

NOM DU LABORATOIRE D'ACCUEIL : **Laboratoire de Chimie de Coordination**

ET DE SON DIRECTEUR : **Azzedine Bousseksou**

SITE WEB DU LABORATOIRE : <https://www.lcc-toulouse.fr> / <https://hureaulab.wixsite.com/equipeflcc>

NOM DU GROUPE DE RECHERCHE QUI ACCUEILLE L'ETUDIANT : Alambic, Equipe F

NOM DES RESPONSABLES DE STAGE : Marielle Drommi, Dr. Esmieu Charlène et Dr Hureau Christelle

COORDONNEES TELEPHONIQUES ET E-MAIL DES RESPONSABLES DE STAGE : 0561333120, marielle.drommi@lcc-toulouse.fr , charlene.esmieu@lcc-toulouse.fr , christelle.hureau@lcc-toulouse.fr

Utilisation de la polarisation de fluorescence pour étudier l'auto-assemblage du peptide amyloïde- β

La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus répandue, et la principale cause de démence dans le monde (World Alzheimer Report 2015). Cette pathologie n'a toujours pas de remède, car pour l'instant aucun traitement n'a réussi à éviter ou arrêter sa progression. Elle est caractérisée par la présence de plaques séniles dans les synapses et de plaques neurofibrillaires dans les neurones. Un large consensus attribue le développement de la maladie d'Alzheimer à la formation des plaques séniles, constituées de peptide amyloïde- β ($A\beta$) agrégé. Ce peptide d'une quarantaine d'acide aminés a la propriété de s'auto-assembler en formant des feuillettes β et les assemblages formés sont insolubles (<http://doi.wiley.com/10.1002/9781119951438.eibc2635>).

L'auto-assemblage d' $A\beta$ est un processus auto-catalytique, qui peut être suivi par plusieurs techniques. La technique la plus couramment utilisée est basée sur un marqueur fluorescent, la thioflavine T (ThT), qui s'intercale entre les feuillettes β des plaques séniles, et ne fluoresce que lorsqu'il est intercalé. Ceci permet de suivre la formation des fibres au cours du temps. Cependant, cette méthode souffre d'inconvénients, notamment le fait que l'intensité de fluorescence dépend de la morphologie des fibres, et n'est donc pas seulement corrélée à la quantité de fibres.

Une nouvelle technique, la polarisation de fluorescence (PF), pourrait être appropriée pour suivre la formation des fibres (<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.063>). Cette méthode consiste en la mesure indirecte de la vitesse de rotation des molécules fluorescentes par une excitation avec de la lumière polarisée linéairement. Cette mesure est ensuite liée à la taille des objets fluorescents.

Différents processus seront étudiés durant ce stage via la PF :

- Le suivi de l'agrégation par la ThT : la PF permettrait de mesurer l'immobilisation de la thioflavine T dans les fibres au fur et à mesure de son intercalation, et d'obtenir de nouvelles informations sur le processus.
- Le suivi de l'agrégation en utilisant un peptide marqué par une fonction fluorescente (FIA β).
- Le suivi de la coupure des fibres par différentes protéases (enzymes hydrolysant les protéines, par ex trypsine...) et de leur désagrégation.

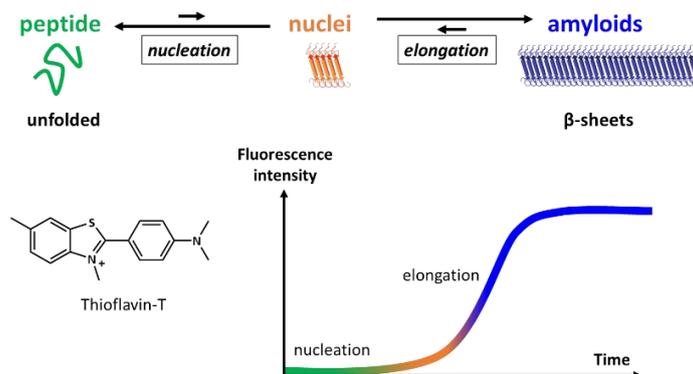


Figure : Processus d'autoassemblage d' $A\beta$, et suivi par mesure de la fluorescence de la ThT.

Ce travail a pour but d'étudier l'auto-assemblage d' $A\beta$ par la polarisation de fluorescence, ainsi que la co-agrégation d' $A\beta$ et FIA β , en présence de différents modulateurs. Ces processus seront étudiés par mesures de fluorescence et polarisation de fluorescence sur des plaques multi-puits. Le candidat / la candidate sera amené-e à faire également des mesures de microscopie électronique en transmission et d'imagerie à force atomique.

Le candidat / la candidate doit être une personne motivée, persévérante et autonome, souhaitant travailler à l'interface entre la chimie analytique et la biologie, dans un environnement multi-disciplinaire. Il/elle doit avoir une expérience en chimie analytique, et être ouvert au fait de travailler avec des objets biologiques.

Use of fluorescence polarization to study amyloid-beta peptide auto-assembly

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease and the major cause of dementia throughout the world. This pathology is still incurable since no therapies have so far reach the objective to prevent or even stop its progression (World Alzheimer Report 2015). It is characterized by the presence of senile plaques in the synapses and neurofibrillary tangles in the neurons. A broad consensus attributes the early development of AD to the development of senile plaques, composed of aggregated amyloid- β peptides ($A\beta$). This 40 amino acids peptides can auto-assemble to obtain β -sheets, forming insoluble fibrils (<http://doi.wiley.com/10.1002/9781119951438.eibc2635>).

The auto-assembly of $A\beta$ is an auto-catalytic process, which can be monitored by various techniques. The most common technique used is based on a fluorescent marker, thioflavin-T (ThT), which intercalates between the β -sheets of the senile plaques, and fluoresces only when intercalated. It allows thus to follow formation of the fibrils over time. However, this method suffers from drawbacks, in particular the fact that the fluorescence intensity depends on the morphology of the fibrils, and is consequently not only correlated to the number of fibrils formed.

A new technique, fluorescence polarization (FP), could be suitable for monitoring fibrils formation (<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.063>). This method involves indirectly measuring the speed of rotation of fluorescent molecules by excitation with linearly polarized light. This measurement is then linked to the size of the fluorescent objects.

Various processes will be studied during this work placement using FP:

- Monitoring of aggregation by ThT: FP will be used to measure the immobilization of thioflavin T in the fibrils as it is intercalated, and to obtain new information about the process.
- Monitoring aggregation using a peptide labelled with a fluorescent function (FIA β).
- Monitoring fibrils cleavage by various proteases (enzymes that hydrolyse proteins, e.g. trypsin) and their disaggregation.

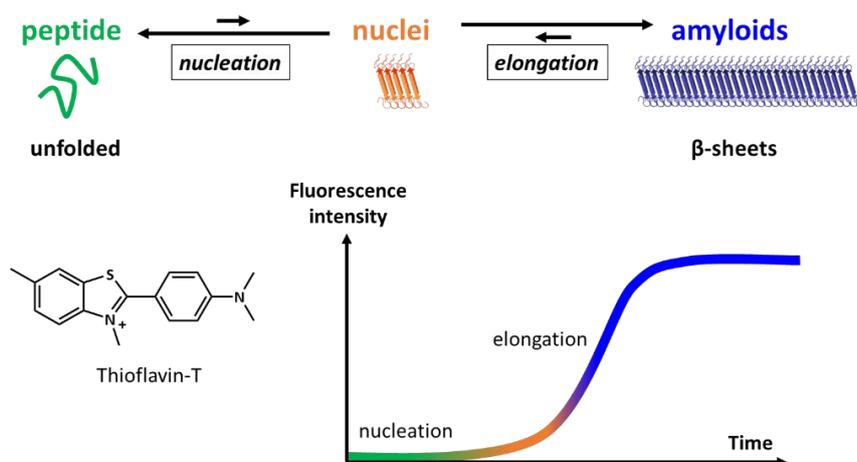


Figure: Auto-assembly of $A\beta$ process and monitoring by ThT fluorescence.

The present work aims at studying the auto-assembly of $A\beta$ by fluorescence polarization, as well as the co-assembly of $A\beta$ -FIA β , in the presence of different modulators. These processes will be monitored by fluorescence spectroscopy and fluorescence polarization measurements on multi-wells plates. The candidate will also do transmission electronic microscopy and atomic force microscopy measurements.

The candidate should be a motivated and perseverant person, willing to work on the interface of analytical chemistry and biology in a multidisciplinary environment. The candidates should have a background in analytical chemistry, and be open-minded to the work with biological objects.