



**HAL**  
open science

## Suivi rhéologique du processus d'agrégation de la protéine tau

Pierre Didier, Florence Razan, Emmanuel Caplain, Christian Delamarche

► **To cite this version:**

Pierre Didier, Florence Razan, Emmanuel Caplain, Christian Delamarche. Suivi rhéologique du processus d'agrégation de la protéine tau. 7ème Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation, Jan 2016, Saint-Nazaire, France. hal-01280228

**HAL Id: hal-01280228**

**<https://hal.science/hal-01280228v1>**

Submitted on 29 Feb 2016

**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.

# Suivi rhéologique du processus d'agrégation de la protéine tau

Pierre Didier<sup>1</sup>, Florence Razan<sup>1</sup>, Emmanuel Caplain<sup>1</sup>, Christian Delamarche<sup>2</sup>, Stéphane Serfaty<sup>1</sup>, Pascal Larzabal<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>SATIE – UMR CNRS 8029 – ENS Cachan, 61 avenue du Président Wilson – 94235 Cachan.

<sup>2</sup>IGDR – UMR CNRS 6290 – Campus de Beaulieu, bât. 13, 35042 Rennes.

pierre.didier@ens-rennes.fr

**Abstract** *Rheological monitoring for tau protein aggregation process.*

*Alzheimer's disease is one of thirty pathology called conformational disease that are characterized by errors folding and assembly of protein. In Alzheimer's disease, tau protein and amyloid beta peptide are responsible of the neuronal degeneration. Understanding these mechanisms and diagnosis are closely linked to the availability of an efficient analytical concept for monitoring ex vivo self-assembly of proteins.*

*To understand the aggregation's mechanism, a microsystem is developed for the detection of protein tau based on the micro-rheological followed by high frequency ultrasonic waves. The sensor used is a TSM (Thickness Shear Mode) resonator operating in shear mode at a fundamental frequency of 5MHz. In contact with the fluid to be characterized, the sensor generate shear waves, which are measured in reflection through instrumentation developed in the laboratory.*

*From the measurement of the complex impedance of quartz with a network analyzer, the extraction of  $G'$  (elastic modulus) and  $G''$  (viscous modulus) is possible.*

*Initial results indicate that our sensor can quantify, by viscosity, concentration variations of a peptide sequence of tau protein, and can differentiate, by plasticity, the conformational state.*

## 1. Introduction

La maladie d'Alzheimer fait partie d'une trentaine de pathologies dites conformationnelles qui sont caractérisées par des erreurs de repliement et d'assemblage de protéines [1][2][3]. Dans la maladie d'Alzheimer deux protéines sont responsables de la défiance neuronale : la protéine tau et le peptide bêta-Amyloïde (A $\beta$  42). La protéine tau (PT) est l'élément principal des dégénérescences neurofibrillaires. Une trop grande phosphorylation de cette protéine aboutit à la formation de dégénérescences et d'agrégats d'enchevêtrements neurofibrillaires (Cf. Figure 1).

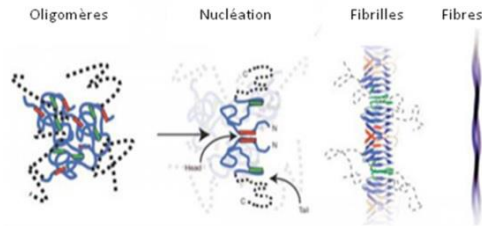


Figure 1 - Mécanisme d'autoassemblage de la protéine tau à l'origine de la maladie d'Alzheimer.

La compréhension de ces mécanismes et le diagnostic sont étroitement liés à la disponibilité d'un concept analytique performant pour le suivi *ex vivo* de l'autoassemblage des protéines. La mise au point de nouveaux systèmes biocompatibles multiéchelles sensibles à l'évolution de ces analytes doit permettre de comprendre les mécanismes moléculaires en vue d'une détection et d'un traitement précoce de la maladie, en particulier en suivant le changement de conformation des protéines concernées. Pour répondre à cette problématique, nous développons un système instrumental permettant la détection d'une des protéines responsables de la maladie d'Alzheimer. Le principe se base sur le suivi des paramètres viscoélastiques par micro-rhéologie ultrasonores hautes fréquences de solutions biologiques dans lesquelles pourraient se trouver les éléments pathogènes tels que PT à l'origine de la maladie d'Alzheimer.

## 2. Principe de fonctionnement du capteur à ondes acoustiques

### 2.1 Le capteur

Le capteur présenté dans cette étude est un résonateur TSM (*Thickness Shear Mode*) fonctionnant en cisaillement. Il est constitué d'un substrat de quartz piézoélectrique optimisé pour obtenir une sensibilité optimale d'interactions entre la surface d'or et PT. Le substrat utilisé est un quartz de coupe AT de 14 mm de diamètre ayant une fréquence fondamentale autour de 5 MHz. Des électrodes de titane et d'or sont fabriquées sur chaque face du quartz, permettant la mise en fonctionnement de notre système, ainsi que la prise de contact électrique. Les capteurs ont été réalisés en salle blanche grâce aux techniques classiques de microfabrication telles que la pulvérisation cathodique, la photolithographie et les techniques de gravure sèche et humide. Les étapes successives permettant l'obtention du capteur sont présentées à la Figure 2. Afin de fabriquer les électrodes sur les deux faces du quartz, le protocole présenté est répété deux fois.

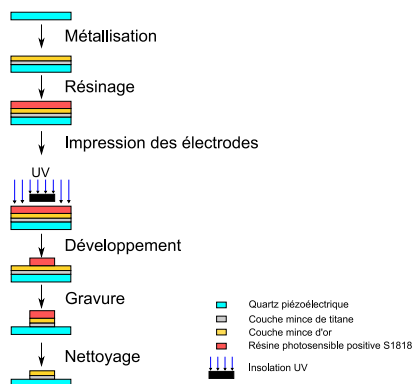


Figure 2, Procédé expérimental de microfabrication.

Les couches minces de titane et d'or constituant les électrodes du quartz d'une surface de 10 mm<sup>2</sup>, font respectivement 30 et 200 nm d'épaisseur, et leurs épaisseurs sont contrôlées par la réalisation de mesures profilométriques à l'aide du profilomètre KLA Tencor. Une mesure typique de hauteur de marche, permettant la vérification des épaisseurs des couches minces déposées, est présentée à la Figure 3.

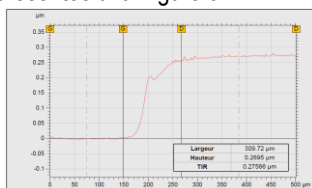


Figure 3 - Mesure de l'épaisseur des couches minces de titane et d'or déposées par profilométrie.

Afin de vérifier le bon fonctionnement du capteur, des mesures d'impédance du quartz ainsi que la détermination du coefficient de qualité via un analyseur de réseau ont été réalisées, et sont présentées à la Figure 4. Elles permettent de mettre en évidence les fréquences de résonance du capteur, ainsi que de valider la qualité de ce dernier, tant au niveau de la microfabrication que de la qualité de la surface d'or.

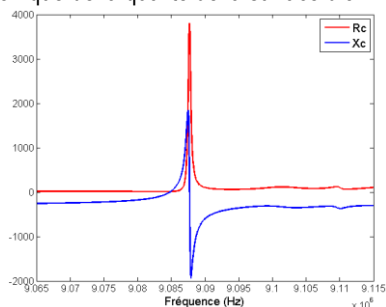


Figure 4 - Partie réelle Rc et partie imaginaire Xc caractéristique de l'admittance d'un quartz coupe AT.

## 2.2 Principe de mesure :

Le capteur à ondes acoustiques possède une fréquence de résonance, propre à ses propriétés intrinsèques (type de matériaux, dimensions du quartz, coupe du cristal) et des propriétés électriques qui vont varier en fonction des dépôts d'espèces chimique ou biologique à sa surface. Ce type de capteur est très largement utilisé dans le domaine de la biologie, de par sa forte sensibilité, ainsi que par ses facilités d'utilisation, son faible coût et l'aspect reproductible lors des tests expérimentaux [4][5].

L'originalité de notre système de mesure est, à partir d'un TSM, de remonter aux paramètres de viscoélasticité ( $G'$  module élastique et  $G''$  module visqueux) [6][7]. Le transducteur piézoélectrique, en contact avec le milieu à caractériser, permet de générer des ondes de cisaillement qui sont mesurées en réflexion à l'aide d'une instrumentation développée au laboratoire (Figure 5). Pour cela, le quartz est inséré dans une cellule de test reliée à un analyseur de réseau qui permet notamment de mesurer l'impédance électrique complexe du quartz ( $R_c$  et  $X_c$ ). A partir de ces informations, il est possible de remonter aux informations de  $G'$  et  $G''$  et de réaliser des mesures de micro-rhéologie haute fréquence sur des petits volumes [8][9].

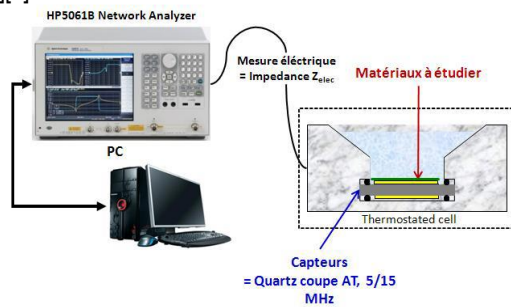


Figure 5 - MicroRhéomètre à quartz.

## 2.3 Modélisation et extraction des paramètres viscoélastiques

Afin d'avoir accès aux paramètres viscoélastiques de la solution à tester, il est nécessaire de modéliser le quartz par un circuit électrique où le quartz, les électrodes, ainsi que la solution test (ou charge) y sont représentés. Le modèle du quartz ainsi obtenu est présenté à la Figure 6. Il est défini par une branche statique décrivant son comportement purement électrique, et une branche dynamique décrivant son comportement électromécanique.

La branche statique peut être modélisée par une impédance  $Z_0$ . Cette impédance regroupe deux effets : l'effet capacitif,  $C_0$ , lié aux courants de déplacement effectifs dans le substrat, et l'effet de pertes diélectriques,  $R_0$ , correspondant aux courants de conduction fictifs dans le substrat [10].

La branche dynamique, quant à elle, est définie par l'impédance  $Z_{meff}$ . L'effet de la charge sur le quartz rajoute une impédance en série dans la branche dynamique  $Z_{charge}$ . C'est à partir de cette impédance que seront extraits les paramètres viscoélastiques de la solution à tester.

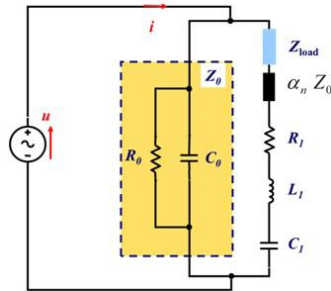


Figure 6 - Modèle électrique du quartz piézoélectrique.

Les mesures expérimentales réalisées avec un analyseur de réseau permettent de déterminer l'impédance de la charge déposée sur le quartz. Grâce à cette impédance et après traitement du signal, il est possible de déterminer les paramètres  $G'$ , module élastique et  $G''$ , module visqueux, définis par :

$$G' \cong \left( \frac{1}{C_0 \omega} \frac{(2n+1)\pi}{4K_0^2 Z_q} \right) \left( \frac{R_c^2 - X_c^2}{2\rho_{matériau}} \right) \quad G'' \cong \left( \frac{1}{C_0 \omega} \frac{(2n+1)\pi}{4K_0^2 Z_q} \right) \left( \frac{R_c X_c}{\rho_{matériau}} \right) \quad (1)$$

où  $R_c$  et  $X_c$  sont, respectivement la partie réelle et imaginaire de l'impédance mesurée par l'analyseur de réseau.  $Z_q$  l'impédance mécanique caractéristique du quartz,  $C_0$  la capacité statique, et  $K_0^2$  le coefficient de couplage électromécanique de cisaillement [11].

### 3. Etude expérimentale

#### 3.1 Caractéristiques de la protéine tau

Dans la maladie d'Alzheimer on distingue les dégénérescences neurofibrillaires dues à l'accumulation de protéines tau dans le corps neuronal provoquant la mort de ce dernier et les plaques amyloïdes issues de la dérégulation de la production, de l'élimination et du repliement des protéines  $A\beta$ . Ces différents éléments biologiques sont actuellement identifiés dans le liquide céphalo-rachidien. De nombreuses études sont à la recherche de ces marqueurs dans d'autres fluides complexes tels que le sang [12].

Pour cette étude, il a été décidé de travailler sur l'héxapeptide VQIVYK, dont la séquence primaire est présentée dans la Figure 7. Le choix de ce peptide se justifie par sa présence au sein de PT en position 306-311 [13]. Ce peptide est nécessaire et suffisant pour l'auto-assemblage de PT [14].

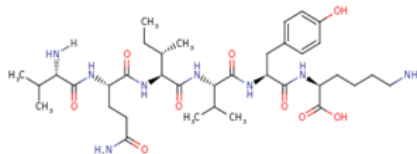


Figure 7 - Séquence peptidique VQIVYK servant à l'étude.

Des études préliminaires en biochimie ont été réalisées sur l'héxapeptide d'étude. Il a été mis en avant trois phases essentielles ; c'est-à-dire une phase de latence pendant laquelle se forme des noyaux de nucléation, une phase rapide de polymérisation et une phase plateau. Ces phases dépendent de la concentration du peptide. En effet, dans nos conditions expérimentales, les peptides, à faibles concentrations ( $c < 30 \mu\text{M}$ ), se présentent sous la forme de noyaux, alors que pour des concentrations plus élevées ( $c > 180 \mu\text{M}$ ), les peptides auront fibrillé pour former des agrégats de plus en plus compacts induisant l'évolution de leurs propriétés viscoélastiques. La concentration de  $120 \mu\text{M}$  est la concentration de critique de déclenchement de la polymérisation. La Figure 8 montre le modèle biologique de la polymérisation de la PT en fonction de la concentration [15].

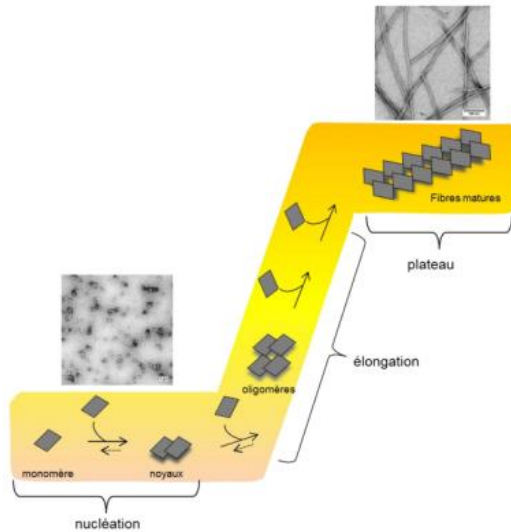


Figure 8 - Modèle biologique de la polymérisation de la protéine tau

### 3.2 Suivi temporel des paramètres $G'$ et $G''$

La première étude a consisté à réaliser la détection de l'héxapeptide d'étude à différentes concentrations sans fonctionnalisation de la surface du capteur.

Pour cela, des concentrations allant de  $30 \mu\text{M}$  à  $480 \mu\text{M}$  de peptide VQIVYK ont été déposées à la surface du quartz. Le début de la courbe de la Figure 9 (jusqu'à 50 min) correspond à une première étape de calibration dans un liquide purement newtonien. Les concentrations de PT ont été ensuite introduites à 50 min. Il apparaît clairement que pour toutes les concentrations, les modules  $G'$  et  $G''$  ont tendance à augmenter après introduction des protéines. Cette augmentation des modules dépend également de la concentration des solutions : pour de faibles concentrations, la variation est moins importante que pour les solutions de protéines de plus fortes concentrations.

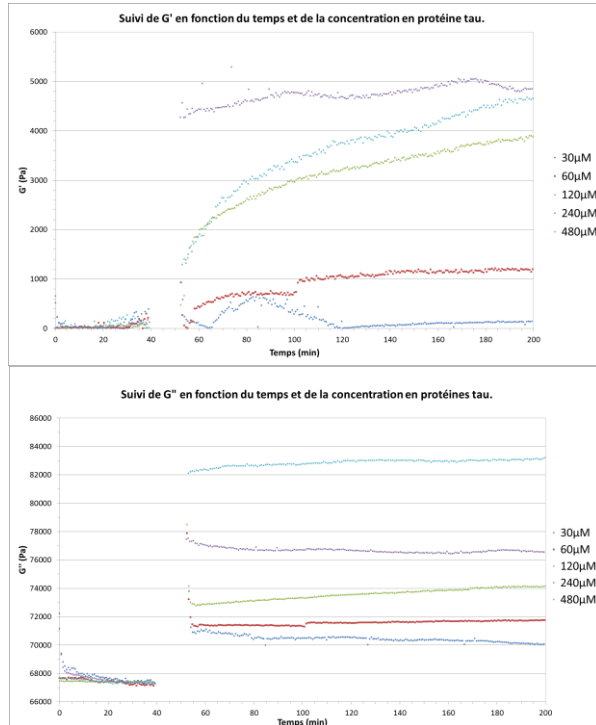


Figure 9 - Paramètres  $G'$  et  $G''$  pour différentes concentrations de protéines en fonction du temps.

Les courbes Figure 9 permettent également de mettre en avant le changement de conformation des peptides. En effet, la variation de  $G'$  permet de différencier les noyaux et les fibres. De ce fait, plus la concentration de peptides est importante, plus ils polymérisent pour former des fibres. Cependant, à partir d'une concentration de  $240 \mu\text{M}$ ,  $G'$  atteint un seuil. Il n'est donc pas nécessaire d'avoir des protéines de plus forte concentration pour pouvoir détecter la polymérisation du peptide.

Grâce au suivi de  $G''$ , donnant des informations sur la viscosité de la solution test, il apparait clairement que plus les concentrations de peptides sont élevées, plus la solution devient visqueuse, sans avoir un impact sur le caractère élastique de la solution. Ces résultats confirment les changements de conformations de la protéine tau observés par analyses biochimiques [15].

## 4. Conclusion

Cette étude interdisciplinaire s'inscrit dans le développement d'un système d'instrumentation allant de la réalisation et de la caractérisation d'un biocapteur à la détection et au suivi d'évolution en passant par la modélisation physique, l'instrumentation et le traitement du signal associé. Les premiers résultats montrent que la détection de différentes concentrations de protéines en conditions statiques sans fonctionnalisation de surface est



réalisable. Il apparaît qu'il est possible avec ce système de discriminer des gammes de concentrations de protéines tau allant de 30 à 480  $\mu\text{M}$  par la mesure de leurs propriétés viscoélastiques. De plus ces résultats confirment les changements de conformations de la protéine tau observés par analyses biochimiques.

## Bibliographie

- [1] T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo, and C. M. Dobson, "The amyloid state and its association with protein misfolding diseases," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 6, pp. 384–396, 2014.
- [2] B. Products, T. Estey, Y. Gokarn, C. Charlie, H. Jr, B. Idec, K. Mattison, M. Pollo, E. Lilly, and J. Richard, "Protein Aggregation in," no. 19, pp. 16427–16432, 2010.
- [3] M. Emily, A. Talvas, and C. Delamarche, "MetAmyl: a METa-predictor for AMYLoid proteins.," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e79722, 2013.
- [4] J. a. Kotarek, K. C. Johnson, and M. a. Moss, "Quartz crystal microbalance analysis of growth kinetics for aggregation intermediates of the amyloid- $\beta$  protein," *Anal. Biochem.*, vol. 378, pp. 15–24, 2008.
- [5] D. a. White, A. K. Buell, C. M. Dobson, M. E. Welland, and T. P. J. Knowles, "Biosensor-based label-free assays of amyloid growth," *FEBS Lett.*, vol. 583, pp. 2587–2592, 2009.
- [6] C. O. Ehssein, S. Serfaty, P. Griesmar, J. Y. Le Huerou, L. Martinez, E. Caplain, N. Wilkie-Chancellier, M. Gindre, G. Gouedard, and P. Figuiere, "Kinetic study of silica gels by a new rheological ultrasonic investigation," *Ultrasonics*, vol. 44, pp. e881–e885, 2006.
- [7] E. Caplain, S. Serfaty, P. Griesmar, J.-Y. Le Huerou, and N. Wilkie-Chancellier, "Viscosimetry using a new electromagnetic-acoustic microbalance," *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 123, no. 5, p. 3836, 2008.
- [8] C. Ould Ehssein, "Système instrumental pour la rhéologie ultrasonore," Université Cergy Pontoise, 2006.
- [9] C. Ould-Ehssein, S. Serfaty, P. Griesmar, J. Y. Le Huérou, E. Caplain, L. Martinez, N. Wilkie-Chancellier, and M. Gindre, "Ultrasonic monitoring of yoghurt formation by using AT-cut quartz: Lighting of casein micelles interactions process during the acidification," *Ultrasonics*, vol. 44, pp. 875–879, 2006.
- [10] E. Caplain, C. O. Ehssein, L. Martinez, S. Serfaty, P. Griesmar, and M. Gindre, "Gelation monitoring by quartz microbalance in pulse mode," in *Ultrasonics Symposium, 2004 IEEE*, 2004, vol. 1, pp. 323–324.
- [11] S. SERFATY, P. GRIESMAR, J.-Y. LE HUEROU, E. CAPLAIN, and Others, "Piezoelectric sensor for the detection and characterization of at least one biochemical element." 2012.
- [12] C. Rosén, O. Hansson, K. Blennow, and H. Zetterberg, "Fluid biomarkers in Alzheimer's disease – current concepts," *Mol. Neurodegener.*, vol. 8, no. 1, p. 20, 2013.
- [13] M. Perez, I. Santa-María, E. Tortosa, R. Cuadros, M. Del Valle, F. Hernández, F. J. Moreno, and J. Avila, "The role of the VQIVYK peptide in tau protein phosphorylation," *J. Neurochem.*, vol. 103, no. 4, pp. 1447–1460, 2007.
- [14] W. J. Goux, L. Kopplin, A. D. Nguyen, K. Leak, M. Rutkofsky, V. D. Shanmuganandam, D. Sharma, H. Inouye, and D. A. Kirschner, "The Formation of Straight and Twisted Filaments from Short Tau Peptides," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 26, pp. 26868–26875, 2004.
- [15] C. Schirmer, "Chaperons moléculaires et tauopathies : effet de Hsp90 sur la fibrillation in vitro du peptide VQIVYK issu de la protéine tau.," Université de Rennes 1, 2014.