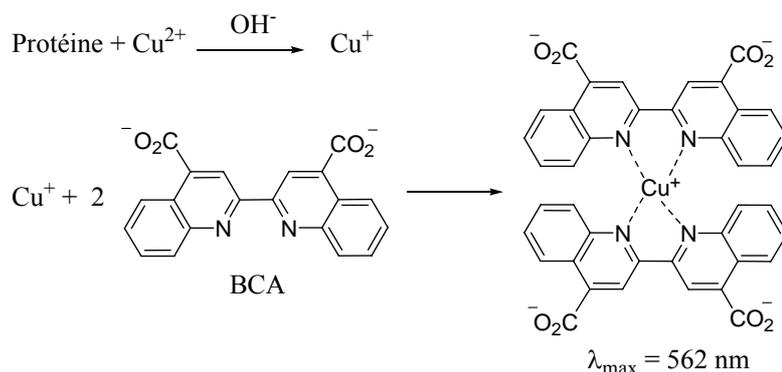


Figure 5.1. Réactions conduisant à la détection colorimétrique des protéines par le BCA.

Ce test colorimétrique possède plusieurs avantages, puisqu'il est :

- quantitatif, sensible (détection à partir de $0,02 \mu\text{M}$ d'A β) et linéaire dans la gamme de concentration de protéine étudiée (jusqu'à $6 \mu\text{M}$ d'A β),

- relativement peu dépendant de la séquence de la protéine, par rapport à d'autres tests, puisque ce sont les liens peptidiques qui réagissent lors du dosage et non les résidus, de nature variable, des acides aminés.

- compatible avec l'utilisation de Cu^{II} et de chélateurs d'ions métalliques aux concentrations de l'étude.

Pour avoir une courbe d'étalonnage « idéale », il est tout de même recommandé d'utiliser la protéine dont on étudie l'agrégation plutôt que l'albumine de serum bovin BSA.

II.9.b Electrophorèse

L'électrophorèse est une technique biochimique de séparation fondée sur le fait que des molécules portant des charges électriques différentes migrent à des vitesses différentes lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique. L'électrophorèse des protéines peut être réalisée sur un gel de polyacrylamide natif (sans SDS) selon la procédure de Laemmli, 1970 à l'aide du système mini-Protean® 3 de Biorad®, suivant le protocole suivant :

Gel séparatif :

	Volume pour un gel 5%
H ₂ O	2,9 ml
Tampon	4 ml
Acrylamide/Bisacrilamide (80/1)	2,1 ml
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	110 µl
TEMED	16 µl

Tableau 5.1. Préparation du gel de migration

Le tampon utilisée est un mélange suivant : 0,152 M Tris/HCl, 0,2 M Gly.

Une goutte de bleu de bromophenol est ajoutée à nos échantillons avant déposition. Une tension constante de 160 V est appliquée pour faire migrer les peptides sur le gel. Une fois la migration électrophorétique terminée, le gel est plongée pendant dix minutes dans le fixateur. Le fixateur est une solution de Méthanol (50 %), Acide acétique (10 %), H₂O (40 %) Bleu de Coomassie (0,25 %).

Une succession de bains dans la solution de décoloration permet ensuite d'éliminer la coloration du fond de façon à faire apparaître les bandes correspondant aux diverses protéines séparées. Le bain de décoloration est un mélange méthanol (15 %), acide acétique (10 %) et H₂O (75 %). Les pourcentages sont donnés en volume.

II.9.c Nature des fibres

Solution de Thioflavine-T (Th-T)

La Th-T est un produit commercial. Le spectre caractéristique de fluorescence de la Th-T présente avec un pic d'émission à 484 nm obtenu avec une excitation à 435 nm. La Th-T interagit spécifiquement avec la structure en feuillet bêta commune aux structures amyloïdes ; il en résulte une augmentation du signal de fluorescence (Levine, 1993).

La solution de Th-T est préparée par dissolution dans le tampon. La solution utilisée pour mettre en évidence les fibres de Th-T est à 5 μ M.

Solution de Rouge Congo

Le Rouge Congo (sel sodium de l'acide benzidinediazo-bis-1-naphtylamine-4-sulfonique) possède des propriétés spectrophotométriques, comme le suggère sa couleur rouge intense. Son spectre d'absorption montre un pic caractéristique à 498 nm en solution ($\epsilon = 45\,000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$). Lorsqu'il lie les fibres amyloïdes, une bande d'absorption apparaît à 580 nm.

La solution est préparée par dissolution dans le tampon. Elle est utilisée à une concentration de 10 μ M dans le mélange.

III. Bibliographie

- Dikalov, S.I., Vitek, M.P., Maples, K.R. and Mason, R.P. (1999) Amyloid- β -Peptides Do Not Form Peptide-derived Free Radicals Spontaneously, but Can Enhance Metal-catalyzed Oxidation of Hydroxylamines to Nitroxides. *J. Biol. Chem.* **274**, 9392-9399.
- Fee, J.A., and Gaber, B.P. (1972) Anion Binding to Bovine Erythrocyte Superoxide Dismutase. Evidence for multiple binding sites with qualitatively different properties. *J. Biol. Chem.* **247**: 60-65.
- Gill, S.C., and Von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**: 319– 326.
- Knipp, M., Meloni, G., Roschitzky, B., and Vasak, M. (2005) Zn₇Metallothionein-3 and the Synaptic Vesicle Cycle: Interaction of Metallothionein-3 with the Small GTPase Rab3A. *Biochemistry* **44**: 3159-3165.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Levine, H. (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease {beta}-amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **2**: 404-410.
- Poillon, W.N. and Dawson, C.R. (1963) On the nature of copper in ascorbate oxidase : I. The valence state of copper in the denatured and native enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **77**: 27–36.
- Roschitzki, B., and Vasak, M. (2002) A distinct Cu-4-thiolate cluster of human metallothionein-3 is located in the N-terminal domain. *J. Biol. Inorg.Chem*, **7**: 611-616.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- Turnbull, S., Tabner, B.J., El-Agnaf, O.M.A., Twyman, L.J. and Allsop, D. (2001) New evidence that the Alzheimer β -amyloid peptide does not spontaneously form free radicals: An ESR study using a series of spin-traps. *Free Rad. Biol. Med.*, **30**: 1154-1162.
- Vasak, M. (2005) Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elements Med. Biol.* **19**: 13-17.

Conclusion générale et perspectives

Nos travaux ont permis de caractériser l'interaction entre les peptides A β , impliqué dans la maladie d'Alzheimer, et le Cu^{II} d'un point de vue thermodynamique, structural et de la réactivité vis-à-vis de la production de ROS. L'interaction Cu-A β pourrait contribuer à une meilleure compréhension du processus de la MA. La compréhension du développement de la MA reste un enjeu majeur car elle devrait aboutir, à terme, à l'élaboration et le développement de médicaments efficaces.

Il a été mis en évidence que les peptides A β , sous forme soluble, possèdent 2 sites de fixation pour le Cu^{II} avec des constantes de dissociation apparentes respectives de 100 nM (site de forte affinité) et 10 μ M (site de faible affinité) à pH 7,4. Compte tenu des concentrations en cuivre dans le cerveau, dans le milieu extracellulaire (où se forment les plaques séniles) – 15 μ M - et des concentrations trouvées dans les plaques amyloïdes – 0,4 mM -, il semble que le peptide soit capable de fixer du cuivre dans le site de forte affinité malgré la présence probable de protéines ayant une affinité supérieure. Le site de faible affinité ne semble pas être occupé par le cuivre dans les conditions normales. On ne peut toutefois exclure totalement le fait qu'il ne joue aucun rôle. Il pourrait par exemple substituer le premier site de fixation lorsque celui-ci est endommagé (par les ROS par exemple). Une stratégie thérapeutique intéressante vise à concevoir des chélateurs du cuivre pour perturber cette interaction. Pour cela, ils devront avoir des constantes de dissociation inférieure à 100 nM pour celui-ci; c'est-à-dire avoir une affinité pour le cuivre supérieure à celle du peptide A β . Le clioquinol ($K_d = 10^{-9}$ M) a par exemple apporté des premiers résultats intéressants. Les teneurs en fer et en zinc dans le cerveau des patients atteints de la MA sont aussi élevées, les chélateurs devront être aussi capables de fixer ces excès de fer et de zinc.

Les complexes correspondant Cu^{II}-A β et Cu^{II}₂-A β , correspondant à ces deux sites, sont hétérogènes à pH 7,4 faisant intervenir à chaque fois au moins deux espèces.

Pour le site de forte affinité, la RPE a mis en évidence un environnement composé de 3N et 1O pour la forme majoritaire et un environnement de 4N pour la forme minoritaire. Ces formes 3N/1O et 4N ont été isolées respectivement à pH 6 et pH 9. La RMN a permis de mettre en évidence que la forme majoritaire pour Cu^{II}-A β fait intervenir les His en position 6,13 et 14 et l'Asp1. La forme majoritaire fait intervenir la fonction acide carboxylique alors que la forme minoritaire correspond à la liaison avec le NH₂ terminal. Ce premier site de fixation est très similaire pour les peptides A β 16/28/40/42. Cela confirme que les peptides tronqués sont de bons modèles pour la fixation du premier équivalent de cuivre.

Pour confirmer les ligands impliqués, il serait intéressant d'essayer de cristalliser le complexe à pH 6 ou 9 correspondant aux formes précédemment isolées, ce qui n'a pu jusqu'à présent être réalisé.

Une autre possibilité serait le marquage ou la mutation de certains acides aminés spécifiquement pour mettre en relief leur rôle dans la fixation du cuivre.

Le site de faible affinité est difficilement caractérisable. Des preuves ont montré qu'il était éloigné d'au moins 7Å du premier site de fixation. A pH 7,4 la RPE a permis de mettre en évidence une coordination hétérogène avec une forme majoritaire avec 3N/1O ou 4N selon le peptide. Il n'a pas pu être étudié en RMN en raison d'un élargissement important des signaux correspondant aux acides aminés du peptide. L'élucidation du second site reste donc à réaliser. Il est cependant légitime de s'interroger si elle est réellement intéressante compte tenu du fait que ce site ne semble pas capable de fixer le cuivre in vivo.

L'interaction entre le Cu^{II} et le peptide Aβ est désormais de mieux en mieux comprise. Cependant la toxicité semble générée via la production de ROS, qui pourrait être expliquée par les propriétés rédox du cuivre. Il serait donc intéressant d'étudier la coordination du complexe réduit Cu^I-Aβ. Aucun résultat n'est décrit dans la littérature.

Le fer possède lui aussi des propriétés oxydo-réductrices (couple Fe^{III/II}) et par conséquent, comme le cuivre, est susceptible de générer des radicaux hydroxyles. L'interaction entre le Fe^{III/II} et le peptide Aβ est assez mal connue. Elle mériterait donc d'être le sujet d'études approfondies.

L'étude de la réactivité a permis de montrer que les complexes Cu^{II}-Aβ étaient capables de générer des espèces réactives de l'oxygène tels que HO[•], et tout particulièrement Cu^{II}-Aβ42 qui a montré une production accrue de HO[•]. La quantité d'HO[•] produite par le complexe Cu^{II}-Aβ42 est plus importante que celle générée Cu^{II}-Aβ40. D'autre part, il y a donc une accumulation de peptide Aβ42 chez les patients atteints de la MA. En effet, la proportion de Aβ42 dans les plaques amyloïdes est plus importante que celle de Aβ40 (rapport 90/10) alors que c'est l'Aβ40 qui est produit majoritairement à partir de l'APP (10/90). La combinaison de ces deux effets pourrait expliquer une génération de ROS excessive, délétère pour les neurones.

Les cellules possèdent des mécanismes de défense contre les ROS. Elles sont capables d'en éliminer une partie. Seul un excès qu'elles ne peuvent pas éliminer conduit à leur mort. La question est de savoir si la quantité produite par le complexe Cu^{II} -A β 42 passe cette limite comparativement aux autres complexes. La relation entre la production de HO^\bullet et la toxicité vis-à-vis des cellules est en cours d'étude.

La corrélation entre les potentiels d'oxydo-réduction de certains complexes de Cu^{II} et la production de radicaux hydroxyles a été établie. Il serait intéressant de connaître les potentiels d'oxydo-réduction pour Cu^{II} -A β 42. A en juger par la corrélation établie entre production de HO^\bullet et les potentiels d'oxydo-réduction, ils devraient être plus proche de ceux de Cu^{II} -GHK que Cu^{II} -A β 16 ou Cu^{II} -A β 28. L'étude des potentiels d'oxydo-réduction des complexes en fonction de l'état d'agrégation serait également un axe de recherche intéressant à développer.

Enfin, il a été montré que la différence de production de HO^\bullet entre le complexe de cuivre formé A β 42 et ceux formés avec les peptides plus courts vient des premiers états d'agrégation de l'A β 42. Le peptide A β 42 agrège plus vite que l'A β 40. Le zinc et le cuivre semblent accélérer son agrégation ; même des traces de ces métaux suffisent. Cependant, il n'a pas été possible de quantifier véritablement l'accélération de l'agrégation ni de déterminer précisément les différents stades par CES ou gel d'électrophorèse. Pour isoler les différents intermédiaires, une méthode sans doute plus efficace que celle utilisée serait de partir des fibres et d'essayer de les resolubiliser. Cela revient en fait à parcourir le chemin inverse de l'agrégation. L'utilisation de « spin trap » d'oligomère tels que les naphtalène sulfonates, permettant de stabiliser les intermédiaires pourrait aussi s'avérer efficace.

La méthode la plus efficace pour caractériser la nature des agrégats obtenus, à condition que ceux-ci ne soient pas trop petits, est le MEB (microscope à balayage électronique) Les expériences avec le Rouge Congo et la thioflavine T restent limitées. Les expériences d'agrégation dans les différentes conditions devraient donc être réitérées et les échantillons analysés systématiquement par MEB. Des différences entre les fibres formées suivant que le peptide a été incubé en présence ou non de métaux devraient apparaître. L'utilisation du microscope à force atomique (AFM) pourrait aussi être envisagée.

Annexes

Les travaux effectués pendant ma thèse ont fait l'objet de 3 articles publiés :

- Mekmouche, Y., Coppel, Y., Hochgräfen, K., Guilloreau, L., Talmard, C., Mazarguil, H., and Faller, P. (2005) Characterization of the Zn^{II} binding to the peptide Amyloid- β^{1-16} linked to Alzheimer's disease. *ChemBioChem* **6**: 1663-1671.
- Guilloreau, L., Damian, L., Coppel, Y., Mazarguil, H., Winterhalter, M., and Faller, P. (2006) Structural and thermodynamical properties of Cu^{II} amyloid- $\beta^{16/28}$ complexes associated with Alzheimer's disease. *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**: 1024-1038.
- Talmard, C., Guilloreau, L., Coppel, Y., Mazarguil, H., and Faller, P. (2007) Amyloid-beta peptide forms monomeric complexes with Cu^{II} and Zn^{II} prior to aggregation. *ChemBioChem* **8**: 163-165.

Characterization of the Zn^{II} Binding to the Peptide Amyloid- β^{1-16} linked to Alzheimer's Disease

Yasmina Mekmouche,^[a] Yannick Coppel,^[a] Katja Hochgräfe,^[a] Luc Guilloreau,^[a] Christine Talmard,^[a] Honoré Mazarguil,^[b] and Peter Faller^{*[a]}

Aggregation of the human peptide amyloid- β (A β) is a key event in Alzheimer's disease (AD). Zinc ions play an important role in AD and in A β aggregation. In vitro, Zn^{II} binds to A β and accelerates its aggregation. In this work we have investigated Zn^{II} binding to the synthetic peptide A β^{1-16} , which contains the metal-binding domain of A β . Cd^{II} was used to probe the Zn^{II} site. A β^{1-16} bound one equivalent of Zn^{II} with an apparent dissociation constant (K_d) of 10^{-4} M. This K_d value is in the same range as the Zn concentration needed to precipitate A β . Circular dichroism and

NMR indicated predominantly random-coil secondary structures of apo-A β^{1-16} , Zn^{II}-A β^{1-16} and Cd^{II}-A β^{1-16} , which were all highly dynamic and flexible. The three histidines at positions 6, 13 and 14 were suggested to be ligands to Zn^{II} and Cd^{II}. Evidence that the aspartate at position 1 served as a fourth ligand to Zn^{II} and Cd^{II} was found at pH 8.7. ¹¹¹Cd NMR showed a resonance at 84 ppm, in line with a mixed oxygen-/nitrogen-ligand environment. The tyrosine at position 10 could be excluded as a ligand.

Introduction

Amyloid plaques are a characteristic feature in the brains of Alzheimer's disease (AD) victims.^[1] These plaques are mainly composed of an aggregated protein called amyloid- β (A β),^[2] which originates from a membrane protein called amyloid precursor protein (APP) and is present in healthy brains in a soluble form.^[3,4] Since the amyloid plaques occur only in AD patients, the aggregation process from A β to the plaques is considered to be a key event. According to the amyloid-cascade hypothesis, increased A β accumulation and aggregation lead first to the formation of A β oligomers and then to amyloid plaques.^[5] These oligomers are believed to provoke neuronal dysfunction and, later on, dementia, probably through the production of reactive oxygen species.^[5] In this context, conditions influencing this aggregation are of great interest.^[6] Studies in vitro, in cell cultures and in AD model mice all indicate an important role for metals (Zn, Cu and Fe) in this process.^[7-10]

In the case of Zn, a large body of evidence pointing to an important role of this metal ion in the metabolism of APP and A β linked to Alzheimer's disease has been accumulated. Zn has been found at high concentrations (\approx mM) in the amyloid plaques, and treatment with chelators partially solubilized the plaques.^[11] APP possesses a high-affinity Zn-binding site, located outside of the A β -region.^[12,13] Transgenic mice expressing human APP serve as a model for Alzheimer's disease, due to the pathology based on amyloid plaque formation. In such mice, the lack of the Zn-transporter ZnT3 (which transports Zn into synaptic vesicles) reduced the plaque load, so it was concluded that endogenous Zn contributed to amyloid deposition in transgenic mice.^[14] A chelator called clioquinol, known to bind Zn and Cu, successfully reduced the amyloid plaque burden in transgenic mice. Clioquinol is currently undergoing testing in humans (clinical phase II).^[15]

In vitro studies revealed that Zn promotes the aggregation of amyloid- β .^[6,16,17] However, the Zn concentrations needed to induce A β aggregation differed. It is necessary to distinguish between the different forms used—A β^{1-40} or A β^{1-42} , or the truncated A β^{1-28} and A β^{1-16} —because the propensity for aggregation increases with the length of the peptide (all are believed to contain the Zn-binding site; see below). For A β^{1-40} , values from 5 μ M to 100 μ M have been reported to provoke significant precipitation (initially a value of 100 nM was reported,^[17] but this was corrected to 5 μ M in a following publication).^[18]

Values of the same order were obtained for the dissociation constant of Zn-A β , but they differed widely in the conditions and methods used. Initially Bush et al. reported a substoichiometric binding of Zn to A β^{1-40} with K_d values of \approx 100 nM and, to a second site, 5 μ M from a displacement assay with radioactive and cold Zn binding to blotted A β^{1-40} (slightly lower K_d values of 334 nM and 15 μ M were reported for A β^{1-28}).^[17] In a subsequent study, also using blotted peptide, Clements et al. found no evidence for submicromolar binding, but confirmed a K_d of \approx 5 μ M for A β^{1-40} with a value of 3.2 μ M.^[19] Higher K_d values of 300 μ M for A β^{1-40} and 57 μ M for A β^{1-42} were deduced

[a] Dr. Y. Mekmouche, Dr. Y. Coppel, K. Hochgräfe, L. Guilloreau, C. Talmard, Prof. Dr. P. Faller
Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS UPR 8241
Associated with the University of Toulouse III (France)
Fax: (+33) 561-553-003
E-mail: faller@lcc-toulouse.fr

[b] Dr. H. Mazarguil
Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale
205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex (France)

from increased fluorescence of the single Tyr10 upon addition of Zn.^[20]

It has been reported that the metal-binding site is in the N-terminal hydrophilic region composed of amino acids 1–16 of A β (called A β ^{1–16}) and that the three histidines at positions 6, 13 and 14 were involved.^[21] In more detail, replacement of His13 by an Arg diminished the Zn affinity and the Zn-induced aggregation in A β ^{1–28}.^[22] Yang et al. reported that replacement of either His13 or His14 by Ala eliminated the Zn-induced conformation change to β -sheet and aggregation of A β ^{1–28}.^[23] Raman spectroscopy studies on Zn-induced aggregates of A β ^{1–40} and A β ^{1–16} generated by addition of two- to fourfold excesses of Zn to the peptide have been reported.^[24] The analysis suggested that all three histidines residues (6, 13 and 14) provide the primary metal binding sites and that Zn is bound to the N(τ) of His. The data also indicated that Tyr10 acted as a ligand at pH 7.4 (at least partially). It has also been suggested that the peptide aggregates through intermolecular His(N(τ))–Zn^{II}–His(N(τ)) bridges.^[24] The involvement of the three histidines as ligands has also been found by ¹H NMR measurements of Zn addition to A β ^{1–28}, which gave rise to broadening of the C2-H and C4-H resonances of His6, His13 and His14.^[25] Recently, ESI-mass spectrometric analysis of Zn–A β ^{1–16} investigated by collision-induced dissociation confirmed the three histidines as ligands and proposed Arg5, but not Tyr10, as a fourth ligand.^[26] In conclusion, the three histidines were implicated in Zn binding in the soluble and aggregated forms of A β and its model compounds A β ^{1–16} and A β ^{1–28}, but with other ligands it seems to be dependent on the aggregation state and the conditions.

In this study we investigated the interaction between Zn and A β ^{1–16}, used as a model for the interaction between Zn and A β in the soluble form. The binding of Zn to soluble A β corresponds to the first step, before the Zn–A β complex starts to aggregate. A β ^{1–16} contains the Zn binding site (see above), and its low propensity to aggregate allows studies of the soluble form at high concentrations.^[21]

Results and Discussion

The solubility of the peptide and its metal complexes at the concentrations to be used later for NMR were investigated first. Up to 1 mM A β ^{1–16}, no precipitation—as estimated by the loss of the Tyr absorption at 275 nm after centrifugation (see Experimental Section)—occurred between pH 7.1 and 8.7. Addition of up to 1 equivalent of either Zn or Cd at pH 7.1 and 8.7 did not yield significant precipitation. At more than 1 equivalent, however, precipitation readily occurred. (This was also in line with NMR measurements, which showed a loss of intensity and a general broadening of the signals.) In order to

be sure that no precipitation would occur, metals were added at slightly substoichiometric levels (0.95 equivalents).

¹H NMR

apo-A β ^{1–16}: In order to investigate the effect of metal binding on A β ^{1–16}, apo-A β ^{1–16} first had to be studied. TOCSY, COSY and NOESY experiments allowed the attribution of the resonances to the different protons in the A β ^{1–16} peptide. The assignment was performed at pH 8.7 and 7.1. 2D-NOESY experiments did not yield any medium- or long-range cross-peak (NOE); this indicates that A β ^{1–16} possessed a random structure (also con-

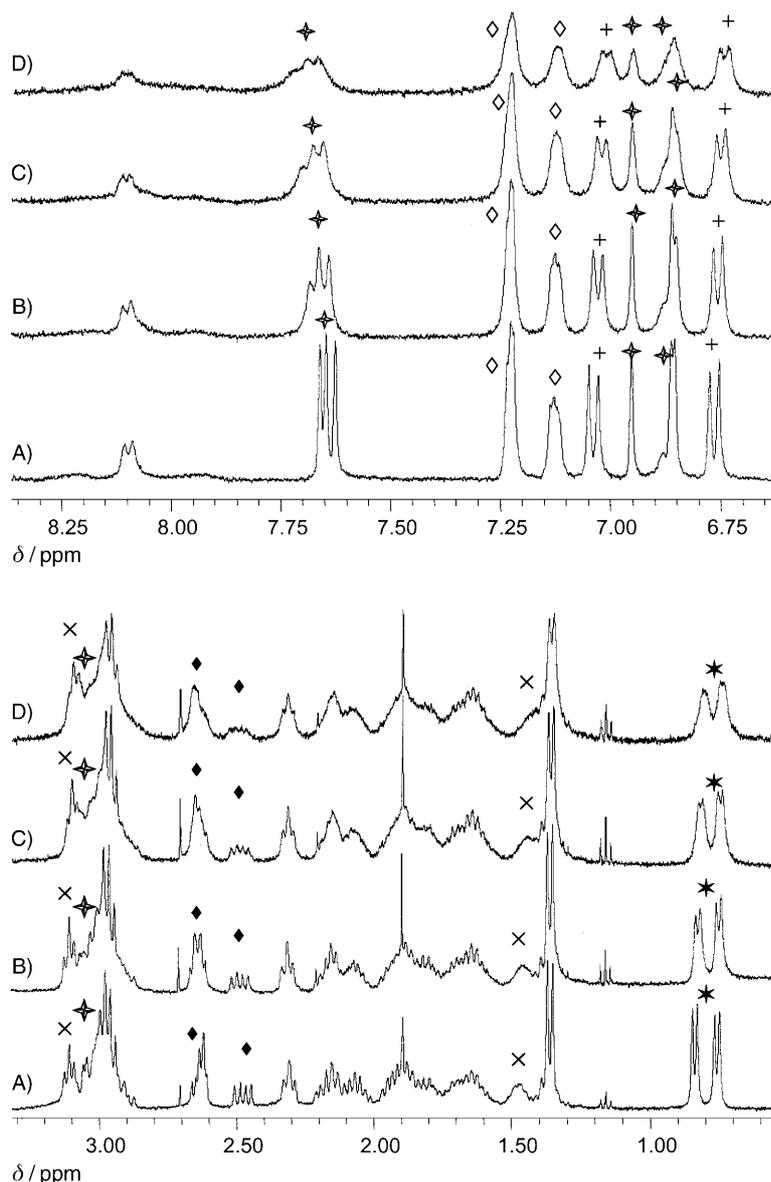


Figure 1. ¹H NMR of apo- and Zn^{II}-A β ^{1–16} at pH 8.7. The spectrum obtained from A β ^{1–16} (1 mM) in [D₁₁]Tris (pH 8.7, 50 mM)/D₂O (10%) at 293 K is shown (apo: trace A), together with spectra at 0.25, 0.5 and 1 mol equiv of added Zn²⁺ (traces B, C and D, respectively). The labelled resonances are: the three His units (+: ²H and ⁴H resonances), Asp1 (♦: β CH), Phe4 (◊: ^{3–5}H), Arg5 (×: γ CH and δ CH), Tyr10 (+: ^{2,6}H and ^{3,5}H) and Val12 (*: β CH₃).

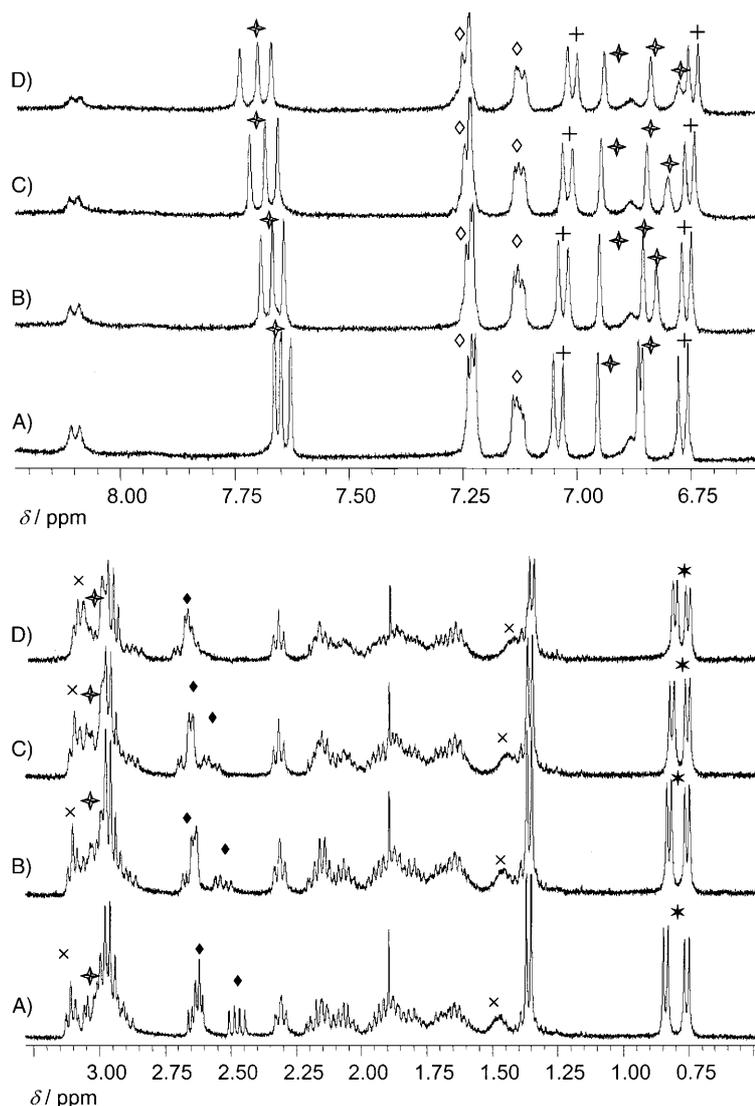


Figure 2. ¹H NMR of apo- and Cd^{II}-Aβ¹⁻¹⁶ at pH 8.7. A spectrum obtained from Aβ¹⁻¹⁶ (1 mM) in [D₁₁]Tris (pH 8.7, 50 mM)/D₂O (10%) at 293 K (apo: trace A) is shown, together with spectra at 0.25, 0.5 and 1 mol equiv of added Cd²⁺ (traces B, C and D, respectively). The labelled resonances are: the three His units (∗: ²H and ⁴H resonances), Asp1 (◆: βCH), Phe4 (◇: ³⁻⁵H), Arg5 (×: γCH and δCH), Tyr10 (+: ²⁶H and ³⁵H) and Val12 (∗: βCH₃).

firmed by the circular dichroism spectrum (see below and Figure 7).

Zn^{II}-Aβ¹⁻¹⁶ at pH 8.7: The chemical shifts of the histidine side-chain protons are very sensitive to pH, due to the pK_a (about 6.5) of the imidazole H–N. In order to be sure that observed changes in the His resonances were due to the addition of the metal (and not to very slight changes in pH; see Experimental Section), the first experiments were recorded at pH 8.7, in a range in which His is completely deprotonated and the side-chain resonances are thus not very sensitive to slight pH changes. Figure 1 shows the ¹H NMR spectrum of apo-Aβ¹⁻¹⁶ at pH 8.7 and the effect of the subsequent addition of 0.25, 0.5 and 0.95 equivalents of ZnCl₂. In general, broadening of the resonances could be observed with addition of ZnCl₂, but the extent of this broadening differed significantly, with much

larger broadening for His6, His13, His14, Asp1, Tyr10 and Val12 than for the rest of the amino acids. Such intense broadening is likely to be due to the proximity to Zn^{II}, as is the case for ligands or other close-by residues. The Val side chain is aliphatic and can thus be excluded as a Zn^{II} ligand. Tyr residues are known to bind metals and Tyr10 has been suggested as a ligand in Aβ under certain conditions.^[24,27] However, we provide evidence below that Tyr10 is not a ligand for Zn^{II} in Aβ¹⁻¹⁶, so the most likely ligands are Asp1 and the three His moieties. The large broadenings of the resonances of Tyr10 and Val13 were probably due to their proximity to the two His groups.

The progressive addition of Zn^{II} to Aβ¹⁻¹⁶ also gave rise to small shifts of some resonances (not shown). Most affected were those residues that had also shown the greatest broadening (see above): that is, Asp1, His6, 13, 14, Tyr10 and Val12. The only exception was Arg5, which also showed a slight upfield shift but no broadening. Arg5 has been proposed as a ligand to Zn^{II}-Aβ¹⁻¹⁶ and Aβ¹⁻²⁸ (from rat).^[26,28] In general, the Arg side chain is not considered to be a ligand to metal ions, due to its high pK_a of ≈ 12.5. To the best of our knowledge there is no arginine side chain that has been clearly identified as a metal ligand for a protein or peptide. Even if it were conceivable that Arg ligation could be imposed by a protein, this would seem less likely in such a flexible peptide as Aβ.

Cd^{II}-Aβ¹⁻¹⁶ at pH 8.7: The same type of experiment was also performed with Cd^{II} instead of Zn^{II}. Cd has often been used to probe Zn^{II} sites and has the advantage that it has two isotopes with spin 1/2, exploitable by NMR (see below). In general, the addition of Cd affected the same resonances (Figure 2). However, the shifts of the resonances upon Cd addition were larger and the broadenings were smaller. His6, 13, 14 and Asp1 showed the largest downfield shifts and so are most consistent with being the ligands. Arg5 and Tyr10 showed upfield shifts less consistent with their being ligands. However, Cd^{II} binding to Aβ¹⁻¹⁶ also produced slight downfield shifts in the two possible ligands Asp7 and Glu11, but these were much smaller than for Asp1. The four most likely ligands (His 6, 13, 14 and Asp1) also showed the largest broadening of the resonances.

Zn^{II}- and Cd^{II}-Aβ¹⁻¹⁶ at pH 7.1: Similar experiments were also performed at pH 7.1, which better reflects physiological conditions. Addition of Zn to Aβ¹⁻¹⁶ is shown in Figure 3. The three His moieties showed large broadenings upon addition of Zn, consistent with the Zn addition at higher pH and with His being involved in coordination. However, Asp1 was not significantly affected relative to the other residues (apart from Arg5 and Val12). There is thus no evidence for involvement of Asp1 as a ligand. However, no other resonance of any potential ligand was affected in return.

Zn^{II}-Aβ¹⁻¹⁶ at pH 6.4: Investigation of Zn binding to Aβ¹⁻¹⁶ at the lower pH of 6.4 did not reveal any further information

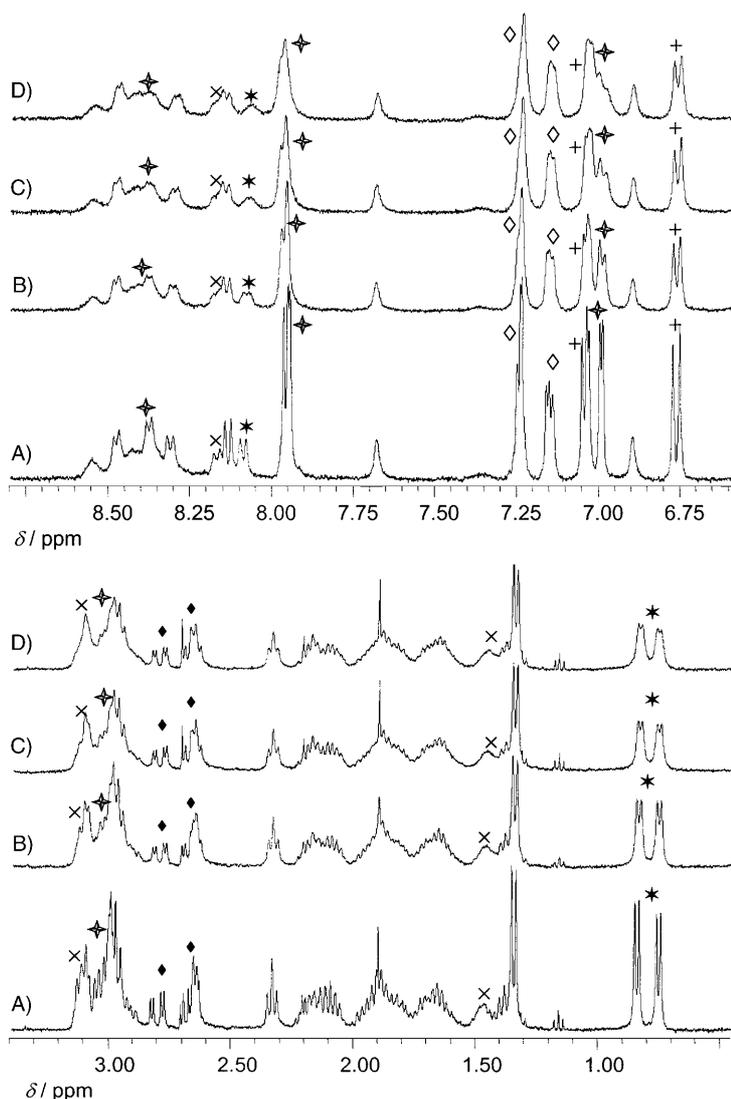


Figure 3. ^1H NMR of apo- and $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-A}\beta^{1-16}$ at pH 7.1. A spectrum obtained from $\text{A}\beta^{1-16}$ (1 mM) in phosphate buffer (50 mM, pH 7.10)/ D_2O (10%) at 293 K (apo: trace A) is shown, together with spectra at 0.25, 0.5 and 1 mol equiv of Zn^{2+} added (traces B, C and D, respectively). The labelled resonances are: the three His units (\star : ^2H and ^4H resonances), Asp1 (\blacklozenge : ^6CH), Phe4 (\diamond : $^3\text{-}^5\text{H}$), Arg5 (\times : ^7CH and ^8CH), Tyr10 ($+$: ^{26}H and ^{35}H) and Val12 (\ast : $^6\text{CH}_3$).

concerning a fourth ligand. Again, the three His moieties were affected most, whilst the other resonances were either not affected (including Asp1) or showed the same behaviour as at high pH (e.g., broadening of Val12; not shown).

$^{111}\text{Cd}^{\text{II}}\text{-A}\beta^{1-16}$: ^{111}Cd and ^{113}Cd are both spin $1/2$ nuclei with similar magnetic properties and have proven to be useful probes for Zn^{II} -binding sites in proteins. Their chemical shifts are dependent on the number and types of bound ligands,^[29] and with $> 90\%$ enrichment can readily be detected at \approx millimolar concentrations. The ^{111}Cd NMR spectrum at pH 7.1 and 293 K showed at least one broad peak at ≈ 100 ppm, but the signal-to-noise ratio was too small to be reliable (Figure 4). The spectrum was therefore recorded at a higher temperature (323 K), and this is also shown in Figure 4 and features a single sharp peak at 84 ppm. This behaviour indicated dynamic be-

haviour in the $\text{Cd-A}\beta^{1-16}$ complex, such as a metal exchange implicating different conformations, averaged out by the rising temperature. The chemical shifts of ^{111}Cd and ^{113}Cd correlate most strikingly with the type and number of ligands.^[29,30] When the chemical shift of 84 ppm was compared to those of known Cd-substituted metalloproteins from the literature, it was found to fall into the region of mixed ligands consisting of oxygen and nitrogen. The two closest ^{113}Cd substituted proteins were: i) carboxypeptidase A, with a chemical shift $\delta_{\text{Cd}} = 120$ ppm (ligands: two His, a bidentate Asp and a water molecule in a bipyramidal geometry) and ii) alkaline phosphatase B site, with a chemical shift $\delta_{\text{Cd}} = 62$ ppm (ligands: one His, two monodentate Asp and a serine in a tetrahedral geometry). According to calculations of ^{113}Cd shifts from first principles,^[30] both the number of ligands and, to a lesser extent, the geometry—that is, bond lengths and angles—affect the chemical shift. In general, a higher coordination number produces a downfield shift (i.e., higher ppm). Thus, for the case of $^{111}\text{Cd-A}\beta^{1-16}$, with three His moieties assumed as ligands (see above), it then fits best if no other additional ligand is present.^[30] However, additional oxygen ligands—such as from Asp1—cannot be excluded and would be more in line with Cd^{II} coordination chemistry, which prefers a higher number of ligands (typically between four and six).

Circular dichroism

The circular dichroism spectrum of apo- $\text{A}\beta^{1-16}$ (Figure 5) showed features typical of a predominantly random coil structure, in agreement with the 2001 study by Kozin et al.^[21] Unlike in that study, however, the $\text{A}\beta^{1-16}$ did not precipitate upon addition of up to 1 equivalent Zn or Cd, perhaps due to the different conditions (concentration of $\text{A}\beta^{1-16} = 0.28$ mM, 5 mM Tris/HCL, pH 7.3, 50 mM NaCl, whereas Kozin et al. used concentration of $\text{A}\beta^{1-16} = 0.200$ mM, 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.5 and no salt).^[21] The addition of up to 1 equivalent of either Zn^{II} or Cd^{II} did not change the CD spectrum significantly, indicating that $\text{A}\beta^{1-16}$ stayed predominantly in a random coiled structure when bound to these metals. This is also in agreement with the fact that only small changes in a restricted number of residues were observed by ^1H NMR upon metal addition (see above).^[21] It is interesting to note here that significant changes from random coil to a more structured state (β -structure) were observed in the CD study by Kozin et al. upon addition of Zn to $\text{A}\beta^{1-16}$ with an acetylated N terminus and an amidated C terminus.^[21] This could imply that either the N terminus or the C terminus plays an important role in binding of Zn to $\text{A}\beta^{1-16}$. The N terminus consists of the residue Asp1, which has also been shown to be affected by Zn, at least at higher pH (see above). It is thus possible that the N terminus acts as a ligand

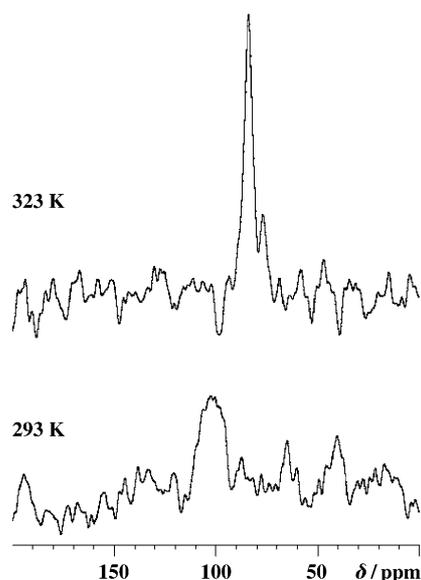


Figure 4. ¹¹¹Cd NMR spectrum of enriched ¹¹¹Cd-Aβ¹⁻¹⁶ at 323 K (top) and 293 K (reference Cd(ClO₄)₂) in [D₁₁]Tris (50 mM, pH 7.1)/D₂O (10% vol).

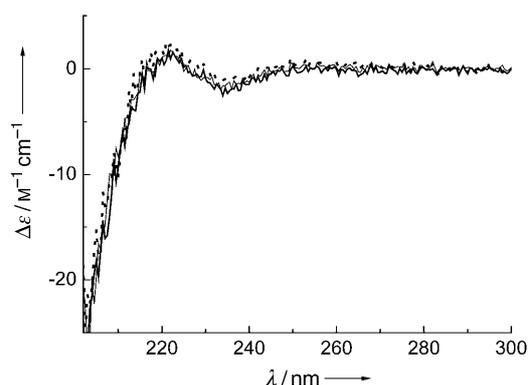


Figure 5. Circular dichroism spectra of apo-Aβ¹⁻¹⁶ (····), Zn-Aβ¹⁻¹⁶ (-----) and Cd-Aβ¹⁻¹⁶ (—): [Aβ¹⁻¹⁶] = 284 μM, Tris/NaOH (pH 7.3, 10 mM).

or at least is important for Zn-ligation, and that this is abolished by acetylation of the N terminus.

Zn^{II}- and pH-dependent absorption of Tyr10 in Aβ¹⁻¹⁶

Tyr10 has been suggested to play an important role in the chemistry and biology of Aβ. In particular it has been proposed to serve as a ligand for Cu^{II}, Fe^{II} and Zn^{II}, but also implicated in radical reactions of Cu^{II}-Aβ, for example, forming di-tyrosines etc.^[31,32] In order to investigate the role of Tyr10 in the complexation of Zn^{II}, the pH dependence of the absorption of Tyr10 was measured in the presence and in the absence of Zn^{II} (Figure 6). At physiological pH the addition of up to four equivalents of Zn^{II} did not significantly influence the absorption spectrum of the tyrosine. Note that Tyr10 is the only Tyr in the sequence and that no Trp is present, so the absorption above 250 nm is almost exclusively due to the phenolic side

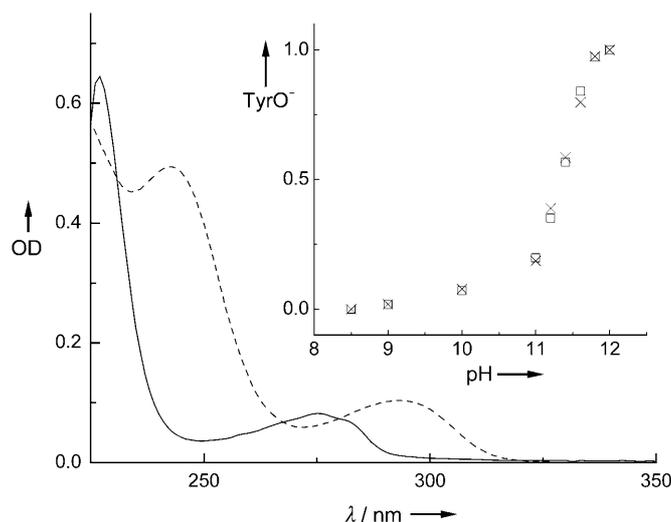


Figure 6. Absorption spectra of Aβ¹⁻¹⁶ at pH 7.5 (—) with Tyr10 as tyrosine and pH 12 (---) with Tyr10 as tyrosinate. Conditions: 60 μM Aβ¹⁻¹⁶. Inset: pH dependence of the protonation state of the phenolic proton of Tyr10 in the absence (□) and in the presence (×) of 1 equiv of Zn^{II}, estimated from the absorption of tyrosinate at 290 nm.

chain of Tyr10. If the Tyr10 were a ligand to Zn^{II}, deprotonation of the phenol side chain, and hence a change in the absorption spectrum, would be expected. This is shown by the spectrum of apo-Aβ¹⁻¹⁶ at pH 11 (Figure 6, dashed line). The tyrosine absorption maximum has shifted from 275 nm to 290 nm, as is typical for tyrosinates. This suggests that Tyr10 does not form a tyrosinate ligated to Zn^{II}. However, it could also be possible that Tyr10 coordinates Zn^{II} (at least weakly) without losing its phenolic proton. In order to investigate this we measured whether Zn binding to Aβ¹⁻¹⁶ would have an effect on the acidity of the phenolic proton of Tyr10, determining the pH dependence of the absorption spectrum of Aβ¹⁻¹⁶. From the fully protonated and fully deprotonated spectra of tyrosine (see above) the pK_a of Tyr10 in apo-Aβ¹⁻¹⁶ was determined and was found to ≈ 11.3. In the presence of one to four equivalents of Zn the apparent pK_a did not change significantly (Figure 6; inset). This indicates that Tyr10 was not acting as a ligand to Zn^{II} (even when several equiv were present) and that the binding of Zn^{II} does not influence the pK_a of Tyr10, through a structural change, for example (in agreement with NMR data; see above).

Size-exclusion chromatography

In order to address the question of whether Aβ¹⁻¹⁶ dimerises or oligomerises upon Zn binding, apo-Aβ¹⁻¹⁶ and Zn-Aβ¹⁻¹⁶ were analysed by size-exclusion chromatography. apo-Aβ¹⁻¹⁶ and Zn-Aβ¹⁻¹⁶ each exhibited a single peptide peak at about the same elution volume (Zn-Aβ¹⁻¹⁶ had the tendency to elute later). The elution volume corresponded to an apparent molecular mass of about 4–5 kDa. This suggests that the Zn binding to Aβ¹⁻¹⁶ does not augment the apparent molecular weight; that is, that Zn-Aβ¹⁻¹⁶ is most probably monomeric, like the apo-peptide.^[33]

Apparent binding constant of Zn^{II}-A β ¹⁻¹⁶

Key to the physiological significance of Zn^{II} binding to A β is its affinity. Apparent binding constants can be estimated by competition with a chelator with a known binding constant in the same range. The Zn chelator Zincon (Zi) has been shown to be appropriate for Zn-protein complexes.^[34,35]

Figure 7 shows the titration experiments (see Experimental Section). The upper panel showed the absorption at 620 nm from the Zn-Zi with addition of increasing amounts of A β ¹⁻¹⁶. The decrease in the absorption at 620 nm reflects the transfer of Zn^{II} from Zi to A β ¹⁻¹⁶. A concentration of about 13 μ M A β ¹⁻¹⁶ was necessary to reduce the band at 620 nm by half, indicating that half of the 5 μ M Zn bound to 10 μ M Zi had been transferred to A β ¹⁻¹⁶ (dotted lines, upper panel). The binding constants were thus globally very similar, Zi being slightly stronger than A β ¹⁻¹⁶. The calculations give an apparent binding constant

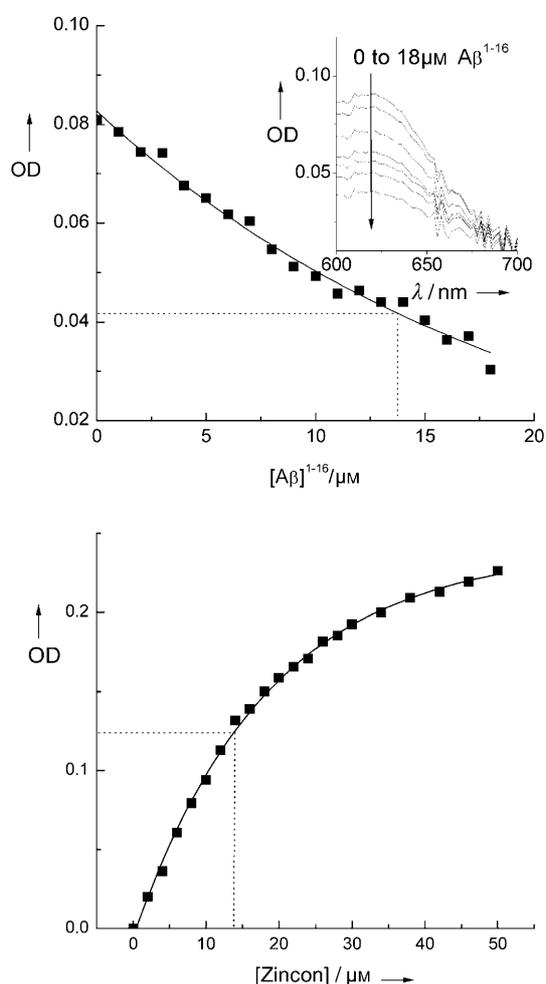


Figure 7. Estimation of the Zn^{II} binding constant by competition with the Zn^{II} chelator Zincon: Upper panel: absorption (at 620 nm) of the Zn-Zincon complex with addition of increasing amounts of A β ¹⁻¹⁶. Conditions: Zincon (10 μ M), Zn (5 μ M), pH 7.4, HEPES (50 mM), NaCl (100 mM). Inset: corresponding absorption spectra of Zn-Zincon (10 μ M) upon addition of 0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18 μ M A β ¹⁻¹⁶ (in direction of the arrow). Lower panel: increasing concentrations of Zincon were added to the complex of Zn-A β ¹⁻¹⁶, and the absorption (at 620 nm) of the Zn-Zincon was followed. Conditions: A β ¹⁻¹⁶ (20 μ M), Zn (10 μ M), pH 7.4, HEPES (50 mM), NaCl (100 mM).

(K_{app}) of 6.1×10^4 for Zn-A β ¹⁻¹⁶ (the spectra of some titration points are depicted in the inset).

The lower panel shows the inverse experiment, in which Zi was added to Zn-A β ¹⁻¹⁶. Here, half of the 10 μ M Zn was bound to Zi after addition of $\approx 14 \mu$ M Zi.^[36] This confirmed the above experiment and showed that, globally, the binding constants were in the same range with Zi a little stronger than A β ¹⁻¹⁶. The calculation yielded a K_{app} of 5.5×10^4 for Zn-A β ¹⁻¹⁶. The fact that the two approaches yielded the same K_{app} (within experimental limits) indicated that the Zn exchange reaction had reached equilibrium, a prerequisite for the calculation of K_{app} .

Dissociation constants have been measured for A β ¹⁻⁴⁰ and A β ¹⁻²⁸. In each case two constants were deduced: 104 nM and 5.2 μ M for A β ¹⁻⁴⁰, and 334 nM and 15 μ M for A β ¹⁻²⁸. The stronger constants in A β ¹⁻⁴⁰ and A β ¹⁻²⁸ were for substoichiometric binding of 0.7 and 0.25 respectively.^[17] The binding studies were performed by use of a displacement assay with peptide blotted on a polyvinylidene difluoride membrane, so it is conceivable that blotting changed the structure of the peptide or that the peptide was partially aggregated, thus exhibiting a higher apparent binding constant. In a subsequent study with a similar method but other conditions, Clements et al. found no evidence for such submicromolar binding but confirmed a K_d value of $\approx 5 \mu$ M for A β ¹⁻⁴⁰ with their value of 3.2 μ M.^[19] The peptide was also blotted on a membrane (nitrocellulose) in this case. The K_d value of A β in solution (not blotted) has been deduced from increased fluorescence of the single Tyr10 upon Zn addition. Values of 300 μ M for A β ¹⁻⁴⁰ and 57 μ M for A β ¹⁻⁴² were found.^[20]

Our studies for A β ¹⁻¹⁶ match well with the low μ M K_d (3 to 15 μ M), but no indication of stronger submicromolar binding was observed. It is very possible that the low submicromolar K_d was due to partially aggregated A β ¹⁻⁴⁰, whereas A β ¹⁻¹⁶ is more soluble and thus no submicromolar K_d was observed. This would also explain why the submicromolar K_d binding site had a stoichiometry of 0.7 in A β ¹⁻⁴⁰ and only 0.25 in A β ¹⁻²⁸, which is less aggregating. It can be proposed that the Zn binding to A β in the soluble form is in the $K_d = 10 \mu$ M range, but the apparent binding may become stronger when Zn-A β is aggregated. (It would have also to be shown that the apparent binding is thermodynamic and not kinetic trapping.) In the case of the higher K_d reported by fluorescence measurements, it has to be considered that these were carried out in Tris buffer (10 mM). Tris is known to ligate Zn modestly, which could be responsible for the higher apparent K_d of 300 μ M for A β ¹⁻⁴⁰. In the current study, competition between two stronger ligands (Zincon and A β ¹⁻¹⁶) was used, so the buffer should interfere less and a second HEPES buffer, which is a much weaker ligand for Zn than Tris, was used.

A dissociation constant in the μ M range is not very strong relative to other Zn-binding proteins such as Zn-fingers, metallothionein etc.^[35,37] However, it has been estimated that Zn concentrations can reach up to 300 μ M in certain regions of the brain,^[38] indicating that this binding site could be occupied by Zn. It is interesting to note that the Zn concentrations found to initiate precipitation of A β were of the same order as the binding constant (that is, $\approx 5 \mu$ M).^[18,39] It is therefore very

possible that Zn binding to this site is related to the precipitation.

Conclusion

The Zn–A β ^{1–16} complex showed an apparent dissociation constant (K_d) of about 15 μ M, in line with previous observations of 3–5 μ M for A β ^{1–40} (and 300 μ M in Tris buffer) and 15 μ M for A β ^{1–28}, and thus is consistent with A β ^{1–16} being a minimal binding fraction of A β in its soluble form. The reported lower K_d values could be due to more aggregated forms of Zn–A β . Size-exclusion chromatography suggests that Zn–A β ^{1–16} is monomeric.

A β ^{1–16} bound Zn (and its substitute Cd) through the three His moieties. Evidence for Asp1 as a ligand has been found at higher pH values (8.5), but this is less clear at lower pH, although no evidence for another amino acid replacing Asp1 as ligand at lower pH was observed. The other previously proposed ligands, Arg5 and Tyr10, were not consistent with the data obtained, neither were the rest of the potential amino acids.

The fact that Zn and Cd binding affect the NMR resonances of Asp1 only at high, and not at low, pH is more consistent with binding to the amine group of Asp1 (i.e., the N terminus of the peptide) rather than to the carboxylate side chain. In contrast, the chemical shift seen in the ¹¹¹Cd NMR is more in line with an oxygen than a nitrogen ligand, but the latter cannot be excluded.

The peptide structures in the forms both of apo-A β ^{1–16} and of Zn–A β ^{1–16} were mostly random and likely to be very flexible, so it is conceivable that Asp1, likely to be a ligand at pH 8.7, also serves as a ligand at neutral pH, but attaching to and detaching from the Zn, binding through its amine and carboxylate group or being in competition with other ligands such as water or hydroxide.

It is interesting to note that a recent report by Hou et al. showed that the same ¹H resonances—that is, the three His moieties and the aspartate region—were affected upon aggregation of A β (without addition of metals).^[40] They found evidence that the histidines are engaged in electrostatic interactions with the aspartate, thus forming a loop with a turn in the region of Ser8 to Val12. Another possibility for the formation of such a loop is the binding of a metal to the His and Asp, which would explain the promoting effect of metals on the A β aggregation.

Experimental Section

Sample preparation: The peptide A β ^{1–16} (sequence Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys) was synthesized by standard F-MOC chemistry and purified by HPLC on a C8 column (Brownlee labs). ESI-MS showed masses of 1954.95 and 978.55 for the mono- and dicharged species, respectively, which was in agreement with calculated masses of 1954.88 and 978.44, respectively. Most samples were used for multiple experiments and were stored by refrigeration. Under these conditions, neither degradation nor aggregation of the samples was observed. The peptide A β ^{1–16} concentration was determined by absorption spectroscopy,

by use of the well established extinction coefficient of Tyr at 275 nm ($\epsilon = 1410 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$).^[41] (Note that the peptide is predominantly in a random coil conformation (see below) and so the Tyr is likely to be surrounded by water as for the free Tyr.)

The metals were added from concentrated metal solutions of ZnCl₂ or CdCl₂ in HCl (10 mM). The HCl was used to keep the metals in solution, so the pH was monitored after each addition of this metal stock solution to the peptide and adjusted if necessary.

NMR spectra: NMR spectra were recorded on Bruker AMX400 and DMX500 spectrometers fitted with 5 mm triple resonance inverse Z-gradient probes in H₂O (90%)/D₂O (10%). All chemical shifts for ¹H are relative to TMS, and Cd(ClO₄)₂ was used as an external reference for ¹¹¹Cd. ¹H NMR spectra were recorded at 293 K and ¹¹¹Cd NMR spectra at 293 and 323 K.

The ¹H signals of the free peptide were assigned by conventional homonuclear methods based on 2D TOCSY, NOESY and gs-COSY45 experiments. Suppression of the water signal was achieved with a WATERGATE sequence. The NOESY spectrum was acquired with a mixing time of 200 ms and TOCSY was recorded with a spin-lock time of 80 ms. Typically, 4096 t_2 data points were collected for 512 t_1 increments. ¹¹¹Cd with inverse gated ¹H decoupling was acquired with 50000 transients, an acquisition time of 0.5 s and a recycle delay of 1 s. Spectra processing was performed on a Silicon Graphics O2 workstation with use of XWINNMR 2.5 software.

The addition of Zn²⁺ or Cd²⁺ to A β ^{1–16} was carried out at 293 K. The peptide (1 mM) was dissolved in [D_{1,1}]Tris (0.5 mL, 50 mM) or phosphate (0.5 mL, 50 mM) buffer depending on the pH selected. Zn²⁺ or Cd²⁺ were added as chloride salts from concentrated stock solutions (40 mM) in order to keep the concentration of peptide almost constant (volume changes were below 5%). The pH was checked after each addition (and readjusted if necessary).

For ¹¹¹Cd NMR measurements ¹¹¹Cd was added from a concentrated aqueous solution of ¹¹¹CdCl₂, generated by dissolving ¹¹¹CdO (95.11% isotopic purity, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN) in HCl (1 M) and then washing with pure water several times. The pH was checked after each addition. Chemical shifts given are with reference to Cd(ClO₄)₂.

As a control, ¹¹¹Cd in the buffer without the peptide was measured under the same conditions. A signal was clearly shifted to 60 ppm (as compared to the presence of peptide), which was in agreement with Cd^{II} complexed (at least partially) to the Tris buffer.

The ¹H NMR spectrum was recorded after each addition to determine the observed chemical shifts of the peptide at a given concentration of the corresponding Zn^{II} or Cd^{II}.

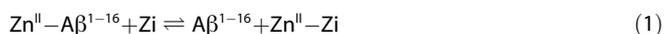
Circular dichroism: CD spectra were recorded on an AVIV Circular Dichroism model 202 spectrometer at 25 °C. Typically, a cell with a 0.1 cm path length was used for spectra recorded between 185 and 400 nm, with sampling points every 0.5 nm. A 1 cm cell path length was used for data between 240 and 800 nm, with a 2 nm sampling interval. A minimum of two scans were averaged, and baseline spectra were subtracted from each spectrum. AVIV software was used to smooth data when necessary. Data were processed with the aid of an origin spreadsheet/graph package. Direct CD measurements (θ , in millidegrees) were converted to molar ellipticity, $\Delta\epsilon$ ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) by use of the relationship $\Delta\epsilon = \theta/33000 \times c \times l$, where c represents the concentration and l is the path length. The A β ^{1–16} concentration was 284 μ M in Tris/NaOH (10 mM) at pH 7.3 and pH 8.7. Aliquots (0 to 1 mol equivalent) of 40 mM CdCl₂ or ZnCl₂ were added.

Absorption spectroscopy: UV/visible absorption spectra were obtained with a Cary 2300 spectrometer with use of a 1 cm path length quartz cuvette.

Size-exclusion chromatography: The apo-peptide and its complexes with Zn^{II} were analysed by size-exclusion chromatography. The separations were performed with an AKTA Instrument (Amersham) fitted with an Amersham Biosciences Superdex 75 10/300 GL size exclusion column (300 × 10 mm) under isocratic conditions. For the Zn-Aβ¹⁻¹⁶, HEPES/NaOH buffer solution (pH 7.4, 20 mM) containing NaCl (100 mM) was used. Since the Zn-Aβ¹⁻¹⁶ complex lost the Zn under these conditions, the same experiments were repeated in the presence of ZnCl₂ (10 or 100 μM) in order to ensure that Zn was always bound to Aβ¹⁻¹⁶. The Aβ¹⁻¹⁶ peak was collected and quantified by absorption (see above), which showed that Aβ¹⁻¹⁶ had passed through the column quantitatively. This excludes the possibility of polymerisation of Zn-Aβ¹⁻¹⁶ having occurred but having escaped our detection by the peptide's getting stuck on the column. Molecular weights were estimated from the calibration plot utilizing bovine serum albumin (*M_r* = 67 000), cytochrome C (*M_r* = 13 600), aprotinin (*M_r* = 6512), vitamin B12 (*M_r* = 1355) and tyrosine (*M_r* = 181.2; Sigma-Aldrich reagents).

Apparent binding constant of Zn^{II}-Aβ¹⁻¹⁶: The apparent binding constant was estimated by competition assay with the colorimetric Zn-chelator Zincon (2-carboxy-2'-hydroxy-5'-(sulfoformazyl)benzene.^[42] It has been reported in the literature that Zincon (Zi) forms a complex with Zn^{II} in a 1 to 1 stoichiometry (Zn^{II}-Zi), showing a distinct absorption band at 620 nm ($\epsilon = 23\,500\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$) at pH 7.4 and having an apparent binding constant (*K_{app}*) of 7.9×10^4 .^[34] We verified these parameters by titration of ZnCl₂ to different concentrations of Zi (10–20 μM) under our conditions (pH 7.4, 50 mM HEPES, 100 mM NaCl). Very similar parameters, within the experimental limits, were found (i.e., $\epsilon \approx 25\,000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$; *K_{app}* $\approx 8.5 \times 10^4$).

The binding equilibrium of Zn^{II} between Aβ¹⁻¹⁶ and Zi can be expressed as Equation (1):



The apparent binding constant of Zn^{II}-Aβ¹⁻¹⁶ can be calculated by resolving Equation (2) for *K_{app}*(Aβ¹⁻¹⁶).

$$\frac{[\text{Zn}^{\text{II}}-\text{A}\beta^{1-16}][\text{Zi}]}{[\text{A}\beta^{1-16}][\text{Zn}-\text{Zi}]} = \frac{K_{\text{app}}(\text{Zn}-\text{A}\beta^{1-16})}{K_{\text{app}}(\text{Zn}-\text{Zi})} \quad (2)$$

In the case of titration of Aβ¹⁻¹⁶ to the Zn-Zi complex, the absorption band at 620 nm was due to the Zn-Zi complex, which decreased upon addition of Aβ¹⁻¹⁶. This decrease reflected the transfer of Zn^{II} from Zi to Aβ¹⁻¹⁶, which yielded [Zn^{II}-Zi] and [Zn^{II}-Aβ¹⁻¹⁶] for Equation (A). [Zi] and [Aβ¹⁻¹⁶] could be calculated by subtracting the Zn-bound fraction from the initial concentration (i.e., [Zi] = [Zi]_{total} - [Zn-Zi] and [Aβ¹⁻¹⁶] = [Aβ¹⁻¹⁶]_{total} - [Zn-Aβ¹⁻¹⁶]). By taking the reported binding constant of Zn^{II}-Zi (see above) into account, the apparent binding constant of Zn^{II}-Aβ¹⁻¹⁶ could be calculated.^[28] In order to make sure that most Zn was bound to the ligand, an excess of Zi over Zn (2:1 ratio) was used as a starting point of the titration.

An analogous approach was used for the inverse titration: that is, the addition of Zi to Zn^{II}-Aβ¹⁻¹⁶. Both approaches yielded similar apparent binding constants of Zn^{II}-Aβ¹⁻¹⁶, indicating that reaction 1 had reached equilibrium.

Mass spectrometry: ESI-MS were performed on an API-365 quadrupole mass spectrometer (Perkin-Elmer Sciex). The samples were

prepared at a concentration of 75 μM in CH₃COO-NH₄⁺/NH₃ buffer (pH 8.7 or 7.1, depending on the conditions, 50 mM) to 30% vol. MeOH. Apo-Aβ¹⁻¹⁶, Zn^{II}-Aβ¹⁻¹⁶ and Cd^{II}-Aβ¹⁻¹⁶ exhibited double positive measured peaks at 978.55 Da, 1009.75 Da and 1033.15 Da, respectively. These masses fit well with the calculated masses of 978.44, 1009.90 and 1033.89 Da, respectively; the isotope distribution was also in agreement with the coordination of the different metals. In all cases, however, the spectrum also showed peaks corresponding to the apo-Aβ¹⁻¹⁶. We interpret this as indicating that Zn^{II} and Cd^{II} each formed a 1:1 complex with Aβ¹⁻¹⁶, but this was disrupted during the measurement, as is known for several other metal-peptide complexes in the literature.^[43,44] The formation of a 1:1 complex of Zn^{II} and Aβ¹⁻¹⁶ has already been shown by mass spectrometry.^[26]

Acknowledgements

We thank C. Claperols and S. Richelme (LCC, Toulouse) for ESI-MS measurement, and M. Blaud and Dr. M. Erard (IPBS, Toulouse) for access to and support with the circular dichroism spectrometer.

Keywords: Alzheimer's disease · beta amyloid peptide · bioinorganic chemistry · NMR spectroscopy · zinc

- [1] G. G. Glenner, C. W. Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *120*, 885–890.
- [2] J. Kang, H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, B. Müller-Hill, *Nature* **1987**, *325*, 733–736.
- [3] C. Haass, M. G. Schlossmacher, A. Y. Hung, C. Vigo-Pelfey, A. Mellon, B. L. Ostaszewsky, I. Lieberburg, E. H. Koo, D. Schnek, D. B. Teplow, D. J. Selkoe, *Nature* **1992**, *359*, 322–325.
- [4] E. H. Corder, A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, *Science* **1993**, *261*, 921–923.
- [5] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, *297*, 353–356.
- [6] A. I. Bush, W. H. Pettingell, G. Multhaup, M. de Paradis, J. P. Vonsattel, J. F. Gusella, K. Beyreuther, C. L. Masters, R. E. Tanzi, *Science* **1994**, *265*, 1464–1467.
- [7] G. Multhaup, C. L. Masters, *Met. Ions Biol. Syst.* **1999**, *36*, 365–388.
- [8] D. J. Selkoe, *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741–766.
- [9] A. I. Bush, *Trends Neurosci.* **2003**, *26*, 207–214.
- [10] Y. H. Suh, F. Checler, *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 469–525.
- [11] R. A. Cherny, J. T. Legg, C. A. McLean, D. P. Fairlie, X. Huang, C. S. Atwood, K. Beyreuther, R. E. Tanzi, C. L. Masters, A. I. Bush, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23 223–23 228.
- [12] A. I. Bush, G. Multhaup, R. D. Moir, T. G. Williamson, D. H. Small, B. Rumble, P. Pollwein, K. Beyreuther, C. L. Masters, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16 109–16 112.
- [13] E.-D. Ciuculescu, Y. Mekmouche, P. Faller, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 903–909.
- [14] J. Y. Lee, T. B. Cole, R. D. Palmiter, S. W. Suh, J. Y. Koh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7705–7710.
- [15] R. A. Cherny, C. S. Atwood, M. E. Xilinas, D. N. Gray, W. D. Jones, C. A. McLean, K. J. Barnham, I. Volitakis, F. W. Fraser, Y. Kim, X. Huang, L. E. Goldstein, R. D. Moir, J. T. Lim, K. Beyreuther, H. Zheng, R. E. Tanzi, C. L. Masters, A. I. Bush, *Neuron* **2001**, *30*, 665–676.
- [16] P. W. Mantyh, J. R. Ghilardi, S. Rogers, E. DeMaster, C. J. Allen, E. R. Stimson, J. E. Maggio JE, *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 1171–1174.
- [17] A. I. Bush, W. H. Pettingell, M. D. Paradis, R. E. Tanzi, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12 152–12 158.
- [18] X. Huang, C. S. Atwood, R. D. Moir, M. A. Hartshorn, J. P. Vonsattel, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 26 464–26 470.
- [19] A. Clements, D. Allsop, D. M. Walsh, C. H. Williams, *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 740–747.

- [20] W. Garzon-Rodriguez, A. K. Yatsimirsky, C. G. Glabe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2243–2248.
- [21] S. A. Kozin, S. Zirah, S. Rebuffat, G. H. Hoa, P. Debey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 959–964.
- [22] S. T. Liu, G. Howlett, C. J. Barrow, *Biochemistry* **1999**, *38*, 9373–9378.
- [23] D. S. Yang, J. McLaurin, K. Qin, D. Westaway, P. E. Fraser, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6692–6698.
- [24] T. Miura, K. Suzuki, H. Takeuchi, *J. Mol. Struct.* **2001**, *598*, 79–84.
- [25] C. C. Curtain, F. Ali, I. Volitakis, R. A. Cherny, R. S. Norton, K. Beyreuther, C. J. Barrow, C. L. Masters, A. I. Bush, K. J. Barnham, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20466–20473.
- [26] S. Zirah, S. Rebuffat, S. A. Kozin, P. Debey, F. Fournier, D. Lesage, J.-C. Tabet, *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *228*, 999–1016.
- [27] T. Miura, K. Suzuki, N. Kohata, H. Takeuchi, *Biochemistry* **2000**, *39*, 7024–7031.
- [28] J. Huang, Y. Yao, J. Lin, Y. H. Ye, W. Y. Sun, W. X. Tang, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 627–635.
- [29] G. L. Öz, D. L. Pountney, I. M. Armitage, *Biochem. Cell Biol.* **1998**, *76*, 223–234.
- [30] L. Hemmingsen, L. Olsen, J. Antony, S. P. Sauer, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 591–599.
- [31] T. Miura, K. Suzuki, N. Kohata, H. Takeuchi, *Biochemistry* **2000**, *39*, 7024–7031.
- [32] K. J. Barnham, F. Haeflner, G. D. Ciccotosto, C. C. Curtain, D. Tew, C. Mavros, K. Beyreuther, D. Carrington, C. L. Masters, R. A. Cherny, R. Cappai, A. I. Bush, *FASEB J.* **2004**, *18*, 1427–1429.
- [33] A β^{1-16} and Zn–A β^{1-16} each have a mass of about 2 kDa, so the apparent molecular mass of 4–5 kDa would also fit with dimers or trimers. However, since only one single peak was observed, such putative di- or trimers would have to be very stable. This is hard to reconcile with the very flexible random coil structure of A β^{1-16} and the absence of NOEs in NMR. Moreover, the calibration of molecular weight is based on spherical, compact molecules. Differently shaped proteins or peptides can have larger Stokes radii and hence higher apparent molecular masses. Similar behaviour has been reported for the monomeric protein metallothionein. Metallothionein contains seven Zn ions and has a molecular weight of ≈ 7 kDa. In size-exclusion chromatography it exhibits an apparent mass of ≈ 14 kDa. The apo-metallothionein with a mass of ≈ 6 kDa showed the same apparent mass of ≈ 14 kDa.^[45] In conclusion, the results fit best with Zn–A β^{1-16} being monomeric.
- [34] C. F. Shaw, J. E. Laib, M. M. Sevas, D. H. Petering, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 403–408.
- [35] M. Huang, D. Krepkij, W. Hu, D. H. Petering, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 775–785.
- [36] This was also in agreement with the absorption intensity of 0.12. This is expected for 5 μM Zn–Zi by application of the known ϵ of $\approx 23\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.
- [37] D. W. Hasler, L. T. Jensen, O. Zerbe, D. R. Winge, M. Vasak, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14567–14575.
- [38] C. J. Frederickson, *Int. Rev. Neurobiol.* **1989**, *31*, 145–238.
- [39] This is not contradictory to Esler et al.,^[45] who reported a concentration of 100 μM Zn needed for significant precipitation, because those experiments were performed in Tris buffer (50 mM), known to bind Zn modestly and hence to increase the concentration needed for precipitation. In contrast, Huang et al. measured in HEPES buffer, which binds Zn relatively weakly.^[18]
- [40] L. Hou, H. Shao, Y. Zhang, H. Li, N. K. Menon, E. B. Neuhaus, J. M. Brewer, I. J. Byeon, D. G. Ray, M. P. Vitek, T. Iwashita, R. A. Makula, A. B. Przybyla, M. G. Zagorski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1992–2005.
- [41] S. C. Gill, P. H. Von Hippel, *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 319–326.
- [42] G. K. Walkup, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3443–3450.
- [43] C. F. Shaw, J. E. Laib, M. M. Sevas, D. H. Petering, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 403–408.
- [44] P. Palumaa, E. Eriste, O. Njunkova, L. Pokras, H. Jornvall, R. Sillard, *Biochemistry* **2002**, *41*, 6158–6163.
- [45] M. Vasak, C. Berger, J. H. R. Kagi, *FEBS Lett.* **1984**, *168*, 174–178.
- [46] W. P. Esler, E. R. Stimson, J. M. Jennings, J. R. Ghilardi, P. W. Mantyh, J. E. Maggio, *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 723–732.

Received: February 9, 2005

Published online on August 3, 2005

Structural and thermodynamical properties of Cu^{II} amyloid- β 16/28 complexes associated with Alzheimer's disease

Luc Guilloreau · Luminita Damian · Yannick Coppel ·
Honoré Mazarguil · Mathias Winterhalter ·
Peter Faller

Received: 9 February 2006 / Accepted: 1 August 2006 / Published online: 22 August 2006
© SBIC 2006

Abstract The aggregation of the peptide amyloid- β ($A\beta$) to form amyloid plaques is a key event in Alzheimer's disease. It has been shown that Cu^{II} can bind to soluble $A\beta$ and influence its aggregation properties. Three histidines and the N-terminal amine have been proposed to be involved in its coordination. Here, for the first time, we show isothermal titration calorimetry (ITC) measurements of the Cu^{II} binding to $A\beta$ 16 and $A\beta$ 28, models of the soluble $A\beta$. Moreover, different spectroscopic methods were applied. The studies revealed new insights into these Cu^{II}- $A\beta$ complexes: (1) ITC showed two Cu^{II} binding sites, with an apparent K_d of 10^{-7} and 10^{-5} M, respectively; (2) the high-affinity site has a smaller enthalpic contribution but a larger entropic contribution than the low-affinity binding site; (3) azide did not bind to Cu^{II} in the higher-affinity binding site, suggesting the absence of a

weak, labile ligand; (4) azide could bind to the Cu^{II} in the low-affinity binding site in $A\beta$ 28 but not in $A\beta$ 16; (5) ¹H-NMR suggests that the carboxylate of aspartic acid in position 1 is involved in the ligation to Cu^{II} in the high-affinity binding site; (6) the pK_a of 11.3 of tyrosine in position 10 was not influenced by the binding of 2 equivalents of Cu^{II}.

Keywords Copper · β -amyloid · Calorimetry · Spectroscopy · Coordination

Abbreviations

$A\beta$	Amyloid- β
$A\beta$ 16	Amyloid- β 1–16
$A\beta$ 28	Amyloid- β 1–28
AD	Alzheimer's disease
APP	Amyloid-precursor protein
EPR	Electron paramagnetic resonance
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonic acid
ITC	Isothermal titration calorimetry
NOESY	Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
TOCSY	Total correlation spectroscopy
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

Electronic Supplementary Material Supplementary material is available to authorized users in the online version of this article at <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-006-0154-1>.

L. Guilloreau · Y. Coppel · P. Faller (✉)
Laboratoire de Chimie de Coordination,
CNRS UPR 8241 (associated with University Toulouse III),
205 route de Narbonne,
31077 Toulouse Cedex 4, France
e-mail: faller@lcc-toulouse.fr

L. Damian · H. Mazarguil · M. Winterhalter
Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale,
205 route de Narbonne,
31077 Toulouse Cedex 4, France

L. Damian · M. Winterhalter
International University Bremen,
Campusring 1,
20725 Bremen, Germany

Introduction

Amyloid plaques are a hallmark in the brain of Alzheimer's disease (AD) victims [1]. These plaques are constituted mainly of an aggregated peptide called amyloid- β ($A\beta$) [2]. The $A\beta$ comes from a membrane protein called amyloid-precursor protein (APP) [3] and is present in healthy brains in a soluble form [4]. Since

the amyloid plaques occur only in AD patients, the aggregation process from $A\beta$ to the plaques is considered to be a key event. According to the amyloid cascade hypothesis [5], an increased $A\beta$ accumulation and aggregation leads first to the formation of $A\beta$ oligomers and then to amyloid plaques. These oligomers are supposed to provoke neuronal dysfunction and later on dementia, likely via the production of reactive oxygen species [5]. In this context, conditions influencing this aggregation are of high interest [6]. Studies *in vitro*, in cell cultures and AD model mice indicate an important role for metals (Zn, Cu, and Fe) [7–10].

In the case of Cu, a large body of evidence has been accumulated pointing to an important role of this metal ion in the metabolism of APP and $A\beta$ linked to AD [7, 9, 11, 12]. For instance, Cu has been found in amyloid plaques at high concentrations (approximately 0.4 mM) and treatment with chelators partially solubilized the plaques [13]. The chelator clioquinol, which is known to bind Cu and Zn, reduced successfully the amyloid plaque burden in transgenic mice [14]. Moreover, Cu has been shown to increase toxicity [15] and studies using transgenic mice showed that the dietary supplement of copper or the increasing of the copper content in the body (by a mutant of a Cu transporter) affected the $A\beta$ metabolism [16, 17].

In vitro studies revealed that Cu binds to $A\beta$ and can influence its aggregation kinetics. Reports of accelerating and inhibiting effects of Cu on $A\beta$ aggregation have been published [18, 19]. They seem to depend on the conditions (e.g., pH was identified) and type of aggregated state. The binding site of Cu was localized in the N-terminal portion of the peptides (amino acids 1–16) [20–23]. Owing to the propensity of $A\beta_{40}$ to aggregate, shorter peptides containing the Cu-binding portion are often studied as models for the soluble Cu– $A\beta_{40}$ complex. Such soluble model complexes are of relevance, because it is thought that soluble complexes of Cu– $A\beta_{40}$ are formed prior to aggregation; thus, they are the first step in the metal-related aggregation of $A\beta$. The $A\beta$ model peptides used are (1) the quite soluble $A\beta_{1-16}$ ($A\beta_{16}$) and (2) the $A\beta_{1-28}$ ($A\beta_{28}$), which is relatively soluble but can aggregate to fibrils like $A\beta_{40}$ at higher concentrations with long incubations. From the literature it is clear that around physiological pH, Cu is bound in a distorted square-planar geometry and that two to three histidines serve as ligands in soluble $A\beta$ and its model peptides $A\beta_{16}$ and $A\beta_{28}$ [20, 22, 24–28]. In the case of the remaining ligands, several suggestions were made, including the N-terminal amine [22, 23], carboxylate from Asp1 or Glu3 [23, 27] and Tyr10 [19, 21]. Importantly, no difference between Cu bound to soluble $A\beta$ and fibrils

were detected by electron paramagnetic resonance (EPR) [26]. Recently, it was shown that $A\beta_{16}$ and $A\beta_{28}$ can also bind specifically a second equivalent of Cu [22].

Binding constants of Cu^{II} to $A\beta$ and its model peptides were measured for the first equivalent of Cu^{II} [22, 27, 29]. K_d in the high nanomolar to low micromolar was obtained for the soluble form of $A\beta$. There is one report in the literature which proposed a much higher apparent K_d in the picomolar and attomolar range for $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$, respectively [30]. The origin of these differences in K_d is not known, but it might be due to the experimental setup.

With respect of the importance of the Cu binding to $A\beta$, we studied the interaction of Cu^{II} with $A\beta_{16}$ and $A\beta_{28}$ and focused on the following three points: (1) the fundamental thermodynamic parameters enthalpy, entropy, and binding affinity; (2) unknown features of the Cu– $A\beta_{16}/A\beta_{28}$ coordination chemistry: the elucidation of the unidentified oxygen ligand by NMR, the less described second Cu-binding site, and the influence of the first and second Cu equivalent on the pK_a of the unique tyrosine; (3) the accessibility of small molecules to the Cu sites, a crucial feature in coordination chemistry for a putative catalytic site (Cu– $A\beta$ has been proposed to catalyze the generation of reactive oxygen species).

Experimental

Sample preparation

The peptides $A\beta_{16}$ (sequence Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys) and $A\beta_{28}$ (sequence Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys) were synthesized by standard *N*-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl) chemistry and purified by high-performance liquid chromatography using a C8 column. Electrospray ionization mass spectrometry of $A\beta_{16}$ and $A\beta_{28}$ showed masses of the monocharged species which were within ± 0.3 units of the calculated masses of 1,954.9 and 3,262.5, respectively.

The stock solutions of peptides prepared by dissolving the peptides in water were stored at 253 K. Under these conditions, neither degradation nor aggregation of the samples was observed by 1H -NMR measurements over several weeks. The peptide concentrations of $A\beta_{16}$ and $A\beta_{28}$ were determined by absorption spectroscopy using the extinction coefficient of the tyrosine at 276 nm ($\epsilon = 1,410 \text{ cm M}^{-1}$).

Note that the peptides are predominantly in a random-coil conformation (see later) and hence the tyrosine is likely surrounded by water as for the free tyrosine.

The metal was added from a concentrated metal solution of CuCl_2 in 10 mM HCl. After each addition of this metal stock solution to the peptide, the pH was checked and if necessary adjusted. The measurements were conducted in 50 mM 2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonic acid (HEPES) buffer pH 7.4, 100 mM NaCl, if not otherwise stated.

Chelex treatment

Chelex 100 resin (BioRad) was washed three times with buffer (50 mM HEPES buffer pH 7.4, 100 mM NaCl) prior to use (in order to adjust the pH of Chelex 100). $A\beta_{16}$ and $A\beta_{28}$ were titrated with 0–4 equivalents of CuCl_2 . The absorption changes were followed by UV absorption spectroscopy between 220 and 350 nm (ligand-to-metal charge transfer bands of Cu^{II}). The absorption increased upon each addition of Cu^{II} . Then Chelex 100 resin was added, incubated, and removed. The subsequent UV spectrum was almost identical to the spectrum obtained after adding 2 equiv of Cu^{II} to $A\beta_{16}/A\beta_{28}$. This indicated that Chelex 100 was able to remove all the Cu^{II} but for 2 equiv.

Absorption spectroscopy (UV–vis)

UV–visible absorption spectra were recorded at room temperature with a Cary 2300 spectrometer in a 1-cm path length quartz cuvette. UV absorption titrations were recorded by adding aliquots of Cu^{II} to the cuvette containing a known initial concentration of peptide. No turbidity was observed, indicating the absence of higher aggregates.

Interaction with azide

A stock solution of sodium azide was prepared at 1 M in water and was stored at 277 K. From this stock solution, an aliquot was added to $\text{Cu}^{\text{II}}-A\beta_{16}/A\beta_{28}$ solution at 100 μM in 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl to a final azide concentration of 2 mM. Azide has a very low affinity for Cu^{II} ($K_a \sim 10^2 \text{ M}^{-1}$) and it is hence unlikely that azide pulled out Cu from $\text{Cu}^{\text{II}}-A\beta_{16}/A\beta_{28}$, which have much higher affinity (see later).

Fluorescence spectroscopy

Fluorescence spectra were collected using a Cirad fluorescence spectrophotometer. An excitation frequency

of 275 nm was used and data were collected over the range 290–400 nm. Samples were placed in a four-sided quartz fluorescence cuvette and data were recorded at room temperature.

EPR spectra

X-band EPR data were recorded using an Elexsys ESP 500, operating at a microwave frequency of approximately 9.5 GHz. All spectra were recorded using a microwave power of 20 mW across a sweep width of 1,500 G (centered at 3,100 G) with a modulation amplitude of 10 G. Samples were frozen in quartz tube, with addition of 10% glycerol as a cryoprotectant in 50 mM HEPES. Experiments were carried out at 108 K using a liquid nitrogen cryostat.

NMR spectra

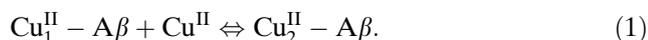
NMR spectra were collected using a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5-mm triple resonance inverse Z-gradient probe except for the total correlation spectroscopy (TOCSY) experiments used to follow the addition of Cu^{II} to $A\beta_{28}$ and which were acquired with a Bruker Avance 600 spectrometer equipped with a 5-mm triple resonance inverse Z-gradient cryoprobe. All chemical shifts for ^1H are relative to tetramethylsilane. ^1H -NMR spectra were collected at 293 K in 90% $\text{H}_2\text{O}/10\% \text{D}_2\text{O}$.

The ^1H of the free peptides were assigned by conventional homonuclear methods based on 2D TOCSY, nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (NOESY), and gradient-selected correlation spectroscopy with a 45° pulse experiments. Suppression of the water signal was achieved with a WATERGATE sequence. The NOESY spectrum was acquired with a mixing time of 200 ms and the TOCSY spectrum was recorded with a spin-lock time of 80 ms. Typically, 4,096 t_2 data points were collected for 512 t_1 increments. Spectra processing was performed using XWINNMR 3.5 software.

The addition of Cu^{II} to $A\beta_{16}$ and $A\beta_{28}$ was carried out at 293 K. The peptide (0.5 mM) was dissolved in 0.5 ml 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)- d_{11} buffer. Cu^{II} was added as chloride salts from a concentrated stock solution (10 mM) in order to keep the concentration of peptide almost constant (volume changes were below 5%). The pH was checked after each addition (and if necessary readjusted). The addition was followed using 1D ^1H -NMR and 2D TOCSY experiments with a WATERGATE sequence for water suppression.

Binding constant of the low-affinity binding site

The low-affinity binding site was estimated on the basis of the following the binding equilibrium:



It is characterized by an apparent binding constant

$$K_{\text{app}} = \frac{[\text{Cu}_2^{\text{II}} - \text{A}\beta]}{[\text{Cu}_1^{\text{II}} - \text{A}\beta][\text{Cu}^{\text{II}}]}. \quad (2)$$

The $\text{Cu}_2^{\text{II}} - \text{A}\beta$ concentration is estimated by the additional gain of fluorescence quenching after formation of $\text{Cu}_1^{\text{II}} - \text{A}\beta$. When the fluorescence signal dropped to half its original value, the concentration of $\text{Cu}_2^{\text{II}} - \text{A}\beta$ was equal to that of $\text{Cu}_1^{\text{II}} - \text{A}\beta$. Then, K_{d} is equal to the concentration of free Cu^{II} , which is the difference between the concentration of total Cu^{II} and the concentration of the Cu^{II} bound to $\text{A}\beta$ (i.e., $\text{Cu}_1^{\text{II}} - \text{A}\beta$ concentration + $\text{Cu}_2^{\text{II}} - \text{A}\beta$ concentration).

Isothermal titration calorimetry

Isothermal titration calorimetry (ITC) measurements were carried out at 298.0 ± 0.1 K using an ultrasensitive VP ITC microcalorimeter. The measurements were conducted in 50 mM HEPES buffer pH 7.4, 100 mM NaCl. This buffer was chosen because it has been shown to have a negligible interference with copper. The samples were prepared in the same buffer solution and degassed by stirring under vacuum to eliminate air bubbles before use. For all experiments, freshly prepared peptide and CuCl_2 solutions were used. Peptide samples did not show any turbidity after the titration.

A typical titration consisted of injecting 3 μl of 0.8 mM CuCl_2 (96 aliquots) into 0.07 mM peptide with an interval of 5 min between injections. To achieve a homogeneous mixing in the cell, the stirrer speed was kept constant at 300 rpm. The heat of dilution was determined under identical conditions by injecting the appropriate Cu^{II} solution into the ITC cell containing only the sample buffer. For every experiment, the heat of dilution was determined and subtracted from the sample titration data before processing.

The titration data were analyzed using the software provided by the manufacturer (Origin for ITC). The corrected binding isotherms were fitted using least-squares regression to obtain the association constant (K_{ITC}), the number of peptide molecules bound to per Cu^{II} complex (stoichiometry, n), and the enthalpy

change associated with the interaction (ΔH). The two sets of sites model was used. All parameter uncertainties were evaluated at the 90% confidence level. Once K_{ITC} had been obtained directly from the curve fitting, the free-energy change for binding (ΔG) was calculated from the following relationship:

$$\Delta G = -RT \ln K_{\text{ITC}},$$

where R is the universal gas constant (1.987 cal mol⁻¹ K⁻¹) and T is the absolute temperature. The entropy change was then calculated from $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

Results and discussion

Isothermal titration calorimetry

ITC experiments can be used to study the binding between two molecules, often called ligand and receptor. Direct indications of three parameters can be obtained. These are the stoichiometry between ligand and receptor, the binding constant (K), and the enthalpy (ΔH). From the binding constant and the enthalpy, the entropy (ΔS) can be calculated. So far no ITC experiments of metal ion binding to $\text{A}\beta$ have been reported, and thus no data of the reaction enthalpy (and entropy) are available. Here the Cu^{II} binding to $\text{A}\beta_{16}$ and $\text{A}\beta_{28}$ was measured by ITC (Table 1). However, it is important to note that the heat measured, and as a consequence the thermodynamic parameters (K and ΔH), stem from the entire reaction (i.e., from starting reagents to final product) [30–33]. In the present case, the starting reagents are Cu^{II} and $\text{A}\beta$ (and the complex $\text{Cu}^{\text{II}} - \text{A}\beta_{16}/\text{A}\beta_{28}$ is the final product). Both are hydrated and Cu^{II} can even be bound to the buffer. Upon binding of copper to $\text{A}\beta$, the water bound to Cu^{II} is (at least partially) released. Moreover, if Cu^{II} replaces protons from the ligands of $\text{A}\beta$, they will be bound by the buffer. Thus, the measured heat can stem from (1) breaking bonds from Cu to water

Table 1 Values of the binding constant (K), enthalpy (ΔH), and entropy (ΔS) for two Cu-binding sites of amyloid- β -16 ($\text{A}\beta_{16}$) and amyloid- β -28 ($\text{A}\beta_{28}$) obtained from the best fit to isothermal titration calorimetry measurements

	$\text{Cu}^{\text{II}} - \text{A}\beta_{16}$	$\text{Cu}^{\text{II}} - \text{A}\beta_{28}$
K_1 (M ⁻¹)	1.1×10^7	1.5×10^7
ΔH_1 (kcal mol ⁻¹)	-0.42	-0.62
ΔS_1 (cal mol ⁻¹)	31	31
K_2 (M ⁻¹)	1.4×10^5	1.1×10^5
ΔH_2 (kcal mol ⁻¹)	-0.95	-3.25
ΔS_2 (cal mol ⁻¹)	21	11

(and/or buffer), (2) bond formation of Cu with peptide, (3) concurrent changes in hydration upon Cu–peptide complex formation, (4) deprotonation of ligands, (5) proton(s) displaced from the ligand(s) binding to buffer, and (6) structural changes of the peptide. Thus, the thermodynamic parameters obtained are apparent.

Figure 1 shows the integrated data and the best fit after subtraction of the dilution effect (for details, see “Experimental”). Figure 1a and b exhibits the results obtained by titrating 0–2.6 equivalent of Cu^{II} with $\text{A}\beta 16$ and $\text{A}\beta 28$ at pH 7.4, respectively. In either case, the general shape is comparable and in line with two different binding sites. The best fit revealed for either peptide ($\text{A}\beta 16/\text{A}\beta 28$) stoichiometries of 0.8 ± 0.1 and 0.7 ± 0.1 for the first and the second binding site, respectively. This is slightly below the integer stoichiometry of the two binding sites, i.e., $\text{Cu}^{\text{II}}_1\text{-A}\beta 16/\text{A}\beta 28$ and $\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-A}\beta 16/\text{A}\beta 28$ as suggested by spectroscopic data. It is known from the literature that in analysis of calorimetric curves with two binding sites the stoichiometry can vary quite a bit in the best fit [31]. Thus, fits were undertaken in which the stoichiometries were fixed to integer values of 1.0 and 2.0 per peptide. These fits did not change significantly the two other parameters (K and ΔH , see later) and were only slightly inferior in terms of standard deviation.

The apparent binding constants of the high-affinity and low-affinity binding sites were very similar for both peptides, $\text{A}\beta 16$ and $\text{A}\beta 28$. For the high-affinity site

(K_1), the best fits exhibited values from 1×10^7 to $1.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. For the low-affinity binding site, the apparent K_a was about 100 times lower, i.e., $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. The reaction enthalpy of the high-affinity binding site, ΔH_1 , was within the experimental limits not significantly different between $\text{A}\beta 16$ and $\text{A}\beta 28$ (-0.42 compared with $-0.62 \text{ kcal mol}^{-1}$). With the similar binding constants, the entropic contribution was calculated to be $31 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$.

In contrast, the low-affinity binding site showed a significant difference. In the case of $\text{A}\beta 16$, the best fit revealed a value for the reaction enthalpy ΔH_2 of -1 kcal mol^{-1} , whereas in the case of $\text{A}\beta 28$ the reaction enthalpy was three times lower, i.e., -3 kcal mol^{-1} . As a consequence, the entropy of the low-affinity binding site, ΔS_2 , was $21 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ in the case of $\text{A}\beta 16$, but $11 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ in the case of $\text{A}\beta 28$.

Comparing both binding sites of Cu to $\text{A}\beta 16/\text{A}\beta 28$, we find that the high-affinity site has a smaller enthalpic contribution but a larger entropic contribution. As a consequence, it is the higher entropy of the high-affinity binding site which is responsible for the tighter binding. The higher entropic contribution of the binding of the first Cu compared with that of the second could be due to (1) release of more water molecules from the hydrated Cu^{II} upon $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta$ formation, (2) release of more water molecules from the peptide hydration, (3) conformational changes, i.e., lower degree of freedom upon binding of the second Cu^{II} , or (4)

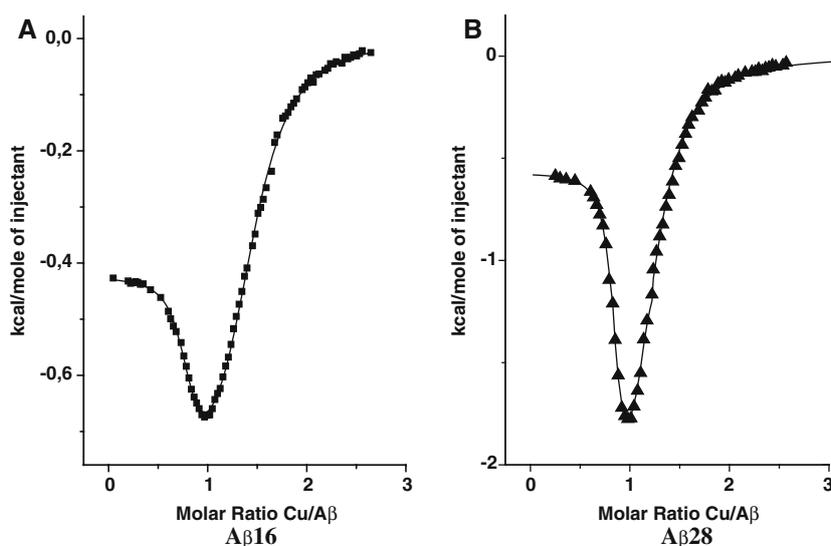


Fig. 1 Binding isotherms of calorimetric titrations of amyloid- β ($\text{A}\beta$) with Cu^{II} . The experiments were performed in 50 mM 2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonic acid (HEPES) pH 7.4, 100 mM NaCl at 298 K. An interval of 300 s between subsequent injections was used. The heat of dilution of CuCl_2 into the buffer has been subtracted. **a** Integrated data of 96

injections (3 μl per injection) of 0.8 mM CuCl_2 into 1.3 ml of 70 μM $\text{A}\beta 1\text{-}16$ ($\text{A}\beta 16$). **b** Integrated data of 59 injections (5 μl per injection) of 0.8 mM CuCl_2 into 1.3 ml of 70 μM $\text{A}\beta 1\text{-}28$ ($\text{A}\beta 28$). The solid line represents the least-squares fit of the data to a two sets of sites binding model

entropic changes due to the protonation of the buffer [proton(s) originating from the ligand displaced by the Cu^{II} binding].

Since the low-affinity binding site cannot be analyzed in the same manner, it is not possible to draw conclusions about the different contributions to the entropy. However, the fact the ΔS_2 is about $10 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ lower in $A\beta 28$ than in $A\beta 16$ can be explained by assuming that a molecule of water was not released upon Cu^{II} binding to $A\beta 28$ (but was in the case of $A\beta 16$). A value of $9.5 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ per water released from Cu has been reported [33]. This would also fit with the fact that the Cu^{II} in the low-affinity binding site in $A\beta 28$ (but not $A\beta 16$) has a weak, labile binding site, likely to be occupied by a water molecule (see later).

The number of protons displaced by the binding of Cu^{II} to $A\beta 16/A\beta 28$ can be principally measured by changing the buffer. The displaced proton will bind to the buffer. The ΔH of proton binding is buffer-dependent. A difference in ΔH of two titrations, which differ only in their buffer, should be only due to the proton binding to the buffer. However, this holds only when one assumes that Cu^{II} alone does not interact with the buffer, which is normally not the case (because in that case the breaking of this Cu^{II} –buffer complex could also contribute to the measured ΔH). It would therefore be possible to determine only the difference in the number of protons displaced between high-affinity and low-affinity binding sites. We tried to perform ITC of Cu^{II} binding to $A\beta 16/A\beta 28$ in other buffers [3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid, cacodylate, and phosphate] but did not get reasonable results, probably owing to precipitation. Reasonable results were obtained in Tris, but Tris is a relatively good ligand for Cu and prevented the detection of the low-affinity binding site.

Fluorescence spectroscopy

The fitting of the ITC data required six parameters: enthalpy, binding constant, and stoichiometry per binding site. Thus, we tried to confirm the parameters obtained using other methods. Several spectroscopic measurements suggested that $A\beta 16/A\beta 28$ has two binding sites with a stoichiometry of 1 and 2 equiv (see later). Since the enthalpy is difficult to obtain by other methods, we measured the dissociation constants K_d of the high-affinity and low-affinity binding sites under the same conditions (buffer, temperature) as we used for the ITC. A competition assay with Cu chelators of known Cu affinity was used and the Cu bound to $A\beta 16/A\beta 28$ was monitored by the fluorescence of Tyr10 in

$A\beta 16/A\beta 28$, which is sensitive to Cu binding. Such fluorescence measurements have been used to determine K_d of the high-affinity binding site of $A\beta 16/A\beta 28/A\beta 40$ under different conditions [29, 22, 27]. However, K_d of the low-affinity binding site has not been reported. Thus, we concentrated on this site.

Figure 2a shows that the addition of Cu^{II} to $10 \mu\text{M}$ $A\beta 16$ causes marked quenching of the tyrosine fluorescence signal at 308 nm. Up to 1 equiv, the quenching is almost linear (Fig. 2a). This is in line with the fact that the dissociation constant of the high-affinity site is much higher, i.e., approximately $0.1 \mu\text{M}$ than the concentration of $A\beta 16$ ($10 \mu\text{M}$) (factor of approximately 100). This means that the Cu from each addition is almost completely bound to the peptide. Above 1 equivalent of Cu, further addition of Cu leads to an

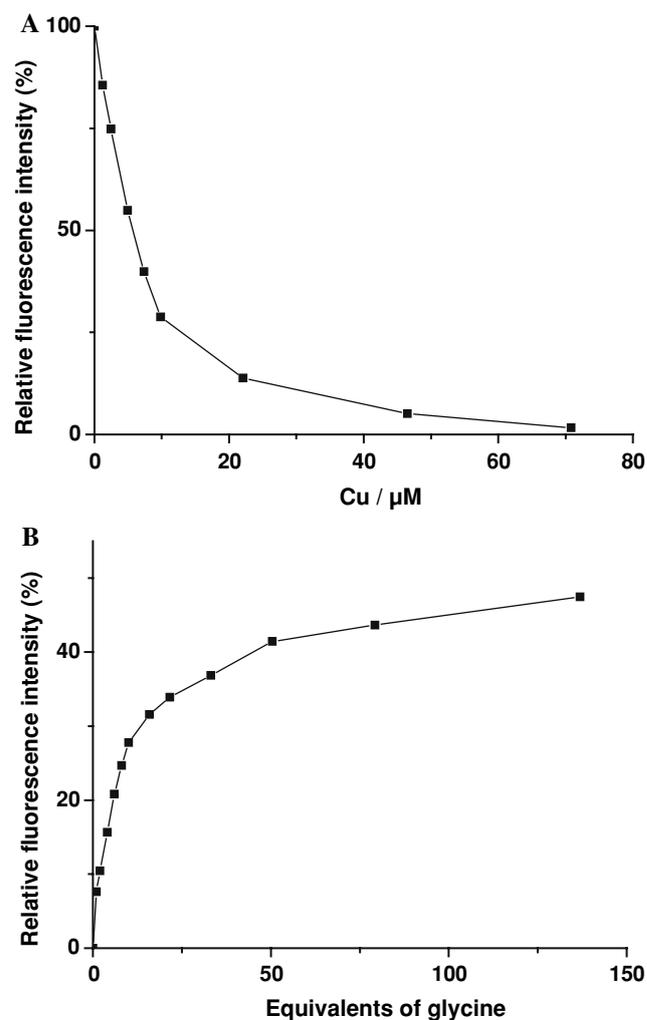


Fig. 2 Fluorescence of Tyr10 of $A\beta 16$. **a** Relative fluorescence intensity of $10 \mu\text{M}$ $A\beta 16$ upon increasing the concentration of CuCl_2 . **b** Relative fluorescence intensity of $100 \mu\text{M}$ Cu^{II}_2 – $A\beta 16$ upon addition of increasing amounts of glycine (buffer 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl)

exponential decrease of the fluorescence. This indicates that the Cu is in equilibrium between free and bound forms, which is in line with a dissociation constant on the same order of magnitude as the concentration of A β 16 (10 μ M). Analyzing the exponential decay (see “[Experimental](#)”), we deduced a dissociation constant of approximately 2×10^{-5} M. This corresponds well to K_d of 10^{-5} M as obtained from the ITC measurements (see before).

Additional measurements using competition experiments with glycine and L-histidine confirmed the values of K_1 and K_2 obtained by ITC. As glycine or L-histidine is added, it competes with A β for the Cu $^{2+}$, and the tyrosine fluorescence signal reappears. Cu $^{2+}$ coordinates to glycine and L-histidine in a 1–2 complex, i.e., Cu II –Gly $_2$ and Cu II –His $_2$. The apparent K_a of Cu II –Gly $_2$ is 7.5×10^5 M $^{-1}$ (at pH 7.4) and that of Cu II –His $_2$ is 2.4×10^8 M $^{-1}$ [34].

As already shown, the first equivalent of Cu II quenched the tyrosine fluorescence by about 70%. The second Cu II equivalent quenched almost the entire residual 30%. Glycine was titrated against A β with 2 equivalents of Cu II bound, i.e., Cu II $_2$ –A β 16. (In order to ensure that also the second equivalent of Cu II is quantitatively bound to A β , the concentration was increased to 100 μ M.) The titration of glycine led to the reappearance of the tyrosine fluorescence (Fig. 2b). Two separated steps can be easily distinguished. The first step is the reappearance of about 30% of the fluorescence after addition of only a few equivalents. This was in line with the withdrawal of the second equivalent (low-affinity binding site). The fact that glycine was able to withdraw the low-affinity binding site Cu readily (about half of it was retrieved after addition of 2 equiv of glycine) indicates that K_a of Cu II –Gly $_2$ is at least as strong as or stronger than that of the low-affinity binding site. This agrees with K_a in the range of 10^5 M $^{-1}$ deduced from ITC and direct fluorescence quenching (see before). After further addition of glycine, i.e., the second step in Fig. 2b, the remaining 70% of fluorescence reappears only slowly, in line with a lower K_a of Cu II –Gly $_2$ than in the high-affinity binding site of A β . This agrees again with the K_d of 10^{-7} M from before.

Analogous titrations of histidine against the Cu II –A β revealed an about 10 times stronger binding of Cu to histidine, in agreement with a K_d of approximately 0.1 μ M for the high-affinity binding site (not shown).

The presence of two specific binding sites to A β 16/A β 28 was also confirmed by treatment with Chelex at pH 7.4 (not shown). Chelex is a modest chelator of Cu II (and other metals). Upon addition of 4 equiv of Cu II to A β 16/A β 28, the treatment with Chelex removed

2 equiv and two Cu II remained bound to A β 16/A β 28 (for details, see “[Experimental](#)”).

Taken together, these spectroscopic measurements confirmed very well the stoichiometry and affinity (K_d) of the high-affinity and low-affinity binding sites of Cu II to A β 16/A β 28 as deduced from ITC.

EPR of Cu binding site

The EPR spectra (supplementary material Fig. S1) of Cu II –A β 16 and Cu II –A β 28 at different pH have already been described in the literature [22, 23, 26]. (Our spectra were principally identical to that in [22]) Thus, in the present study only the low-affinity binding site is reported; its dependence on pH not known so far [35]. Addition of a second equivalent of Cu II to A β 16 and A β 28 at pH 7.4 induced a heterogeneous EPR spectrum with at least two species. These two coordination sites showed parameters very similar to those of the two coordination sites for the high-affinity site. This means that the low-affinity site at pH 7.4 is composed of (at least) two sites, likely with a 3N/1O and 4N environment. In order to better resolve the different spectra of the low-affinity Cu II -binding site, the spectra were recorded at pH 6 and pH 9.

At pH 6, the EPR spectra of A β 16 and A β 28 were very similar and homogeneous, with $g_{\perp} = 2.06$, $g_{\parallel} = 2.27$, and $A_{\parallel} = 157$ G. This is mostly in line with a slightly distorted square-planar coordination of Cu II in a 3N/1O environment [35]. At pH 9, the EPR spectra of the low-affinity binding site were different between A β 16 and A β 28. In the case of A β 28, the EPR spectrum was relatively homogeneous, with parameters $g_{\perp} = 2.06$, $g_{\parallel} = 2.23$, and $A_{\parallel} = 172$ G in line with a 4N coordination. In contrast, the low-affinity binding site of A β 16 was much more heterogeneous, with at least two components: $g_{\perp} = 2.07$, $g_{\parallel} = 2.28$, and $A_{\parallel} = 154$ G (3N1O) and $g_{\perp} = 2.06$, $g_{\parallel} = 2.23$, and $A_{\parallel} = 173$ G (4N).

No indication for a coupling between the first and second equivalent of Cu II (i.e., high-affinity and low-affinity binding sites) was found. Spin quantification revealed that all spins from 0.25 up to 2 equivalents of Cu II were detected. This indicates that the two Cu II sites do not couple.

d – d band of Cu II –A β 16/A β 28

The position of the d – d bands of Cu II depends on the type of ligands. The wavelength of maximum absorption is 620 nm for the high-affinity binding site Cu II –A β 16 and 600 nm for the low-affinity binding site. Both exhibited an extinction coefficient ϵ of about 60 M $^{-1}$. In

the case of A β 28, the maxima were found at about 610 and 600 nm for high-affinity and low-affinity binding sites, respectively. Again, the two ϵ values were around 60 M⁻¹ (data not shown). A maximum at approximately 600 nm of the Cu *d-d* bands indicates that at least two nitrogen ligands are involved [36]. This suggests that the predominant binding site of Cu^{II} to A β 16/A β 28 (high-affinity and low affinity sites) is 2N2O, 3N1O, or 4N, which is in agreement with the EPR data suggesting a 3N/1O or 2N/2O ligation for the major species.

¹H-NMR of Cu^{II}-A β 16/A β 28

The paramagnetic Cu^{II} broadens ¹H-NMR resonances when protons are close by (< 7 Å) owing to the increased relaxation rate of ¹H. The extent of the relaxation rate is strongly dependent on the distance between Cu and ¹H (1/*r*⁶).

NMR studies reported in the literature showed that the addition of Cu^{II} to A β 16, A β 28, and A β 40 affected mostly the resonances of histidine and were thus proposed to be from ligands. A recent study by Syme et al. [22] on A β 16/A β 28 confirmed that the three histidines

were mostly affected, but not the putative ligand Tyr10 [23]. However, no indication for the identity of the oxygen ligand was observed.

¹H-NMR of Cu^{II}-A β 16 at pH 7.4

Figures 3 and 4 show parts of the ¹H-NMR spectrum of apo-A β 16 at pH 7.4 and the subsequent addition of 0.05 and 0.2 equivalents of CuCl₂. In general, broadening of all the resonances could be observed by adding CuCl₂. However, the extent of broadening differed significantly. The largest broadening was observed for Asp1 and the three histidines (His6, His13, and His14). Whereas the broadening on the three histidines has been reported in the literature, no such effect on another amino acid in A β was reported.

Ala2, Arg5, and Val12 were slightly more affected than the rest of the amino acids. These three side chains are very unlikely to be ligands, because valine and alanine are aliphatic and the arginine side chain is not considered to be a ligand to metal ions owing to its high p*K*_a of approximately 12.5. To our knowledge, no arginine side chain clearly has been identified as a metal ligand for a protein or a peptide. Even if it is

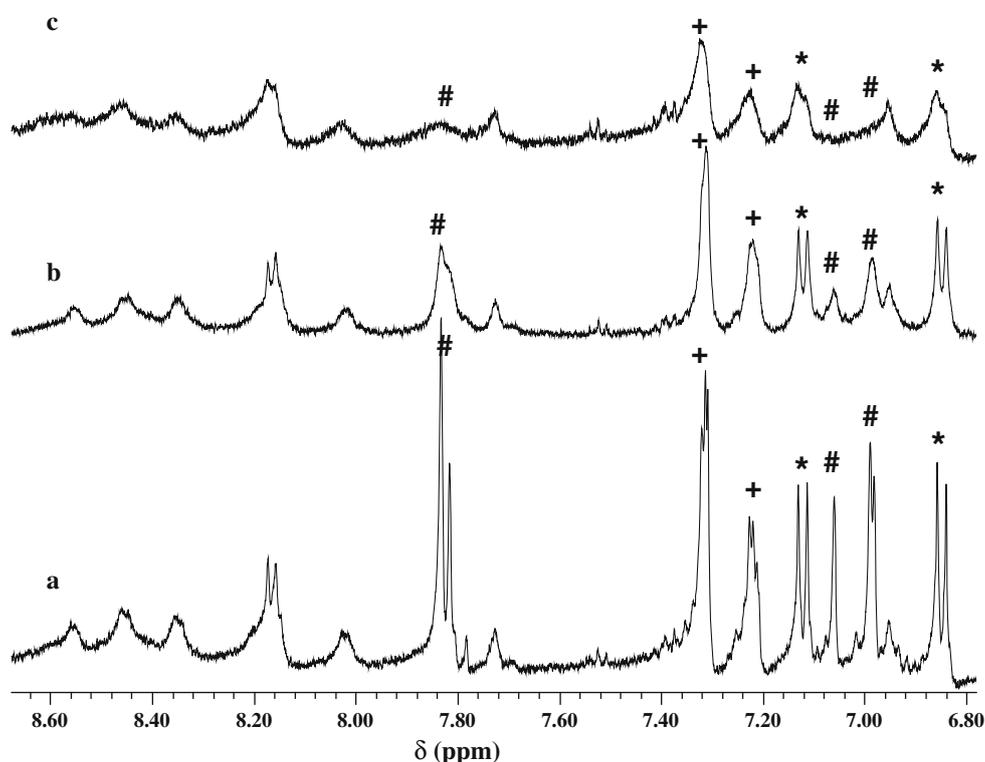


Fig. 3 ¹H-NMR of apo-A β 16 and Cu^{II}-A β 16 pH 7.4. Spectra obtained for 500 μ M A β 16, in 50 mM Tris-*d*₁₁ pH 7.4, 10% D₂O at 293 K, apo (a) and with 0.05 and 0.2 mol equiv of Cu^{II} added (b, c, respectively). The labeled resonances are those of the three

histidines (#: ²H and ⁴H resonances), Phe4 (+: ³⁻⁵H), and Tyr10 (*: ^{2,6}H and ^{3,5}H). Resonances for Tyr10 are relatively unaffected by Cu^{II} addition

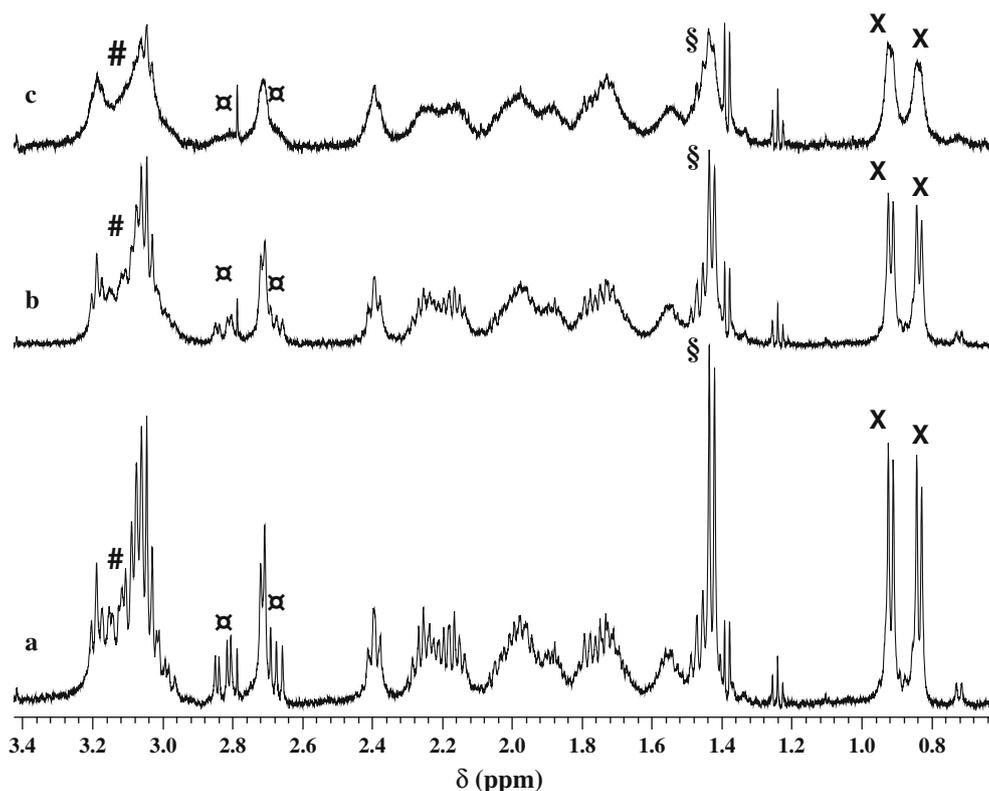


Fig. 4 $^1\text{H-NMR}$ of apo- $\text{A}\beta_{16}$ and $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{16}$ pH 7.4. Spectra obtained at 500 μM $\text{A}\beta_{16}$, pH 7.4, in 50 mM Tris- d_{11} , 10% D_2O at 293 K, apo (a) and with 0.05 and 0.2 mol equiv of Cu^{2+} added

(b, c, respectively). The labeled resonances are those of the three histidines (#: βCH), Asp1 (α : βCH), Val12 (x: βCH_3), and Ala2 (§: βCH_3)

conceivable that arginine ligation could be imposed by a protein, in such a flexible peptide like $\text{A}\beta$ this seems less likely.

However, these amino acids are just next to the most affected residues (Asp1 and His6, His13, and His14), which could explain their more important broadening compared to the bulk residues. Tyr10 is not more affected than the bulk, in agreement with tyrosine not being a ligand (see also later) [23, 27].

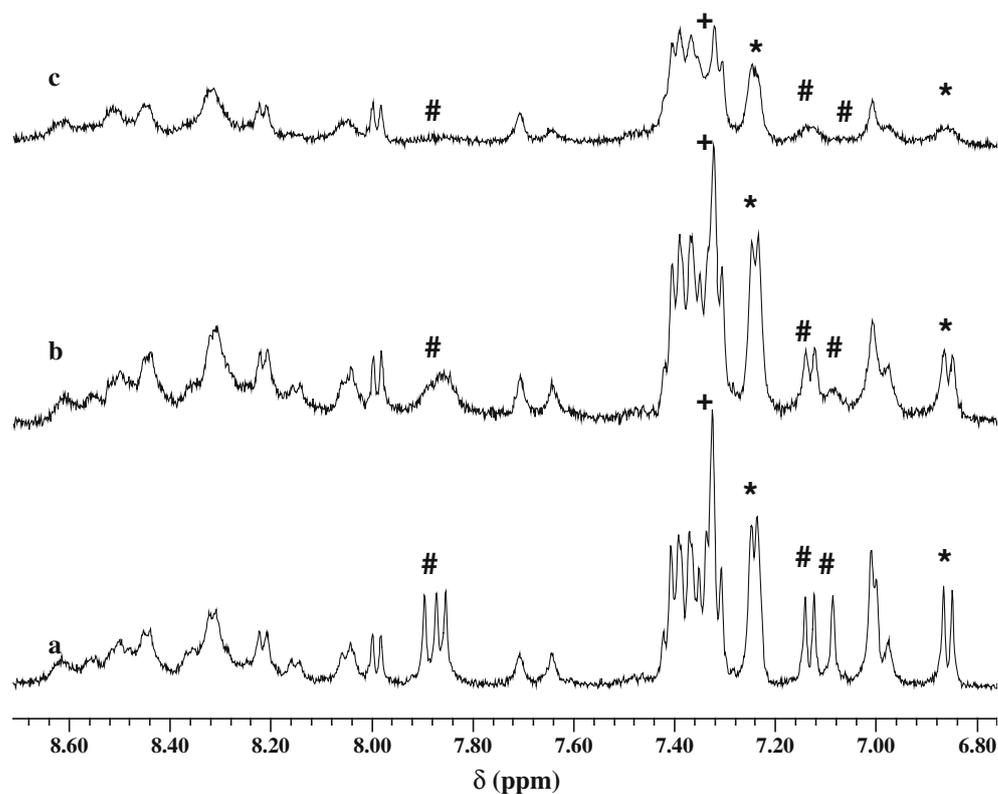
The most likely ligands are Asp1 and the three histidines. EPR at pH 7.4 showed that Cu is bound in a square-planar geometry and has a mixed coordination (3N/1O and 4N) (see before). For the 4N form, the three histidines and the N-terminal amine of Asp1 are the likely ligands. Evidence that the N-terminal amine is a ligand has been reported [22, 23]. For the major 3N/1O form, the oxygen ligand could be a carboxylate side chain of Asp1. This is also supported by the change in the EPR spectrum of $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{2-16}$, in which Asp1 has been removed [27]. However, in this case not only the carboxylate was lacking, but also the N-terminal amine of Asp1, which made it difficult to assign the change exclusively to the absence of the carboxylate of Asp1.

Since the EPR at pH 7.4 showed the mixed coordination (3N/1O and 4N), and at lower pH only the 3N/1O coordination was observed, we undertook NMR measurements at lower pH in order to get more insight into the oxygen ligand.

$^1\text{H-NMR}$ of $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{16}$ at pH 6.5

The effect of Cu^{II} on the $^1\text{H-NMR}$ of $\text{A}\beta_{16}/\text{A}\beta_{28}$ was investigated at pH 6.5. In general, the resonances were less affected and the differences were smaller. However, the resonances, which were mostly affected by adding Cu^{II} were the same as at pH 7.4, i.e., the one from the three histidines and Asp1 (not shown). This suggests that the carboxylate Asp1 is involved in ligation to Cu^{II} . The three nitrogens are likely to be from the three histidines. Thus, the 3N/1O ligation would consist of the imidazole of the three histidines (His6, His13, and His14) and one carboxylate of Asp1. This is supported by the study of Karr et al. [27]. They showed by EPR that upon removal of the first three amino acids (including Asp1) the oxygen ligation was lost. This implied that the oxygen ligand came from one of the first three amino acids. That would mean that the

Fig. 5 $^1\text{H-NMR}$ of apo- $\text{A}\beta_{28}$ and Cu^{II} - $\text{A}\beta_{28}$ pH 7.4. Spectra obtained at 500 μM $\text{A}\beta_{28}$, pH 7.4, in 50 mM $\text{Tris-}d_{11}$, 10% D_2O at 293 K, apo (a) and with 0.05 and 0.2 mol equiv of Cu^{II} added (b, c, respectively). The labeled resonances are from the three histidines (#: ^2H and ^4H resonances); Phe4 (+: $^3\text{-}^5\text{H}$), and Tyr10 (*: $^2,^6\text{H}$ and $^3,^5\text{H}$)



difference between the dominant 4N form at high pH and the 3N/1O form at low pH is just a change from the N-terminal amine of Asp1 to its carboxylate side chain.

$^1\text{H-NMR}$ of Cu^{II} - $\text{A}\beta_{28}$ at pH 7.4

The progressive addition of Cu^{II} to $\text{A}\beta_{28}$ exhibited the following general features, in which the degree of Cu^{II} -induced broadening can be divided into four classes (Fig. 5). The classes are ordered from the most affected by Cu^{II} binding to the weakest affected class. This is interpreted to be due to an increasing distance from the Cu^{II} being responsible for the decrease of the broadening. By far mostly affected were the residues His6, His13, His14, and Asp1, in line with their being ligands to Cu^{II} . Less affected were Ala2, Arg5, and Val12, which are just adjacent to the proposed ligands. Then come the rest of the first 16 amino acids and finally the resonances attributed to residues 17–28, which were generally very weakly affected. This is in agreement with the portion of the first 16 amino acids constituting the Cu^{II} binding domain and residues 17–28 being relatively well separated from the Cu^{II} .

Although this analysis suggests generally a very similar effect of Cu^{II} on $\text{A}\beta_{16}$ and $\text{A}\beta_{28}$ and thus indicates that $\text{A}\beta_{16}$ is a good model for the Cu^{II}

binding to $\text{A}\beta_{28}$, there are nevertheless some minor differences between the two peptides, i.e., in general all of the first 16 residues are more affected in $\text{A}\beta_{28}$ than in $\text{A}\beta_{16}$. This could be due to a more structured Cu -binding site in $\text{A}\beta_{28}$ than in $\text{A}\beta_{16}$ and/or a site which is less dynamic. The fact that substoichiometric addition of Cu to $\text{A}\beta_{16}$ and $\text{A}\beta_{28}$ affects all the $\text{A}\beta$ molecules suggested a fast exchange of the Cu in-between the peptides. Owing to this fast exchange, it cannot be concluded if the broadening of the three histidines and Asp1 is due to a binding of these amino acids at the same time or if it is due to a transient binding of one or more of these ligands (i.e., a fast collision with the individual ligands). However, these results agree with the major 3N/1O environment deduced from the EPR spectrum, which was measured in frozen aqueous solution where rapid exchange of Cu between the peptide cannot occur. These data together with those in the literature suggest that the coordination which explains best the results is one where Cu is bound to the three histidines and to Asp1 primarily by the carboxylate side chain and secondarily by the N-terminal amine or by the carboxylate side chain. Carboxylate and the N-terminal amine could exchange rapidly. This would be in agreement with the EPR data taken at a temperature where the exchange would be frozen out.

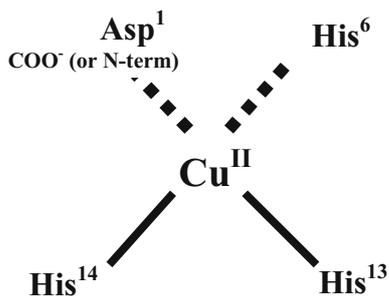


Fig. 6 Model of the binding of the first equivalent of Cu^{II} to $\text{A}\beta_{16}$ and $\text{A}\beta_{28}$ (high-affinity site)

The EPR data indicated two distinct coordinations of the high-affinity binding site, a 3N/1O and a 4N coordination (i.e., three histidines/carboxylate and three histidines/N-terminal amine) (Fig. 6).

The analyses presented here were made for paramagnetic effect of 0.05 and 0.2 equiv of Cu^{II} . A similar conclusion could be drawn from the addition of 0.5 equiv. The addition of 1 equivalent of Cu^{II} broadened all the resonances too strongly for any conclusion to be drawn. However, titration of Cu^{II} against $\text{A}\beta_{16}/\text{A}\beta_{28}$ followed by EPR and electronic absorption spectroscopy did not indicate any change in the Cu-binding site from 0.05 to 1 equivalent, indicating that the binding mode is the same from 0.05 to 1 equivalent.

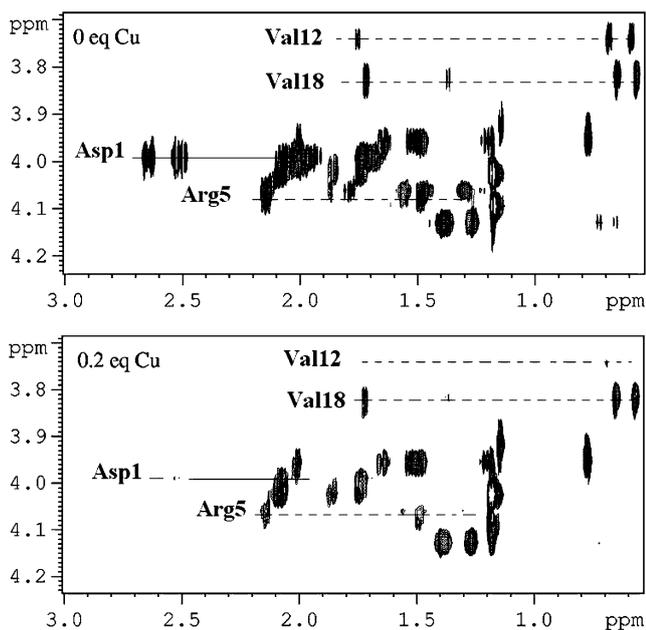


Fig. 7 2D $^1\text{H-NMR}$ of apo- $\text{A}\beta_{28}$ and $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{28}$ pH 6.5. Spectra obtained at 500 μM $\text{A}\beta_{28}$, pH 6.5, in 50 mM Tris- d_{11} , 10% D_2O at 293 K, apo (upper panel) and with 0.2 mol equivalent of Cu^{2+} added (lower panel)

2D $^1\text{H-NMR}$ of $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{28}$ at pH 6.5

Since in the 1D $^1\text{H-NMR}$ the resonances of Asp1 were not that well resolved (not shown), 2D NMR was undertaken to enhance the resolution. The measurements were done at pH 6.5, where EPR showed a homogeneous Cu^{II} -binding site of 3N/1O (see before). Figure 7 shows well-resolved peaks from Asp1, which were strongly affected by the addition of Cu^{II} . In general, the 2D experiments confirmed the results obtained by 1D $^1\text{H-NMR}$ and hence the ligation of Cu^{II} by Asp1 and the three histidines.

$^1\text{H-NMR}$ of $\text{Ni}^{\text{II}}\text{-A}\beta_{16}$

Paramagnetic broadening of the peptide $^1\text{H-NMR}$ spectrum to identify Cu^{II} ligand residues only provided information about the first (high-affinity) Cu^{II} site, because addition of more than 0.5 equiv of Cu broadened the resonances too strongly. In order to gain some insight into the second (low-affinity) binding site, attempts using Ni^{II} as a probe were undertaken. Ni^{II} has been used to probe square-planar Cu^{2+} -binding sites, e.g., in serum albumin [37], and the Cu-binding site of the prion protein around His 111 and His 96 [38]. Ni^{II} in a square-planar environment is normally low-spin and thus diamagnetic. So NMR spectra of Ni^{II} do not suffer from the large broadening upon addition of substoichiometric quantities as is the case for Cu^{II} . Nevertheless, Ni^{II} binding to the peptide/protein should lead to a shift of the resonances of the ligands and hence could lead to the identification of the ligands, also for the second, low-affinity binding site.

$^1\text{H-NMR}$ spectra of $\text{A}\beta_{16}$ loaded with increasing amounts of Ni^{II} were obtained. However, there was no evidence of a low-spin, diamagnetic, square-planar $\text{Ni}^{\text{II}}\text{-A}\beta$ complex, since the incremental addition of Ni^{II} ions caused increased broadening of all NMR signals. No shifts in resonances were observed. This suggests the formation of a paramagnetic, high-spin, tetrahedral or octahedral complex. In agreement with these observations, $d\text{-d}$ absorption bands around 450 nm, characteristic of a Ni^{II} square-planar complex, were not observed. Similar behavior has been described recently in the literature, where the authors tried to probe a Cu-binding octapeptide from a prion with Ni^{II} [39].

Cu^{II} - and pH-dependent absorption of Tyr10 in $\text{A}\beta_{16}$

Tyr10 has been suggested to play an important role in the chemistry and biology of $\text{A}\beta$. In particular, it has

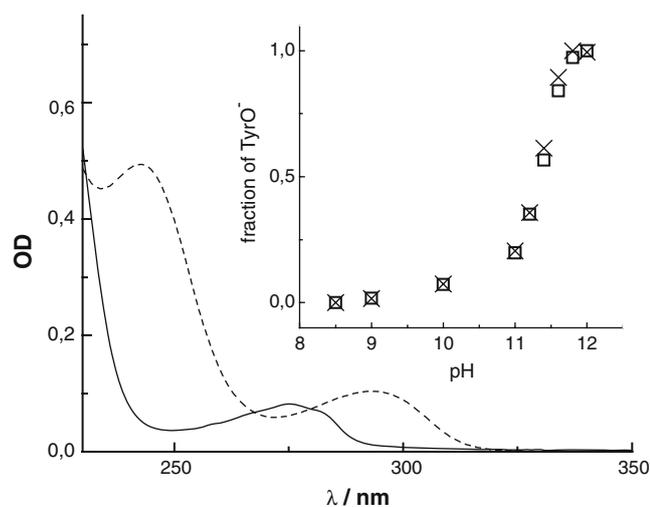


Fig. 8 pK_a of Tyr10 in apo-A β 16 and Cu^{II}-bound A β 16: absorption spectra of A β 16 at pH 7.4 with Tyr10 as tyrosine (solid line) and at pH 12 with Tyr10 as tyrosinate (dashed line). Conditions 60 μ M A β 16; *Inset*: pH dependence of the protonation state of the phenolic proton of Tyr10 in the absence (squares) and presence (crosses) of 1 equiv of Cu^{II} estimated on the basis of the absorption of tyrosinate at 290 nm

been proposed to serve as a ligand for Cu^{II}, Fe^{II}, and Zn^{II}, but it is also implicated in the radical reactions of Cu^{II}-A β (e.g., formation of dityrosines) [21, 40].

In order to investigate the role of Tyr10 in the complexation of Cu^{II}, the pH dependence of the absorption of Tyr10 was measured in the presence and absence of Cu^{II} (Fig. 8). At physiological pH, the addition of up to 4 equiv of Cu^{II} did not influence significantly the absorption spectrum of the tyrosine. Note that Tyr10 is the only tyrosine in the sequence and that no tryptophan is present, thus the absorption above 250 nm is almost exclusively due to the phenolic side chain of Tyr10. If the Tyr10 were a ligand to Cu^{II}, a tyrosinate to Cu^{II} charge transfer transition around 400 nm would be expected [41], but this has not been

observed in A β 16/A β 28 [23]. The tyrosine absorption maximum shifted from 275 to 290 nm as is typical for tyrosinates (not bound to Cu). This suggests that Tyr10 does not form a tyrosinate ligated to Cu^{II}. However, it is also possible that Tyr10 coordinates Cu^{II} (at least weakly) without losing its phenolic proton. In order to investigate this, we measured whether Cu binding to A β 16 has an effect on the acidity of the phenolic proton of Tyr10. A more acidic proton is expected when Cu is bound to the oxygen. Thus, we measured the pH dependence of the absorption spectrum of A β 16. On the basis of the fully protonated and fully deprotonated spectra of tyrosine (Fig. 8, solid and dashed lines, respectively) the pK_a was determined. The pK_a of Tyr10 in apo-A β 16 was approximately 11.3. In the presence of 1–4 equiv of Cu, the apparent pK_a did not change significantly (Fig. 8, inset). This indicates that Tyr10 is not a ligand to Cu^{II} in the high-affinity site, in line with the ¹H-NMR (see before). The same holds for the Cu^{II} in the low-affinity binding site, i.e., that Tyr10 is not a ligand. Moreover, the binding of 1 or 2 equivalents of Cu^{II} does not influence the pK_a of Tyr10, e.g., by a structural change.

Potentiometric measurements of A β 16/A β 28 have reported a much lower pK_a of 9.76–9.96 [23]. The origin of this discrepancy in pK_a is not known, but the present method has the advantage that the protonated and deprotonated forms of tyrosine are well resolved and characteristic for the unique tyrosine.

Interaction of Cu^{II}-A β 16/A β 28 with azide

Small anions are often used to analyze the accessibility of metal centers in proteins. Binding of small anions can occur at weak, labile, or open sites of the metal, e.g., they can replace water bound to the metal. This can give insight into the coordination sphere and more

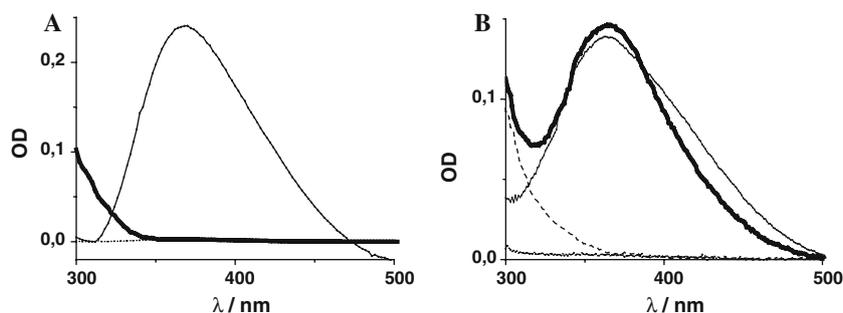


Fig. 9 Absorption spectrum of azide and Cu^{II}_x-A β 16/A β 28 complexes. **a** A β 16: absorption spectrum of 4 mM azide (dotted line), 4 mM azide and 100 μ M Cu^{II} (thin solid line), and 4 mM azide and 100 μ M Cu^{II}₂-A β 16 (thick solid line). **b** A β 28:

absorption spectrum of 4 mM azide (dotted line), 4 mM azide and 50 μ M Cu^{II} (thin solid line), 4 mM azide and 50 μ M Cu^{II}₁-A β 28 (dashed line), and 4 mM azide and 50 μ M Cu^{II}₂-A β 28 (thick solid line). Buffer: 50 mM HEPES pH 7.4

importantly into a weak, labile metal-binding site, which is a prerequisite for a substrate-binding site. Thus, such studies can give information concerning potential catalytic activity of a metal center. Here, we used azide to study the Cu–A β complexes, because azide when it is bound to Cu^{II} exhibits a marked charge transfer band at around 373 nm with an ϵ value of approximately 2,700 cm⁻¹ [42].

Figure 9 shows the optical spectra with the different complexes of Cu–A β in presence of azide. As a control, solutions with identical concentrations of azide and Cu in the buffer (no peptide) were measured and the typical band at 373 nm ($\epsilon \sim 2,700$ cm⁻¹) was observed (Fig. 9, dotted lines). The Cu^{II}₁–A β 16 and Cu^{II}₂–A β 16 complexes in the presence of azide showed no charge transfer at 373 nm; thus, azide does not bind (Fig. 9a, thick solid line). A similar result was obtained for Cu^{II}₁–A β 28, in line with the absence of azide binding to the Cu center. However, surprisingly Cu^{II}₂–A β 28 showed a marked absorption at approximately 370 nm (Fig. 9b, thick solid line). The ϵ value was very similar to that of the control without A β and hence suggests that about 1 equiv of azide was bound to the Cu at the low-affinity binding site. This is a marked difference between the low-affinity binding site in A β 16 compared with that in A β 28.

Conclusion

In general, it can be suggested that A β 16 and A β 28 have two Cu^{II}-binding sites, here called high-affinity and low-affinity binding sites. Both binding-sites are stoichiometric, i.e., the first equivalent binds to the high-affinity binding site and the second equivalent to the low-affinity binding site. The binding sites seem to be relatively well separated. No indication for common, i.e., bridging, ligands to the two Cu sites was found. (EPR did not indicate magnetic coupling between the two Cu centers.) Moreover, the binding of the second equivalent (low-affinity binding site) seems not to change or disrupt the Cu coordination in the high-affinity site.

The first high-affinity Cu site is very similar in both peptides A β 16 and A β 28, but the binding is heterogeneous at pH 7.4. The major component is likely to be 3N/1O provided by three histidines and the carboxylate of the side chain of Asp1; the minor one is three histidines and the N-terminal amine of Asp1 [27, 22]. The same four amino acids have been reported to be involved in Zn^{II} binding to A β 16 at pH 8.7 but not at pH 6.5 [43, 44]. The absence of azide binding suggests that no weak, labile ligand is present and thus also no

H₂O is bound in the axial position. Similar evidence for the absence of H₂O bound to the high-affinity Cu^{II}-binding site in A β 40 fibrils of A β 40 has been suggested from EPR analysis with ¹⁷O-labeled H₂O [27].

The second binding sites of Cu^{II} in A β 16 and A β 28 are quite different. Again EPR showed that the binding site is very heterogeneous and consisted of at least two subsets. By changing the pH to 6 or 9, the EPR spectra were more homogeneous and one subset prevailed. At pH 6, both A β 16 and A β 28 showed a predominant EPR signature, mostly in line with a 3N/1O coordination. In contrast, at higher pH 9, the two peptides were different: the major form of A β 16 was more a coordination of 3N/1O in contrast to that of A β 28, which was more in line with a 4N coordination. Owing to the large broadening from the first equivalent of Cu^{II} added to A β 16/A β 28, no information could be obtained by ¹H-NMR. However, the absorption study suggests that Tyr10 is not a ligand to the Cu^{II} in the low-affinity site (and Tyr10 is not involved in the high-affinity site, see before). EPR measurements indicated the absence of bridging ligands between the two Cu centers; thus Asp1 and the three histidines are not ligands to Cu^{II} in the low-affinity site.

The results of the calorimetry and azide experiments are in line with a water molecule bound to the Cu^{II} in the low-affinity site in A β 28 but not in A β 16. This implies that the low-affinity binding site is not the same in A β 16 and A β 28. Differences between these two peptides in the low-affinity binding site were also found by EPR, in particular at higher pH. The difference could be due to (1) ligation of amino acids 17–28 (which has to be by a nitrogen as suggested from EPR, i.e., ligation from a backbone nitrogen or from the two side chains Asn27 or Lys28 containing nitrogen), (2) the presence of the carboxylate C-terminus in A β 16, which is involved in a peptide bond in A β 28, or (3) structural difference due to the longer peptide.

The apparent binding constant of the high-affinity and low-affinity binding sites were measured by different methods. They all yielded about the same K_d values, i.e., 10⁻⁷ M for the high-affinity binding site and 10⁻⁵ M for the low-affinity binding site. Whereas this is the first report of K_d of the low-affinity binding site, the value for the high-affinity site is in agreement with reports on A β 16 and A β 28 [22]. Also, measurements on A β 40 and most importantly on the fibrils of A β 40 were in the same range [29].

A Cu concentration in the amyloid plaques of about 0.5 mM has been reported [45]. This is likely to be below the concentration of A β in the plaques, which are the main constituent. Thus, in the plaques it seems that only the high-affinity binding site would be occu-

pied. However, the low-affinity binding site could play a role in the case when the Cu is locally more concentrated or when the high-affinity binding site is damaged, e.g., by radical reaction catalyzed by the bound Cu [46].

To conclude, the present studies contributed to a better understanding of the Cu^{II} binding to A β in solution by measuring the thermodynamic parameters, by providing direct evidence that the carboxylate of Asp1 is a ligand, and by probing the access of small molecules to the Cu sites. These aspects are considered to be important for understanding the role of the Cu–A β complexes in AD.

Acknowledgements We would like to thank A. Mari (LCC Toulouse) for EPR measurements, the research groups of B. Meunier (LCC Toulouse) and D. Fournier (IPBS, Toulouse) for access to their equipment, and P. Dorlet (ICMMO, Orsay) and C. Hureau (CEA, Saclay) for helpful discussions. The thesis of L.G. was supported by the European Social Funds.

References

- Glenner GG, Wong CW (1984) *Biochem Biophys Res Commun* 120:885–890
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987) *Nature* 325:733–736
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfey C, Mellon A, Ostaszewsky BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ (1992) *Nature* 359:322–325
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance M (1993) *Science* 261:921–923
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) *Science* 297:353–356
- Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G, Paradis MD, Vonsattel JP, Gusella JF, Beyreuther K, Masters CL, Tanzi RE (1994) *Science* 265:1464–1467
- Multhaup G, Masters CL (1999) *Met Ions Biol Syst* 36:365–388
- Selkoe DJ (2001) *Physiol Rev* 81:741–766
- Bush AI (2003) *Trends Neurosci* 26:207–214
- Suh YH, Checler F (2002) *Pharmacol Rev* 54:469–525
- Morgan C, Colombres M, Nunez MT, Inestrosa NC (2004) *Prog Neurobiol* 74:323–349
- Antzutkin ON (2004) *Magn Reson Chem* 42:231–246
- Cherny RA, Legg JT, McLean CA, Fairlie DP, Huang X, Atwood CS, Beyreuther K, Tanzi RE, Masters CL, Bush AI (1999) *J Biol Chem* 274:23223–23228
- Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, McLean CA, Barnham KJ, Volitakis I, Fraser FW, Kim Y-S, Huang X, Goldstein LE, Moir RD, Lim JT, Beyreuther K, Zheng H, Tanzi RE, Masters CL, Bush AI (2001) *Neuron* 30:665–676
- Huang X, Cuajungco MP, Atwood CG, Hartshorn MA, Tyndall JDA, Hanson GR, Stokes KC, Leopold M, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Saunders AJ, Lim J, Moir RD, Glabe C, Bowden EF, Masters CL, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI (1999) *J Biol Chem* 274:37111–37116
- Phinney AL, Drisaldi B, Schmidt SD, Lugowski S, Coronado V, Liang Y, Horne P, Yang J, Sekoulidis J, Coomaraswamy J, Chishti MA, Cox DW, Mathews PM, Nixon RA, Carlson GA, George-Hyslop PS, Westaway D (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14193–14198
- Bayer TA, Schafer S, Simons A, Kemmling A, Kamer T, Tepest R, Eckert A, Schussel K, Eikenberg O, Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Staufenbiel M, Multhaup G (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14187–14192
- Atwood CS, Moir RD, Huang X, Scarpa RC, Bacarra NME, Romano DM, Hartshorn MA, Tanzi RE, Bush AI (1998) *J Biol Chem* 273:12817–12826
- Zou J, Kajita K, Sugimoto N (2001) *Angew Chem Int Ed Engl* 40:2274–2277
- Curtain CC, Ali F, Volitakis I, Cherny RA, Norton RS, Beyreuther K, Barrow CJ, Masters CL, Bush AI, Barnham KJ (2001) *J Biol Chem* 276:20466–20473
- Miura T, Suzuki K, Kohata N, Takeuchi H (2000) *Biochemistry* 39:7024–7031
- Syme CD, Nadal RC, Rigby SEJ, Viles JH (2004) *J Biol Chem* 279:18169–18177
- Kowalik-Jankowska T, Ruta M, Wisniewska K, Lankiewicz L (2003) *J Inorg Biochem* 95:270–282
- Schoneich C, Williams TD (2002) *Chem Res Toxicol* 15:717–722
- Kowalik-Jankowska T, Ruta M, Wisniewska K, Lankiewicz L (2004) *J Inorg. Biochem* 98:940–950
- Karr JW, Kaupp LJ, Szalai VA (2004) *J Am Chem Soc* 126:13534–13538
- Karr JW, Akintoye H, Kaupp LJ, Szalai VA (2005) *Biochemistry* 44:5478–5487
- Tickler AK, Smith DG, Ciccotosto GD, Tew DJ, Curtain CC, Carrington D, Masters CL, Bush AI, Cherny RA, Cappai R, Wade JD, Barnham KJ (2005) *J Biol Chem* 280:13355–13363
- Garzon-Rodriguez W, Yatsimirsky AK, Glabe CG (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2243–2248
- Atwood CS, Scarpa RC, Huang X, Moir RD, Jones WD, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI (2000) *J Neurochem* 75:1219–1233
- Zhang Y, Wilcox DE (2002) *J Biol Inorg Chem* 7:327–337
- Blasie CA, Berg JM (2002) *Biochemistry* 41:15068–15073
- Blasie CA, Berg JM (2003) *J Am Chem Soc* 125:6866–6867
- Martell AE, Smith RM, Motekaitis RJ (2004) *Database* 46: NIST critically selected stability constants of metal complexes, version 8.0 For Windows
- Peisach J, Blumberg WE (1974) *Arch Biochem Biophys* 165:691–708
- Sigel H, Martin BR (1982) *Chem Rev* 82:385–426
- Sadler PJ, Tucker A, Viles JH (1994) *Eur J Biochem* 220:193–200
- Jones CE, Klewpatinond M, Abdelraheim SR, Brown DR, Viles JH (2005) *J Mol Biol* 346:1393–1407
- Garnett AP, Jones CE, Viles JH (2006) *Dalton Trans* 509–518
- Barnham KJ, Haefner F, Ciccotosto GD, Curtain CC, Tew D, Mavros C, Beyreuther K, Carrington D, Masters CL, Cherny RA, Cappai R, Bush AI (2004) *FASEB J* 18:1427–1429
- Jazdzewski BA, Holland PL, Pink M, Young VG Jr, Spencer DJ, Tolman WB (2001) *Inorg Chem* 40:6097–6107
- Fee JA, Gaber BP (1972) *J Biol Chem* 247:60–65
- Mekmouche Y, Coppel Y, Hochgräfe K, Guilloureau L, Talmard C, Mazarguil H, Faller P (2005) *ChemBioChem* 6:1663–1671

44. Zirah S, Kozin SA, Mazur AK, Blond A, Cheminant M, Segalas-Milazzo I, Debey P, Rebuffat S. (2006) *J Biol Chem* 281:2151–2161
45. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR (1998) *J Neurol Sci* 158:47–52
46. Huang X, Atwood CG, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI (1999) *Biochemistry* 38:7609–7616

DOI: 10.1002/cbic.200600319

Amyloid-Beta Peptide Forms Monomeric Complexes With Cu^{II} and Zn^{II} Prior to Aggregation

Christine Talmard,^[a] Luc Guilloureau,^[a]
Yannick Coppel,^[a] Honore Mazarguil,^[b] and
Peter Faller^{*[a]}

The aggregation of the peptide amyloid- β (A β) into fibrils is considered to be a key event in Alzheimer's disease.^[1–4] In vivo, the most prevalent forms of A β consist of 40 (A β 40) or 42 amino acids (A β 42). Neuronal dysfunction has been proposed to be mediated predominantly by aggregation intermediates rather than fully formed fibrils of these peptides; however, both fibrils and smaller oligomers have been found to be neurotoxic.^[3] Several intermediates have been described, ranging in size from dimers up to large aggregates (diameter of \sim 10 nm).^[2] The conditions that influence aggregation and the formation of intermediates are of great interest, and, here, an important role for Zn^{II} and Cu^{II} has been shown.^[4]

Elevated concentrations of Zn^{II} and Cu^{II} have been found in amyloid plaques. These metal ions bind at the N-terminal (amino acids 1–16) and influence aggregation behavior. Whereas Zn accelerates aggregation, for Cu^{II}, slowing down and acceleration of aggregation have been reported, probably due to the different conditions used.^[5] Under our conditions (see the Supporting Information), the following order, from the highest to the least aggregated, has been measured: [Zn^{II}-A β 40] > [Cu^{II}₂-A β 40] > [apo-A β 40] \approx [Cu^{II}₁-A β 40] > [apo-A β 40, in the presence of the metal chelator deferoxamine].

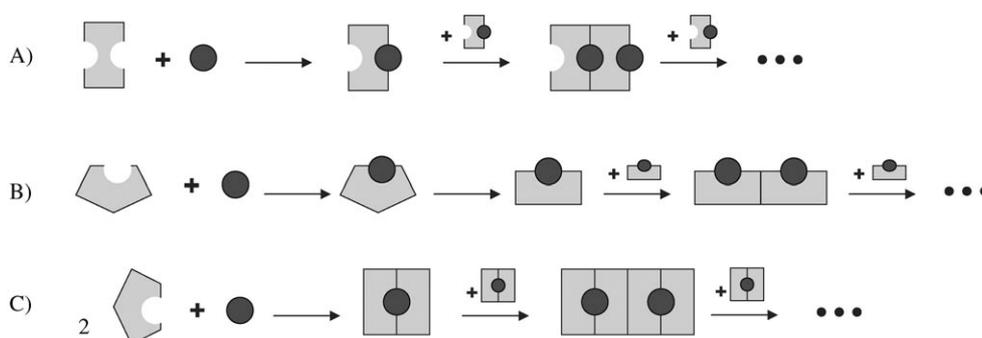
Metal-induced aggregation of a peptide/protein can be conceptually divided into two mechanisms: 1) the metal binds to ligands originating from two molecules of A β and forms a bridge (Scheme 1 A);^[6] 2) the metal binds to A β as a monomeric complex and induces a conformational change that favors aggregation by pure peptide-pep-

ptide contacts (Scheme 1 B).^[7] Intermediate mechanisms are also possible, such as formation of metal-induced dimers (Scheme 1 C), which then aggregate by binding to other dimers by peptide-peptide contacts.

Here we addressed the question of whether metal binding to A β induces dimerization. Such a metal-induced dimer would be of importance because:

- 1) it would give a plausible explanation as to why metal binding can accelerate aggregation (A β dimers facilitate aggregation);^[8]
- 2) it could explain why substoichiometric metal concentrations were sufficient to induce aggregation and why substoichiometric concentrations of metals per A β were found in amyloid plaques;^[9]
- 3) metal-induced dimerization of peptides/proteins is quite a common feature and can be directly related to function;^[10]
- 4) an A β dimer has been isolated from human brain tissue and shown to be neurotoxic;^[2]
- 5) based on low-temperature EPR measurements, it has been suggested that Cu^{II} binds to A β by forming a dimeric complex of the type Cu^{II}₂-A β ₂.^[11]

We used size-exclusion chromatography and pulse field gradient (PFG) NMR diffusion experiments to evaluate the effect of metal binding on the hydrodynamic radius of A β 40/42 and the truncated peptides A β 16 and A β 28 (amino acids 1–16 and 1–28 respectively).^[12] Unexpectedly, the results showed that Cu^{II} or Zn^{II} binding does not increase the hydrodynamic radius (R_h) of A β (and truncated forms); this suggests that the complexes formed remained monomeric.



Scheme 1. Formal mechanisms for metal-induced aggregation of peptides.

[a] C. Talmard, L. Guilloureau, Dr. Y. Coppel, Prof. Dr. P. Faller
Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS UPR 824
associated with the University of Toulouse III
205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex 04 (France)
Fax: (+33) 561-553-003
E-mail: faller@lcc-toulouse.fr

[b] Dr. H. Mazarguil
Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale
205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex 04 (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under
<http://www.chembiochem.org> or from the author: experimental details of
aggregation assay, SEC and PFG NMR diffusion experiments.

Size-exclusion chromatography (SEC) showed a single significant low-molecular-weight peak for apo-, Cu-, and Zn-A β of any length (16, 28, 40, or 42 amino acids). Analyses showed that the metals remained bound quantitatively (see the Supporting Information). This suggested that only one low-molecular-weight species is formed in detectable amounts.

Superposition of the elution volume versus molecular weight (M_r) of A β and its metal complexes, calibration proteins (globular), and oligonucleotides (Figure 1) shows that:

- 1) the different segments are parallel; this confirms that A β 16, A β 28, and A β 40 behave similarly in terms of ratio of elution volume/(log M_r);
- 2) the R_h of A β and its metal complexes is in between that of the globular proteins and the elongated oligonucleotides;
- 3) the complexes Cu $^{II}_{0.5}$ -A β , Cu II -A β and Cu $^{II}_2$ -A β (i.e., half, one, and two Cu per A β , respectively) eluted at the same position as their respective apo forms;
- 4) the Zn-A β complexes eluted later than apo-A β .

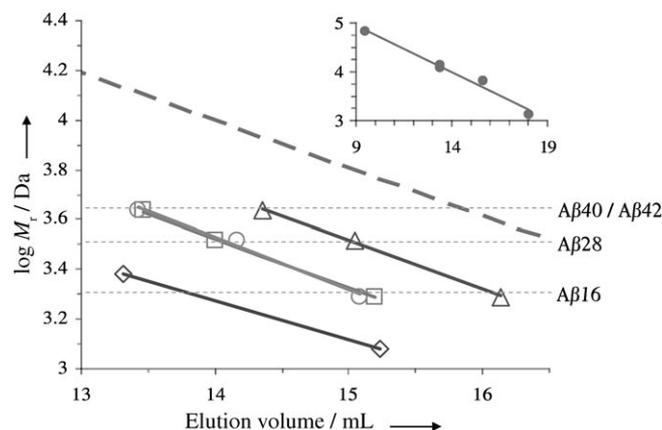


Figure 1. Size-exclusion chromatography of A β (\square) and its metal complexes (Cu \circ , Zn \triangle); calibration molecules (----) and oligonucleotides (of 6 and 12 bases; \diamond). Conditions: 20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl. The graph shows the elution volume versus the molecular weight M_r of the peptides, proteins, or oligonucleotides (only a part of the linear regression from the calibration molecules data is shown on the main graph (----), the entire regression is represented on the small graph).

Based on the calibration proteins, the R_h values of A β and its metal complexes correspond to apparent molecular weights two or three times higher than the real values. In the past, this has led authors to propose that apo-A β 40/42 is a stable di-, tri-, or tetramer (see e.g., ref. [13]), although other methods (PFG NMR diffusion experiments, analytical ultracentrifugation) convincingly suggested a monomer.^[14] To the best of our knowledge, the only publication in which SEC and another technique (PFG NMR diffusion experiments) were measured in parallel concluded that apo-A β 40 is monomeric.^[14a] This partial inconsistency between analyses by SEC and other techniques originates from the fact that, in SEC experiments, the M_r was deduced directly by comparison with the M_r of the calibration

proteins. These proteins have a globular and compact structure, unlike the soluble A β , which is predominantly a random coil.^[14] SEC separates molecules depending on their R_h , which does not only depend on their M_r , but also on their structure. For instance, globular proteins show a two- to fourfold increase in R_h upon denaturation. As an example, oligonucleotides separated by SEC eluted much earlier than a globular, compact molecule of the same M_r , (Figure 1). This is in line with the larger R_h due to their elongated fibrillar structure.

Danielsson et al.^[14b] investigated apo-A β 40 and -A β 28 and showed that they were monomeric and behave in a very similar manner to denatured proteins. The empirical formula R_h (in nm) = $0.027 M_r^{0.5}$ gives a remarkably good fit for unstructured peptides over a wide range of M_r . This formula consists of a modification of the empirical one developed for highly denatured proteins (R_h (in Å) = $2.21 N^{0.57}$, with N = number of amino acids).^[15] These formulae were applied to our measured R_h values, which were determined from the SEC elution volume after calibration of the column with molecules of known R_h . The R_h of apo- and Me $^{II}_x$ -A β were well reproduced when the calculation was based on a monomer, but not when it was based on a dimer (Table 1). Indeed, the ^1H NMR spectrum of A β shows only a moderate shift of a few resonances upon metal binding; this indicates that the soluble Me II -A β is not much more structured than the apo form and justifies the application of the formula for unstructured peptides to Me II -A β .^[16,17]

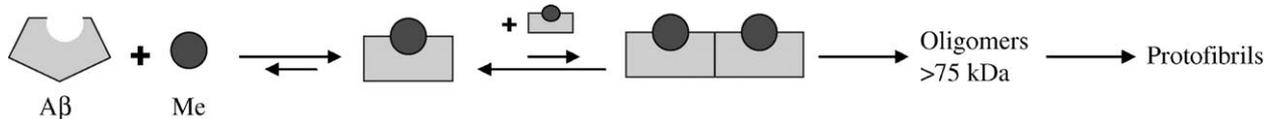
In the case of Zn-A β , the R_h measured by SEC was smaller than those of apo-A β and Cu $^{II}_x$ -A β (Figure 1, Table 1). This could be due to a slightly more structured and compact A β upon Zn binding, as suggested by the NMR structure of Zn-A β 16.^[17] However, a weak interaction of Zn, and then Zn-A β , with the resin of the column cannot be excluded (Supporting Information). In order to confirm these results, apo-A β 16, 28, and 40 and their complexes with 0.2, 0.5 or 1 equiv of Zn were subjected to PFG NMR diffusion experiments. The deduced R_h values agreed quite well with those from SEC (Table 1). For all measured A β , a tendency toward a lower R_h upon Zn binding was observed, in line with the analyses by SEC and in agreement with a monomeric complex.

It is interesting to note that no substantial dimerization could be observed even when half an equivalent of Zn or Cu ions per A β was added, that is, under conditions that are favorable for metal-bridged complexes (see Scheme 1C). This is of biological relevance because metal ions are supposed to be

Table 1. Calculated hydrodynamic radii of A β and its Zn and Cu complexes.

A β	Calculated R_h [nm] from M_r ^[a]		Experimental R_h [nm] from				
	monomer	dimer	apo	Cu	Zn	apo	Zn
16	1.19	1.69	1.37	1.40	1.14	1.16 ± 0.05	1.14 ± 0.05
28	1.54	2.18	1.69	1.64	1.41	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.1
40	1.78	2.52	1.85	1.86	1.59	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2
42	1.81	2.57	1.85	1.86	–	–	–

[a] Calculated according to ref. [14b] [b] Experimental errors in the SEC data are lower than 0.1 nm.



Scheme 2. Putative model for metal-induced aggregation of A β .

substoichiometric to A β in amyloid plaques, and substoichiometric amounts of metal ions are sufficient to induce aggregation of A β .^[14]

Quantification of the SEC experiments indicated that Cu–A β 42 and Zn–A β 28 and 40 aggregated partially at all concentrations used (10–800 μ M). Cu–A β 40 and Zn–A β 16 aggregated only at higher concentrations, and Cu–A β 16 and 28 did not aggregate significantly. In the case of Zn–A β 40 and Cu–A β 42, the monomeric metal complexes accounted only for a fraction of the applied amount. However, no significant peak corresponding to a molecular mass of up to 75 kDa was observed, thus indicating that no stable dimer, trimer, or up to about a 20-mer was formed. With low concentrations of Cu–A β 42, a peak that eluted with the void volume was observed. This peak was only observed in the case of Cu–A β 42, but not with Cu–A β 40, thus indicating a different aggregation path. A similar peak has been reported for apo-A β 40 and was assigned to protofibrils.^[18] These data indicate that Zn and Cu form a monomeric complex with A β 40 or 42, which is transiently formed but stable enough to be observed. Upon aggregation, no relatively stable intermediate of an apparent mass up to 75 kDa could be observed; this indicated that the formation of the dimer is the rate-limiting step at the beginning of the aggregation (see Scheme 2).

It is clear that aggregation has to pass via a dimer, in the presence or absence of metals; however, this dimer is very unstable and rapidly aggregates further. The Zn or Cu binding does not induce substantial amounts of dimers, even under favorable conditions. Thus it seems that A β 40 and 42 has no propensity to form dimers upon metal binding. This points more to a mechanism involving conformational change (Scheme 1 B) than bridging metal ions (Scheme 1 A).

Acknowledgements

We thank Drs. G. Pratviel and B. Meunier (LCC) for the gift of the oligonucleotides. C.T. and L.G. are supported by a grant from the European Social Fond.

Keywords: aggregation · amyloid beta peptides · bioinorganic chemistry · copper · zinc

[1] Y. H. Suh, F. Checler, *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 469–525.

[2] W. L. Klein, W. B. Stine, Jr., D. B. Teplow, *Neurobiol. Aging* **2004**, *25*, 569–580.

[3] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, *297*, 353–356.

[4] a) G. Multhaup, C. L. Masters, *Met. Ions Biol. Syst.* **1999**, *36*, 365–387; b) C. J. Maynard, A. I. Bush, C. L. Masters, R. Cappai, Q. X. Li, *Int. J. Exp. Pathol.* **2005**, *86*, 147–159.

[5] a) C. S. Atwood, R. D. Moir, X. Huang, R. C. Scarpa, N. M. Bacarra, D. M. Romano, M. A. Hartshorn, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12817–12826; b) J. Zou, K. Kajita, N. Sugimoto, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2334–2337; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2274–2277; c) B. Raman, T. Ban, K. Yamaguchi, M. Sakai, T. Kawai, H. Naiki, Y. Goto, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16157–16162.

[6] T. Miura, K. Suzuki, N. Kohata, H. Takeuchi, *Biochemistry* **2000**, *39*, 7024–7031.

[7] a) J. W. Karr, H. Akintoye, L. J. Kaupp, V. A. Szalai, *Biochemistry* **2005**, *44*, 5478–5487; b) X. Huang, C. S. Atwood, R. D. Moir, M. A. Hartshorn, J. P. Vonsattel, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 26464–26470.

[8] A. Schmechel, H. Zentgraf, S. Scheuermann, G. Fritz, R. Pipkorn, J. Reed, K. Beyreuther, T. A. Bayer, G. Multhaup, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35317–35324.

[9] X. Huang, C. S. Atwood, R. D. Moir, M. A. Hartshorn, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 954–960.

[10] a) K. P. Hopfner, L. Craig, G. Moncalian, R. A. Zinkel, T. Usui, B. A. Owen, A. Karcher, B. Henderson, J. L. Bodmer, C. T. McMurray, J. P. Carney, J. H. Petrini, J. A. Tainer, *Nature* **2002**, *418*, 562–566; b) A. D. Frankel, D. S. Bredt, C. O. Pabo, *Science* **1988**, *240*, 70–73; c) E. D. Ciuculescu, Y. Mekmouche, P. Faller, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 903–909.

[11] C. C. Curtain, F. Ali, I. Volitakis, R. A. Cherny, R. S. Norton, K. Beyreuther, C. J. Barrow, C. L. Masters, A. I. Bush, K. J. Barnham, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20466–20473.

[12] A β 16 is the hydrophilic part (eight charges plus the three partially charged His) and the minimal Cu and Zn binding domain. Zn/Cu–A β 16 is not very prone to aggregation and can be seen as a model for soluble Zn/Cu–A β . A β 28 contains the metal-binding domain and has been shown to form fibrils similar to A β 40/42.

[13] W. Garzon-Rodriguez, M. Sepulveda-Becerra, S. Milton, C. G. Glabe, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 21037–21044.

[14] a) B. P. Tseng, W. P. Esler, C. B. Clish, E. R. Stimson, J. R. Ghilardi, H. V. Vinters, P. W. Mantyh, J. P. Lee, J. E. Maggio, *Biochemistry* **1999**, *38*, 10424–10431; b) J. Danielsson, J. Jarvet, P. Damberg, A. Gräslund, *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, S89–S97; c) L. Hou, H. Shao, Y. Zhang, H. Li, N. K. Menon, E. B. Neuhäus, J. M. Brewer, I. J. Byeon, D. G. Ray, M. P. Vitek, T. Iwashita, R. A. Makula, A. B. Przybyla, M. G. Zagorski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1992–2005.

[15] D. K. Wilkins, S. B. Grimshaw, V. Receveur, C. M. Dobson, J. A. Jones, L. J. Smith, *Biochemistry* **1999**, *38*, 16424–16431.

[16] a) Y. Mekmouche, Y. Coppel, K. Hochgraefe, L. Guilloreau, C. Talmard, H. Mazarguil, P. Faller, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1663–1671; b) C. D. Syme, J. H. Viles, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1764*, 246–256; c) C. D. Syme, R. C. Nadal, S. E. Rigby, J. H. Viles, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18169–18177; d) L. Hou, M. G. Zagorski, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9260–9261.

[17] S. Zirah, S. A. Kozin, A. K. Mazur, A. Blond, M. Cheminant, I. Segalas-Milazzo, P. Debey, S. Rebuffat, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 2151–2161.

[18] D. M. Walsh, A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condron, D. B. Teplow, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22364–22372.

Received: July 25, 2006

Published online on December 29, 2006

