

Université de Lille 1 – Sciences et Technologies  
Ecole Doctorale Biologie Santé

## **THÈSE**

Pour l'obtention du grade de

## **DOCTEUR**

Discipline : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

Présentée et soutenue publiquement par

**Clément DESPRES**

Le 27 octobre 2017

## **RÔLE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DANS LE PROCESSUS D'AGRÉGATION DE LA PROTÉINE TAU**

Directeur de thèse : **Dr. Caroline SMET-NOCCA**

### **JURY**

Pr. Michel GOEDERT	Rapporteur
Dr. Pascale BARBIER	Rapporteur
Dr. Marie-Christine CHARTIER-HARLIN	Examineur
Pr. Tony LEFEBVRE	Examineur
Dr. Djemel HAMDANE	Examineur
Dr. Caroline SMET-NOCCA	Directeur de thèse
Dr. Guy LIPPENS	Invité



## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse : le Dr. Michel Goedert ainsi que le Dr. Pascale Barbier en leur qualité de rapporteurs, le Dr. Djemel Hamdane, le Dr. Tony Lefebvre et le Dr. Marie-Christine Chartier-Harlin en leur qualité d'examineurs.

Je remercie ma directrice de thèse, le Dr Caroline Smet-Nocca d'avoir accepté de m'encadrer durant ces trois années. Je tenais aussi à la remercier de m'avoir laissé beaucoup d'autonomie dans mes recherches et de m'avoir accordé sa confiance et son soutien dans les moments difficiles du projet sur l'agrégation qui, soulignons le, aurait pu être abandonné.

Je remercie le Dr Guy Lippens, anciennement responsable d'équipe, et le Dr Isabelle Landrieu de m'avoir accueilli dans l'équipe et donné l'opportunité de faire cette thèse. Je remercie le Dr Guy Lippens pour son soutien et sa collaboration dans le projet « agrégation ». Merci pour ces nombreuses discussions, suggestions et questions qui m'ont permis d'avancer et d'en apprendre davantage sur la protéine Tau.

Merci également au Dr Xavier Hanouille pour ses conseils, questions et remarques pertinentes qui m'ont aussi aidé à avancer dans ce projet.

Un grand (pour ne pas dire énorme) merci au Dr Isabelle Huvent pour ses nombreux et précieux conseils techniques qui m'ont permis de mener à bien ce projet et surtout d'acquérir rapidement toutes les compétences nécessaires à la biochimie des protéines. Merci aussi pour les moments passés dans le laboratoire à rigoler et plaisanter... ça aide pour le moral lorsque le projet n'avance pas comme on le souhaite. Au delà de l'aspect professionnel, je garderai un très bon souvenir de nos nombreuses discussions autour d'un repas ou d'un café.

Une spéciale dédicace pour notre normand national, le Dr. François-Xavier Cantrelle accompagné (ou supporté) par Emmanuelle Boll, *alias* Manue. Tout d'abord, un grand merci de votre soutien et de m'avoir supporté durant la rédaction de ma thèse. Merci aussi de m'avoir formé à la maintenance des spectromètres RMN. Merci à FX pour les innombrables heures passées à m'expliquer la RMN des protéines ainsi qu'à me former à l'utilisation du spectromètre et à l'analyse des données obtenues. Au delà de l'aspect professionnel, merci à eux pour nos moments de rigolades et nos discussions qui, j'espère, continueront après la thèse.

Merci aux anciens membres de l'équipe, les Drs Amina Kamah et Haoling Qi pour la rigueur de leurs travaux sur lesquels je me suis basé pour faire avancer mon projet.

Je remercie tous les membres de l'équipe, les Drs Robert Schneider, Idir Malki, Elian Dupré et Alessia Lasorsa ainsi que Hamida Merzougui.

Je remercie aussi Luiza Mamigonian-Bessa, João Neves et Clément Danis et leur souhaite bon courage pour la suite.

Un grand merci au Dr Xavier Trivelli pour le temps et l'énergie qu'il m'a consacré lorsque j'ai décidé de me lancer dans la RMN du phosphore. Merci aussi d'avoir accepté de relire et corriger mon manuscrit et d'avoir été une oreille attentive lorsque j'étais seul pendant la rédaction de mon manuscrit.

Je remercie le Pr Etienne-Emile Baulieu et le Dr Béatrice Chambraud de l'Institut Baulieu situé au Kremlin-Bicêtre de m'avoir accueilli à plusieurs reprises et de m'avoir montré comment produire l'extrait de cerveau de rat, essentiel à la réalisation de mon projet.

Merci au Pr Christian Hackenberger (FMP-Berlin, Allemagne) ainsi qu'à toute son équipe et plus particulièrement aux Drs Oliver Reimann et Kristina Siebertz de m'avoir chaleureusement accueilli lors de mes deux séjours en Allemagne. Merci aussi de m'avoir initié à la synthèse peptidique.

Je remercie le Pr Gal Bitan et le Dr Jing Di (UCLA, Los Angeles, USA) pour la collaboration sur le projet du lysine tweezer.

Je remercie Nicolas Barois de m'avoir formé à l'utilisation d'un microscope électronique et Etienne Dewally de m'avoir montré la technique de préparation des grilles.

Merci aux Drs Yann Guerardel et Emmanuel Maes ainsi qu'à toute l'équipe « Glycobiologie structurale des interactions hôtes-pathogènes » (UGSF, UMR 8576) de m'avoir accueilli lors de mon stage de master 2 qui est pour moi le point de départ de ma passion pour la recherche.

Un grand merci à ma conjointe qui m'a soutenu et supporté durant ma thèse. Tout d'abord merci pour son soutien permanent et inconditionnel qui m'a permis de prendre de la hauteur, de me rassurer et de me remotiver dans les moments de doute. De plus, merci pour ses nombreux conseils sur l'utilisation des logiciels de création graphique m'ont été d'une très grande utilité dans la rédaction de ce manuscrit.

Un grand merci aussi à mes parents, mon frère et ma sœur qui m'ont toujours soutenu dans mes choix et mes études et ont fait la personne que je suis maintenant, aussi bien humainement que professionnellement. Merci aussi aux autres membres de ma famille pour leur soutien inconditionnel.

Pour finir, un grand merci à mes amis proches qui m'ont soutenu tout au long de cette aventure et m'ont permis de décompresser, notamment le samedi soir autour d'une bière.

*« La science ne doit pas être un plaisir égoïste : ceux qui ont la chance de pouvoir se consacrer aux études scientifiques doivent-étre aussi les premiers à mettre leurs connaissances au service de l'humanité »*

Paul Lafargue (1842-1911)



## Résumé

L'analyse histologique de cerveaux des patients atteints par la maladie Alzheimer met en évidence deux lésions moléculaires majeures : les plaques amyloïdes extraneuronales et les structures fibrillaires intra-neuronales. Alors que les premières sont constituées par l'agrégation du peptide A $\beta$ , les fibres intra-neuronales, aussi appelées PHFs, sont essentiellement formées par l'agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée. De nombreuses études ont démontré une corrélation positive entre l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, la progression de la dégénérescence neurofibrillaire de manière spatio-temporelle dans le cerveau et le stade de la maladie mais, à ce jour, le mécanisme moléculaire liant la phosphorylation et l'agrégation pathologique reste inconnu. De plus, par l'absence de structure tridimensionnelle, la protéine Tau est une cible privilégiée d'un grand nombre d'enzymes telles que les kinases, acétyl- et glycosyl-transférases... impliquées dans la modification post-traductionnelle (MPT) de la protéine. Le rôle de ces autres modifications dans le processus agrégatif n'est pas encore clairement établi et mérite d'être étudié. De plus, l'identification de ces différentes modifications nous a amené à nous interroger sur le dialogue potentiel avec la phosphorylation et leur impact sur l'agrégation de la protéine Tau. Dans ce contexte, par différentes approches *in vitro*, nous avons étudié le rôle de trois modifications clés de la protéine Tau : la phosphorylation (Ser/Thr), l'acétylation (Lys) et l'O-GlcNAcylation (Ser).

Dans un premier temps, en utilisant la kinase Erk2 activée ou l'activité kinase d'un extrait de cerveau de rat, nous avons établi un lien entre phosphorylation et agrégation et avons, pour la première fois, défini le profil minimal de phosphorylation capable de déclencher l'agrégation. Notre étude montre un rôle prépondérant de la triple phosphorylation de l'épitope AT8 (pS202/pT205/pS208) dans la formation des fibres de Tau en l'absence de phosphorylation en S262. Sur la base de cette étude, nous avons proposé un mécanisme moléculaire de l'agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée, amorcé par des interactions électrostatiques intermoléculaires autour du phospho-épitope AT8.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié le rôle de l'acétylation dans le processus agrégatif à travers son dialogue avec la phosphorylation. Nos résultats



préliminaires mettent en évidence une diminution de l'acétylation par la Creb-binding protein (CBP) induite par la phosphorylation et, à l'inverse, peu d'influence de l'acétylation sur la phosphorylation. De plus, l'acétylation induit un retard de l'agrégation de la protéine Tau phosphorylée.

Pour finir, nous avons étudié le dialogue entre O-GlcNAcylation et phosphorylation en mettant en œuvre deux approches pour l'O-GlcNAcylation : la voie enzymatique par l'O-GlcNAc transférase (OGT) et la ligation chimique native. Des études ont montré la présence de plusieurs sites d'O-GlcNAcylation au sein de la protéine Tau, notamment la S400 dans la région C-terminale. Il a été montré que l'O-GlcNAcylation module la phosphorylation et inhibe l'agrégation de Tau. Nos études préliminaires ont montré que la S400 est le site majeur d'O-GlcNAcylation de Tau. Le niveau de glycosylation *in vitro* de Tau par l'OGT étant relativement faible, nous avons utilisé en parallèle l'approche par ligation chimique native pour introduire de manière sélective et quantitative des groupements O-GlcNAc. Cette dernière partie s'est concentrée sur l'étude de deux épitopes pathologiques de la protéine Tau, PHF-1 et AT8.

## Abstract

The brains of patients with Alzheimer's disease (AD) are characterized at the molecular level by two different lesions : extraneuronal amyloid plaques and intraneuronal tangles. Both contain fibrillary structures : the former is composed of insoluble A $\beta$  peptides and the tangles contain paired helical filaments (PHFs) made of Tau proteins as the main constituent. It has been established that Tau is found in an hyperphosphorylated state in PHFs. Numerous studies have demonstrated a positive correlation between hyperphosphorylation of Tau, progression of neurofibrillary degeneration through the brain and stages of the disease but the molecular mechanisms underlying Tau hyperphosphorylation and aggregation in AD are currently unknown. Moreover, due to its intrinsically disordered nature, Tau displays an increased accessibility for lots of modifying enzymes such as kinases, acetyl- and glycosyl-transferases...which are responsible for Tau post-translational modifications (PTMs). The role of these modifications in the pathological aggregation process of Tau protein remains unclear and has to be elucidated. Moreover, identification of these PTMs raises the question of the potential crosstalk with phosphorylation on the pathological aggregation of Tau. In this context, by using different *in vitro* approaches, we have studied the role of three major modifications of Tau: phosphorylation (Ser/Thr), acetylation (Lys) and O-GlcNAcylation (Ser).

We were first able to elucidate the link between phosphorylation and aggregation by using an activated Erk2 kinase or the kinase activity of a rat brain extract and define, for the first time, the minimal pattern of phosphorylation that triggers aggregation. Our data indicate a key role of the triple phosphorylated AT8 epitope (pSer202/pThr205/pSer208) in fibril formation in the absence of phosphorylation of the Ser262 residue. Based on this study, we proposed a molecular mechanism of aggregation of hyperphosphorylated Tau initiated by electrostatic interactions around the AT8 phospho-epitope.

Next, we have investigated the role of acetylation in the aggregation process through the crosstalk with phosphorylation. Our preliminary results suggest a decrease of acetylation by the Creb-binding protein (CBP) induced by phosphorylation but no effect of the acetylation on the phosphorylation pattern was

observed. Moreover, acetylation seems to delay the aggregation of hyperphosphorylated Tau.

Finally, we tried to understand the crosstalk between phosphorylation and O-GlcNAcylation by using two distinct approaches: enzymatic reaction with the O-GlcNAc transferase (OGT) and native chemical ligation. Some studies have shed light on several O-GlcNAc sites on Tau protein, notably the Ser400 located in the C-terminal part. From a functional point of view, O-GlcNAcylation was shown to modulate phosphorylation and inhibit aggregation. Our preliminary data suggest that Ser400 is a major O-GlcNAcylation site. Due to a low level of *in vitro* O-GlcNAcylation obtained with OGT, we have used in parallel a native chemical ligation strategy to selectively and quantitatively introduce O-GlcNAc modifications. This latter strategy has focused on two pathological epitopes of Tau protein, PHF-1 and AT8.

# Sommaire

<b>Remerciements</b>	<b>3</b>
<b>Résumé</b>	<b>8</b>
<b>Abstract</b>	<b>10</b>
<b>Sommaire</b>	<b>12</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>18</b>
<b>Publications</b>	<b>20</b>
<b>Communications</b>	<b>21</b>
<b>Introduction</b>	<b>23</b>
<b>I. Structure, fonction et localisation de la protéine Tau</b>	<b>25</b>
A. Tau : une protéine intrinsèquement désordonnée (IDP)	25
i. Généralités sur les protéines intrinsèquement désordonnées (IDP)	25
ii. Structure et domaines de la protéine Tau	29
B. Fonctions et localisations de la protéine Tau	30
<b>II. Tau et maladies neurodégénératives</b>	<b>32</b>
A. La maladie d'Alzheimer (MA) : découverte de la première Tauopathie	32
B. La maladie d'Alzheimer : une Tauopathie mais pas que...	34
i. Peptide A $\beta$ et plaques séniles	34
ii. Tau et dégénérescence neurofibrillaire	37
iii. Complexité du lien entre le peptide A $\beta$ et la protéine Tau	41
C. Les autres Tauopathies	43
D. Etiologie des Tauopathies	45
<b>III. Tau et modifications post-traductionnelles (MPTs)</b>	<b>47</b>
A. Les modifications post-traductionnelles principales	48
i. La phosphorylation	48
ii. L'acétylation	55
iii. L'O-GlcNAcylation	62
B. Les autres modifications post-traductionnelles	71
i. Modifications covalentes par ajout d'un groupement chimique	72
a. La méthylation	72
b. La polyamination	73
ii. Modifications covalentes par ajout d'un groupement glucidique	74

a.	La N-glycosylation-----	74
b.	La glycation-----	75
iii.	Modifications covalentes par ajout d'un groupement peptidique -----	75
a.	L'ubiquitination -----	75
b.	La SUMOylation -----	76
iv.	Modification par changement conformationnel : les peptidylprolyl <i>cis-trans</i> isomérases (PPIases)-----	77
v.	Modification par clivage peptidique-----	82
vi.	Modification par changement de la nature de l'acide aminé : le cas de la désamidation -----	83
<b>C.</b>	<b>Dialogue et compétition entre modifications post-traductionnelles -----</b>	<b>85</b>
i.	Phosphorylation et O-GlcNAcylation : l'exemple-type-----	86
ii.	Phosphorylation, ubiquitination et SUMOylation-----	88
iii.	Phosphorylation et clivage peptidique -----	88
iv.	Phosphorylation et méthylation-----	89
v.	Méthylation, acétylation et ubiquitination -----	90
<b>D.</b>	<b>Conclusions sur les modifications post-traductionnelles-----</b>	<b>90</b>
<b>IV.</b>	<b>Moyens d'étude des MPTs et agrégation de Tau-----</b>	<b>92</b>
<b>A.</b>	<b>Modélisation de la pathologie Tau : MPTs et agrégation-----</b>	<b>92</b>
i.	Les modèles d'étude <i>in vivo</i> -----	92
a.	Eucaryotes inférieurs-----	92
b.	Vertébrés-----	94
ii.	Le modèle d'agrégation <i>in vitro</i> -----	98
<b>B.</b>	<b>Etude des modifications post-traductionnelles de Tau-----</b>	<b>101</b>
i.	Les techniques biochimiques-----	102
a.	L'autoradiographie et la fluorescence-----	102
b.	L'immunodétection-----	103
ii.	La spectrométrie de masse (MS)-----	105
a.	Généralités-----	105
b.	Application à la détection des MPTs -----	106
iii.	La résonance magnétique nucléaire (RMN) -----	108
a.	Le phénomène de résonance et les noyaux observables -----	108
b.	Application à la détection des MPTs -----	110
<b>V.</b>	<b>Objectifs et stratégie expérimentale-----</b>	<b>112</b>
<b>Résultats</b>	<b>-----</b>	<b>115</b>
<b>Partie 1 : Hyperphosphorylation et agrégation de Tau</b>	<b>-----</b>	<b>117</b>
<b>I. Profil de phosphorylation minimal déclenchant l'agrégation</b>	<b>-----</b>	<b>121</b>

A.	Mutation G207V, phosphorylation et agrégation de la protéine Tau -----	123
i.	La mutation G207V ouvre le tournant du motif AT8 di-phosphorylé-----	123
ii.	L'ouverture du tournant par la mutation G207V combinée à la phosphorylation par ERK2 entraîne l'agrégation -----	126
B.	Conséquences structurales et fonctionnelles du troisième site de phosphorylation de l'épitope AT8, la pSer208-----	127
i.	L'AT8 triplement phosphorylé ne forme plus le tournant autour de la Gly207 ---	127
ii.	La phosphorylation de la Ser208 déclenche également l'agrégation-----	128
iii.	La triple phosphorylation de l'épitope AT8 nécessaire et suffisante pour l'agrégation -----	131
<b>II.</b>	<b>Etude du mécanisme moléculaire de l'agrégation de Tau -----</b>	<b>132</b>
A.	Caractérisation par RMN des Arg209 et Arg211 -----	133
i.	Etude des Arg209 et Arg211 dans le modèle peptidique AT8 [192-212]-----	133
ii.	Etude des Arg209 et Arg211 dans le modèle TauF8 [192-324] -----	137
B.	Conséquence de la mutation des Arg209/211 en Ala209/211 sur l'agrégation de Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat-----	139
i.	Agrégation du fragment TauF8-S262A -----	139
ii.	Agrégation de Tau441-S262A-----	139
<b>III.</b>	<b>Conclusions, discussions et perspectives-----</b>	<b>141</b>
<b>Partie 2 :</b>	<b>Dialogue entre MPTs de la protéine Tau -----</b>	<b>149</b>
<b>I.</b>	<b>Phosphorylation et acétylation-----</b>	<b>152</b>
A.	Stratégie d'étude-----	154
i.	Les différents marquages isotopiques du fragment TauF8 -----	154
ii.	Introduction <i>in vitro</i> des MPTs par la voie recombinante -----	155
iii.	Bilan : stratégie d'étude globale mise en place -----	158
B.	Séquence des réactions et conséquences sur l'agrégation -----	159
i.	Analyse du profil de phosphorylation en fonction de la séquence des réactions	159
ii.	Analyse du profil d'acétylation en fonction de la séquence des réactions -----	160
iii.	Agrégation des différents échantillons générés -----	162
C.	Conclusions, discussions et perspectives -----	163
<b>II.</b>	<b>Phosphorylation et O-GlcNAcylation -----</b>	<b>165</b>
A.	Stratégie de l'EPL : <i>Expressed Protein Ligation</i> -----	166
i.	Généralités -----	166
ii.	Synthèse des peptides en phase solide -----	167
B.	Modifications de deux épitopes pathologiques : AT8 & PHF-1 -----	169
i.	L'épitope PHF-1-----	169

a.	Stratégie	169
b.	Résultats et problèmes rencontrés	172
ii.	L'épitope AT8	175
a.	Stratégie	175
b.	Résultats préliminaires	178
C.	Conclusions, discussions et perspectives	181

## **Partie 3 : Inhibition de l'agrégation par le lysine tweezer CLR01 -183**

<b>I.</b>	<b>Interaction Tau/lysine tweezer (CLR01)</b>	<b>190</b>
A.	Interaction du lysine tweezer avec la protéine Tau native	190
B.	Interaction du lysine tweezer avec la protéine Tau phosphorylée	193
<b>II.</b>	<b>Inhibition de l'agrégation de Tau hyperphosphorylée</b>	<b>194</b>
A.	Le modèle TauF8 phosphorylée par ERK2	194
B.	Le modèle Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat	196
<b>III.</b>	<b>Conclusions, discussions et perspectives</b>	<b>198</b>

## **Conclusion générale -----201**

## **Matériels et Méthodes -----211**

<b>I.</b>	<b>Expression et purifications des protéines recombinantes</b>	<b>213</b>
A.	Protéine Tau et mutants	213
i.	Protocole d'expression	213
a.	Banque d'ADN plasmidique	213
b.	Marquages isotopiques et expression recombinante	214
ii.	Purification par chromatographie	216
B.	Enzymes recombinantes	217
i.	Production des kinases ERK2 et MEK R <sub>4</sub> F	217
a.	ADN plasmidique et protocole d'expression	217
b.	Purification	217
ii.	Production du fragment [1202-1848] de l'acétyl-transférase CBP	218
a.	ADN plasmidique et protocole d'expression	218
b.	Purification	219
<b>II.</b>	<b>Protocoles de phosphorylation et d'acétylation de Tau</b>	<b>219</b>
A.	Phosphorylation <i>in vitro</i> par ERK2	219
B.	Phosphorylation <i>in vitro</i> par l'extrait de cerveau de rat	219

i.	Production de l'extrait -----	219
ii.	Réaction de phosphorylation -----	220
	<b>C. Acétylation <i>in vitro</i> par le fragment de CBP [1202-1848] -----</b>	<b>220</b>
	<b>III. Analyse du profil de modifications et agrégation-----</b>	<b>221</b>
	<b>A. Analyse des modifications par résonance magnétique nucléaire (RMN) -</b>	<b>221</b>
i.	Préparation des échantillon -----	221
ii.	Analyse RMN -----	221
a.	Expériences de bases pour l'analyse de la protéine Tau -----	222
b.	Expériences de bases pour l'analyse des peptides de Tau -----	224
	<b>B. Agrégation <i>in vitro</i> de la protéine Tau -----</b>	<b>225</b>
i.	Réaction d'agrégation -----	225
a.	Modèle d'agrégation induit par l'héparine -----	226
b.	Modèle d'agrégation <u>SANS</u> héparine -----	226
ii.	Observations en microscopie électronique en transmission -----	226
a.	Coloration à l'acétate d'uranyle -----	227
b.	Immuno-marquage -----	227
	<b>Bibliographie-----</b>	<b>229</b>
	<b>Annexes-----</b>	<b>261</b>





## Liste des abréviations

(Ordre alphabétique)

**(n)PDPK** : (non)-*Proline Directed Protein Kinase*

**Ac-CoA** : Acétyl-Coenzyme A

**AICD** : *APP Intracellular Domain*

**APP** : *Amyloid Precursor Protein*

**BSA/SAB** : Sérum Albumine Bovine

**CaMKII** : *Calcium/Calmoduline Dependant Protein Kinase II*

**CBP** : *CREB-binding Protein*

**CDK5** : *Cyclin-Dependant Kinase 5*

**CK** : *Casein Kinase*

**Cryo-EM** : Cryo-Microscopie Electronique

**Cyp** : Cyclophiline

**DAG** : Diacylglycérol

**Dbz** : Acide 3,4-diaminobenzoïque

**DIPEA** : N,N-Diisopropyléthylamine

**DMF** : Diméthylformamide

**DON** : 6-diazo-5-oxonorleucine

**DTT** : Dithiothréitol

**ECR** : Extrait de Cerveau de Rat

**EPL** : *Expressed Protein Ligation*

**ERK2** : *Extracellular signal-Regulated Kinase 2*

**FKPB** : *FK506 Binding Protein*

**Fmoc** : Fluorénylméthoxycarbonyle

**FRET** : *Fluorescence Resonance Energy Transfert*

**FTDP-17** : Démences Fronto-Temporales avec Parkinsonisme liées au chromosome 17

**GFAT** : *Glutamine :Fructose-6 phosphate Aminotransferase*

**GlcNAc** :  $\beta$ -D-N-Acetylglucosamine

**GSK-3 $\beta$**  : *Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$*

**GST** : *Glutathione S-Transferase*

**HAT** : *Histone Acetyl-Transferase*

**HDAC** : *Histone Deacetylase*

**HSQC** : *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

**IDP** : *Intrinsically Disordered Protein*  
**IP3** : Inositol Triphosphate  
**IPTG** : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside  
**LB** : *Lysogeny Broth*  
**MA** : Maladie d'Alzheimer  
**MALDI** : *Matrix Assisted Lazer Desorption Ionisation*  
**MAP** : *Microtubule Associated Protein*  
**MAPK** : *Microtubule Associated Protein Kinase*  
**MARK** : *Microtubule Affinity-Regulating Kinase*  
**MBD** : *Microtubule Binding Domain*  
**MCT** : Modification Co-Traductionnelle  
**MET** : Microscopie Electronique en Transmission  
**MPT** : Modification Post-traductionnelle  
**MS** : *Mass Spectrometry*  
**NOESY** : *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*  
**OGA** : O-GlcNAcase  
**OGT** : O-GlcNAc Transférase  
**PHF** : *Paired Helical Filament*  
**Pin 1** : *Peptidyl prolyl cis-trans isomerase NIMA interacting 1*  
**PKA** : *Protein Kinase A*  
**PP** : *Protein phosphatase*  
**PPiase** : *Peptidyl prolyl cis-trans isomerase*  
**PSEN-1** : *Presenilin-1*  
**PSP** : Paralyse Supranucléaire Progressive  
**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire  
**SIRT1** : Sirtuine 1  
**SUMO** : *Small Ubiquitin Modifier*  
**TEP** : Tomographie par Emission de positons  
**TFA** : Acide TrifluoroAcétique  
**ThS/ThT** : Thioflavine S/T  
**TIS** : Triisopropylsilane  
**TOCSY** : *Total Correlated Spectroscopy*  
**TOF** : *Time Of Flight*  
**TPR** : Tétratricopeptide

## Publications

**Despres, C.**, Di, J., Cantrelle, FX., Huvent, I., Chambraud, B., Klärner, FG., Schrader, T., Landrieu, I., Bitan, G., Smet-Nocca, C. The molecular tweezer CLR01 inhibits the self-assembly and seeding activity of phosphorylated Tau protein through interaction with its microtubule-binding domain. (en cours)

**Despres, C.**, Byrne, C., Qi, H., Cantrelle, FX., Huvent, I., Chambraud, B., Baulieu, EE., Jacquot, Y., Landrieu, I., Lippens, G., Smet-Nocca, C. (2017). Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

Qi, H., **Despres, C.**, Prabakaran, S., Cantrelle, F.-X., Chambraud, B., Gunawardena, J., Lippens, G., Smet-Nocca, C., and Landrieu, I. (2017). The Study of Posttranslational Modifications of Tau Protein by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Phosphorylation of Tau Protein by ERK2 Recombinant Kinase and Rat Brain Extract, and Acetylation by Recombinant Creb-Binding Protein. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 1523, 179–213.

Danis, C.\*, **Despres, C.\***, Bessa, L.M., Malki, I., Merzougui, H., Huvent, I., Qi, H., Lippens, G., Cantrelle, F.-X., Schneider, R., et al. (2016). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Identification of Multiple Phosphorylations of Intrinsically Disordered Proteins. J. Vis. Exp. JoVE.

Lippens, G., Landrieu, I., Smet, C., Huvent, I., Gandhi, N.S., Gigant, B., **Despres, C.**, Qi, H., and Lopez, J. (2016). NMR Meets Tau: Insights into Its Function and Pathology. Biomolecules 6, 28.

Schwagerus, S., Reimann, O., **Despres, C.**, Smet-Nocca, C., and Hackenberger, C.P.R. (2016). Semi-synthesis of a tag-free O-GlcNAcylated tau protein by sequential chemoselective ligation. J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.

## Communications

**Séminaire d'unité UMR8576**, 22 Janvier 2016 (Présentation orale)

« Rôle des modifications post-traductionnelles dans le processus d'agrégation de la protéine Tau : cas de la phosphorylation et de l'O-GlcNAcylation »

**Short Advisory Board DISTALZ**, 21-22 Juin 2016 (Présentation orale)

« Impact of Tau post-translational modifications (PTMs) on its aggregation »

**Journée André Verbert**, 5 Septembre 2016 (Présentation Poster)

**Clément Despres**, François-Xavier Cantrelle, Béatrice Chambraud, Isabelle Landrieu, Guy Lippens, Caroline Smet-Nocca. « Deciphering the molecular mechanism of Tau aggregation : essential role of the triple- phosphorylated state of AT8 epitope. »

**Longevity First international symposium research on healthy ageing**, 8-9 Décembre 2016 (Présentation Poster)

**Clément Despres**, François-Xavier Cantrelle, Béatrice Chambraud, Isabelle Landrieu, Guy Lippens, Caroline Smet-Nocca. « Deciphering the molecular mechanism of Tau aggregation : essential role of the triple- phosphorylated state of AT8 epitope. »

**1st EuroTau Meeting**, 27-28 Avril 2017 (Présentation Poster)

**Clément Despres**, François-Xavier Cantrelle, Béatrice Chambraud, Isabelle Landrieu, Guy Lippens, Caroline Smet-Nocca. « Deciphering the molecular mechanism of Tau aggregation : essential role of the triple- phosphorylated state of AT8 epitope. »

**6<sup>ème</sup> Rencontres RMN-RPE**, 6 Juin 2017 (Présentation Orale)

« NMR : a tool for post-translational modification (PTMs) investigations in Alzheimer Disease »



# Introduction





## I. Structure, fonction et localisation de la protéine Tau

### A. Tau : une protéine intrinsèquement désordonnée (IDP)

#### i. Généralités sur les protéines intrinsèquement désordonnées (IDP)

Les protéines sont des macromolécules biologiques présentes dans toutes les cellules eucaryotes ou procaryotes. Celles-ci assurent une multitude de fonctions permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire et se posent donc en tant qu'acteurs incontournables du bon fonctionnement de l'organisme. En effet, celles-ci sont aussi bien impliquées dans le métabolisme cellulaire (réactions de synthèse et de dégradation) que dans le maintien de la structure intrinsèque de la cellule (protéines du cytosquelette) en passant par la régulation des mécanismes de division. Du fait du rôle central occupé par ces macromolécules, la communauté scientifique s'est accordée sur le fait que la compréhension des mécanismes physiologiques et/ou pathologiques nécessitait l'étude des protéines aussi bien du point de vue fonctionnel que structural et moléculaire. On parle du paradigme « Séquence primaire – Structure – Fonction ». Selon ce paradigme, nous pouvons donc définir une protéine comme une ou plusieurs chaînes d'acides aminés qui se replient dans l'espace pour adopter une structure tridimensionnelle qui sera synonyme de fonctions biologiques. Ainsi l'absence de structure impliquerait une absence de fonction. Pour illustrer ce paradigme, nous pouvons citer le cas de l'hémoglobine et de la myoglobine dont les structures furent résolues respectivement en 1959 par Max Perutz et en 1957 par John Kendrew, par diffraction des rayons X. L'établissement de cette structure a permis de comprendre l'implication de l'hémoglobine dans le transport de l'oxygène. Au delà de cette découverte, cette date peut-être définie comme la naissance de la biologie structurale « moderne ».

Les protéines intrinsèquement désordonnées (IDP) s'opposent à ce paradigme par l'absence de structure tridimensionnelle stable qui n'est pas synonyme d'absence de fonction biologique puisque les IDPs interagissent avec un grand nombre de partenaires. Dans ce cas, la séquence primaire détermine directement l'absence de structure 3D plutôt que le repliement (Habchi et al., 2014). Des études statistiques de séquences ont confirmé qu'en conditions physiologiques (salinité, pH, température...) il existe une corrélation directe entre le nombre de

charges, le nombre de résidus hydrophobes et la nature désordonnée de la protéine (Uversky, 2002). Ainsi, la structure des IDPs peut être définie comme un ensemble hétérogène de conformères, qui peuvent localement présenter des structurations secondaires ou tertiaires transitoires, et qui n'ont pas tous le même minimum énergétique ce qui implique des conformations préférentielles (Habchi et al., 2014). Énergétiquement, la barrière entre les différentes conformations étant inférieure à l'énergie due à l'agitation thermique, la protéine peut passer très rapidement d'une conformation à l'autre. En réalité, on note qu'il n'y a pas de séparation nette entre les IDPs et les protéines globulaires mais plutôt un continuum de structures qui vont de la conformation « *random coil* » à des structures très rigides (**figure 1**).



**Figure 1** : Représentation schématique du continuum existant entre les protéines globulaires, très rigides (à gauche) et les protéines totalement désordonnées, ne présentant aucune structuration (à droite) (Habchi et al., 2014)

Par la découverte des IDPs, le paradigme initial est remis en cause et une nouvelle vision de l'activité protéique émerge. Au-delà de la relation structure/fonction, un troisième degré de complexité est ajouté à l'équation : la fluctuation temporelle conformationnelle. Le modèle n'est donc plus figé et l'étude des IDPs nécessite donc l'étude de l'ensemble des conformations en échange dynamique : on parle de nuage conformationnel (Dunker et al., 2013). Sur la base de la relation structure/fonction, l'hypothèse théorique est donc la suivante : si on détermine le nuage conformationnel ainsi que la dynamique d'une protéine donnée dans des conditions données, nous pourrons prédire son activité.

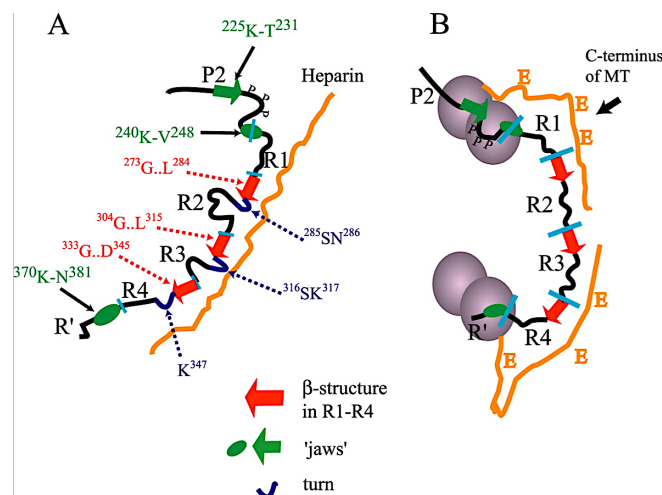
Dans la nature, il existe de nombreuses protéines et domaines intrinsèquement désordonnés. Des études réalisées sur les génomes des archaebactéries, procaryotes et eucaryotes ont montré que le pourcentage d'IDP augmente avec la complexité des organismes : 30% d'IDP chez les eucaryotes contre 4% chez les bactéries (Ward et al., 2004). L'absence de structure tridimensionnelle stable

confère aux IDPs une grande flexibilité et donc une adaptabilité de liaison avec un grand nombre de partenaires ce qui les implique dans de nombreux processus biologiques. De manière générale, les IDPs s'inscrivent dans les voies de régulation et de signalisation mais sont très peu représentées dans les mécanismes enzymatiques du métabolisme (Habchi et al., 2014). Sans faire une liste exhaustive, on peut plus précisément citer quelques rôles clefs des IDPs :

- Site de modifications post-traductionnelles : du fait de l'absence de structure 3D, les IDPs sont une cible privilégiée des enzymes de modifications. Par exemple, la protéine Tau est le substrat de nombreuses enzymes de modifications telles que les kinases, acétyl-transférases, glycosyl-transférases... (Morris et al., 2015). Cet aspect sera développé dans la suite de ce manuscrit.
- Régulatrices d'activité enzymatique : c'est probablement la fonction des IDPs la plus facile à interpréter si on se réfère au paradigme structure-fonction. Les IDPs peuvent être impliquées dans un grand nombre de complexe et jouer des rôles antagonistes. C'est notamment le cas pour la Thymosin  $\beta$ 4 (43 acides aminés, codée par le gène TMSB4X) qui inhibe la polymérisation de l'actine G en séquestrant cette protéine (Domanski et al., 2004) mais peut, dans certaines conditions, activer l'ILK (*integrin-linked kinase*) impliquée dans la transduction du signal (Bock-Marquette et al., 2004).
- Chaperonne/stabilisatrice de complexe : beaucoup d'IDPs ont des fonctions stabilisatrices de complexes comme notamment la protéine Tau qui stabilise les microtubules (Morris et al., 2011). Outre ses capacités de stabilisation, la protéine Tau va aussi jouer un rôle catalytique dans la formation des microtubules en catalysant la polymérisation de la tubuline (Morris et al., 2011). Elle apparaît donc comme un bon représentant des IDPs, d'une part par l'absence de structure tridimensionnelle, et d'autre part par son implication dans le fonctionnement cellulaire, plus particulièrement au niveau neuronal.

Concernant la nature physique de l'interaction stabilisatrice du complexe protéine/protéine, la plupart des complexes structurés (au sens classique du terme) sont stabilisés par des interactions covalentes, électrostatiques et/ou hydrophobes

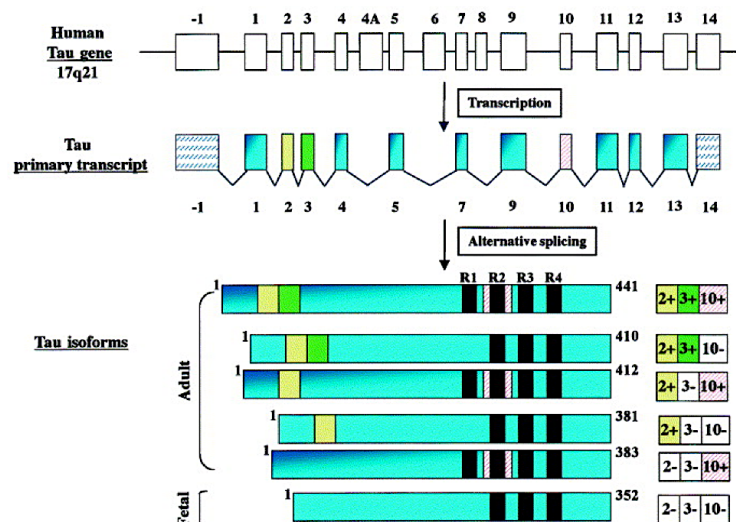
(Chen and Brooks, 2007). En revanche, dans le cas de complexes impliquant les IDPs, l'interaction électrostatique se révèle être essentielle dans l'établissement et la stabilisation des interactions IDPs/partenaire (Zhang et al., 2012). Ceci s'explique par les propriétés intrinsèques des IDPs qui peuvent présenter des points isoélectrique (pI) extrêmes (Tau pI 8,24 ; Alpha-synucléine pI 4,67). Un exemple illustrant cette contribution forte des interactions électrostatiques est l'interaction de Tau (cationique à pH physiologique) avec l'héparine (**figure 2-A**) (polyanion), se traduisant par l'agrégation de la protéine et la formation de structure *PHF-like* (*Paired Helical filament*) (Sibille et al., 2006). Un autre exemple pour lequel les interactions électrostatiques jouent un rôle central dans l'établissement et la stabilisation du complexe avec le partenaire est l'interaction Tau/tubuline (**figure 2-B**). En effet, la protéine Tau va se lier fortement au microtubule avec ses régions N- et C-terminales en saillie extérieure. Cette interaction est majoritairement dictée par l'interaction de Tau, cationique à pH physiologique, avec la queue polyglutamate anionique de la tubuline, constituant principal des microtubules (Gigant et al., 2014; Morris et al., 2011; Mukrasch et al., 2007; Sillen et al., 2007).



**Figure 2 :** Schéma montrant l'interaction de Tau4R avec l'héparine (**A**) et la queue Ct polyglutamate de la tubuline (**B**). Quel que soit le modèle considéré, on constate que l'assemblage repose sur des interactions électrostatiques entre la partie basique de la protéine Tau (présentant une concentration plus importante en lysines que le reste de la protéine) et les régions polyanioniques de l'héparine et des microtubules (Mukrasch et al., 2007)

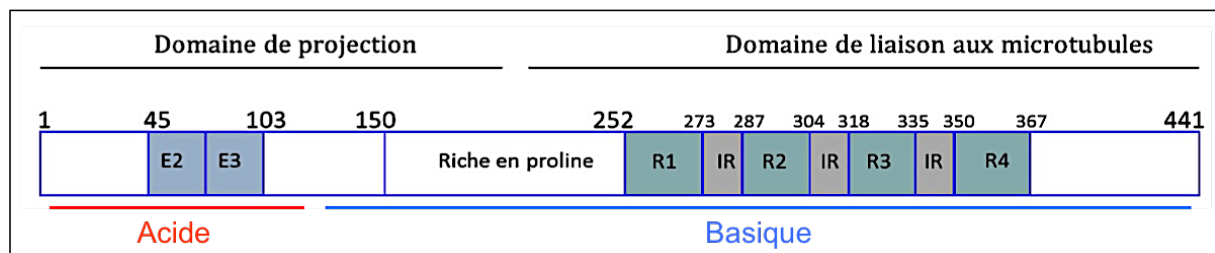
## ii. Structure et domaines de la protéine Tau

Tau est une protéine intrinsèquement désordonnée qui appartient à la famille des MAP (*Microtubule Associated Protein*). Le gène codant pour cette protéine est localisé sur le bras long du chromosome 17 (17q21). La transcription de ce gène conduit à un pré-ARNm de 16 exons. Dû à l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 du pré-ARNm de la protéine, 6 isoformes sont retrouvées dans le cerveau humain adulte. Celles-ci se distinguent par la présence de 0, 1 ou 2 inserts de 29 acides aminés (N) dans la région N-terminale et par la présence de 3 ou 4 segments répétés (R) dans la partie C-terminale de la protéine (**figure 3**). L'isoforme la plus longue, est l'isoforme 2N4R composée de 441 acides aminés et donc porteur de deux inserts Nt et quatre segments répétés dans la partie Ct (Luc Buée, 2000). Sa structure peut être divisée en trois domaines, un domaine N-terminal ou domaine de projection, un domaine C-terminal ou domaine de liaison aux microtubules et un domaine riche en proline à cheval sur les deux domaines précédemment cités (**figure 4**). On note que certains auteurs associent ce dernier au domaine de projection N-terminal et divisent donc la structure de la protéine en deux domaines distincts.



**Figure 3 :** Représentation schématique de la structure de la protéine Tau et épissage alternatif de l'ARNm aboutissant aux 6 isoformes (Luc Buée, 2000)

Au cours du développement neuronal, il existe une régulation de l'expression des différentes isoformes de la protéine. En effet, au stade foetal, l'isoforme 0N3R est majoritaire. En revanche, à l'âge adulte, les 6 isoformes sont retrouvées, l'isoforme 2N4R étant la moins abondante (Goedert and Jakes, 1990). Ceci peut s'expliquer par la différence d'affinité pour les microtubules des formes 3R et 4R, cette dernière étant plus affine. L'expression de la forme 3R pourrait donc être liée à la plasticité neuronale nécessaire au développement. A l'inverse, à l'âge adulte, la forme 4R serait impliquée dans la stabilisation des microtubules et la pérennisation du système neuronal. Quelle que soit l'isoforme considérée, la structure globale de la protéine reste la même, divisée en 3 domaines (**figure 4**) (Trinczek et al., 1995). A chacun des domaines constitutifs de la protéine peut être associée une fonction particulière.



**Figure 4 :** Représentation schématique des différents domaines de l'isoforme 2N4R. Figure adaptée de (Goedert et al., 1989)

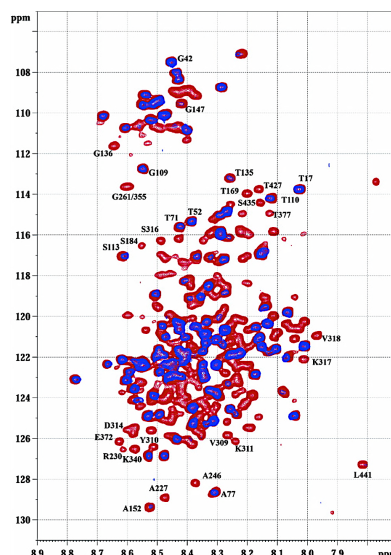
## B. Fonctions et localisations de la protéine Tau

Le domaine de projection, constitué de résidus acides et basiques (Gustke et al., 1994), est le siège d'interactions avec la membrane plasmique et l'actine, constituant majeur du cytosquelette. Même si ce domaine n'est pas directement impliqué dans la formation des microtubules, il peut jouer un rôle espaceur lors du processus dynamique de polymérisation/dépolymérisation de la tubuline (Scott et al., 1991).

Concernant la région riche en prolines, certains auteurs l'associent directement au domaine de projection N-terminal. Du point de vue fonctionnel, ce domaine est le siège d'interactions avec différents partenaires protéiques tels que les peptidyl-prolyl-*cis-trans* isomérases (FKP52, Pin1) ou certaines protéines phosphatases (PP2A) directement impliquées dans la pathogénicité de la protéine

Tau dans la maladie d'Alzheimer (Drewes et al., 1993; Goedert et al., 1995; Kamah et al., 2016; Landrieu et al., 2011). De plus, ce domaine riche en prolines influence directement l'affinité du domaine C-terminal pour les microtubules (Goode et al., 1997).

Pour finir, le domaine C-terminal ou domaine de liaison aux microtubules (MBD) est directement impliqué dans la polymérisation de la tubuline en microtubules et dans la stabilisation de ceux-ci. Ce MBD est constitué d'acides aminés basiques (nombreuses lysines) qui interagissent avec la queue C-terminale acide de la tubuline. Ce domaine est caractérisé par la répétition d'une séquence de 18 acides aminés dans laquelle on retrouve systématiquement le motif PGGG, aussi appelée segments répétés R1 à R4 (« *repeats* »). Ceux-ci sont séparés par des régions « *inter-repeats* » IR qui sont elles aussi impliquées dans l'interaction avec les microtubules (**figure 4**) (Aizawa et al., 1989; Lee et al., 1989). On note que le nombre de segments répétés influence directement la capacité d'interaction avec le microtubule (Scott et al., 1991). L'étude du complexe Tau/microtubules par résonance magnétique nucléaire (RMN) a permis d'identifier le site d'interaction de Tau entre les résidus 214 et 372, localisé en plein cœur du MBD (**figure 5**) (Sillen et al., 2007).



**Figure 5** : Superposition des spectres HSQC 1H-15N de Tau2N4R (rouge) et Tau2N4R en complexe avec des microtubules stabilisés par le paclitaxel (bleu, ratio 1:0,25). Pour le spectre bleu, on constate la disparition des résonances correspondant à la région 214-372 (Sillen et al., 2007).

Du point de vue localisation cellulaire, la protéine Tau est une protéine principalement neuronale (système nerveux central et périphérique) pouvant cependant être retrouvée au niveau pulmonaire ou testiculaire (Gu et al., 1996). Au niveau neuronal, dans le cas physiologique sain, on la retrouve principalement dans l'axone où elle joue un rôle régulateur du transport axonal en participant aux transports antérogrades et rétrogrades par interactions respectives avec la kinésine et la dynéine (Dixit et al., 2008). Outre ce rôle stabilisateur des microtubules axonaux, Tau peut aussi être retrouvée au niveau membranaire et apparaît comme une protéine plateforme dans la transduction du signal. C'est notamment le cas dans l'interaction avec la phospholipase C- $\gamma$  (Jenkins and Johnson, 1998; Morris et al., 2015), enzyme occupant un rôle central dans la transmission des signaux extracellulaires par production de seconds messagers (IP3 et DAG). Pour finir, Tau peut être retrouvée au niveau nucléaire où elle joue un rôle protecteur de l'ADN face aux différents stress (Sultan et al., 2011).

On peut donc conclure en affirmant que la protéine Tau occupe un rôle central dans la fonction neuronale principale qui est la transmission de l'influx nerveux, notamment par sa fonction stabilisatrice des microtubules. Ainsi, le dysfonctionnement de cette protéine-clef est à l'origine de plusieurs maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer.

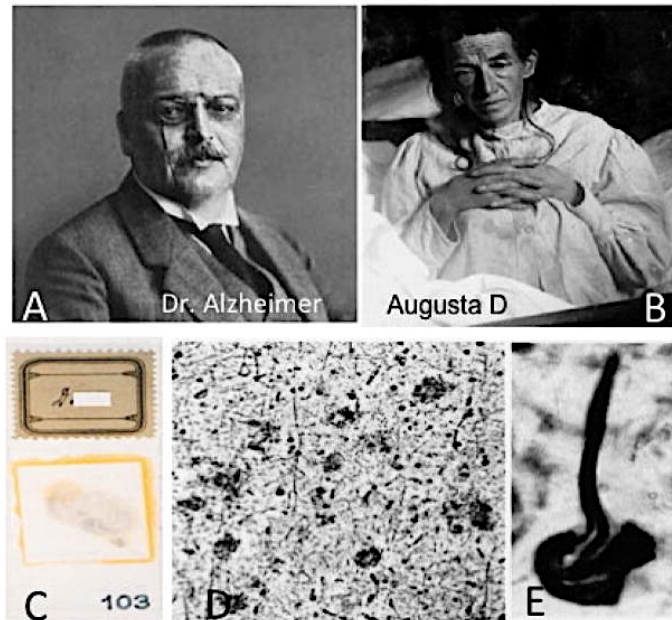
## II. Tau et maladies neurodégénératives

### A. La maladie d'Alzheimer (MA) : découverte de la première Tauopathie

A l'aube du XX<sup>ème</sup> siècle, le psychiatre et neuropathologiste allemand Alois Alzheimer (1864-1915) décrit la première maladie neurodégénérative qui portera par la suite son nom : la maladie d'Alzheimer. A l'époque, l'examen clinique d'Augusta Deter, patiente de 51 ans, réalisé par le Dr. Alzheimer indiqua un fort déclin cognitif ainsi que des troubles comportementaux aboutissant à une perte totale d'autonomie (**figure 6 A-B**). Lors du décès de sa patiente, le docteur Alzheimer pratiqua l'autopsie de son cerveau et décrit un cerveau atrophié. L'examen histologique d'une coupe de cerveau révéla pour la première fois les deux lésions neuropathologiques principales de la maladie d'Alzheimer : une accumulation



de plaques extraneuronales, les plaques séniles, et une accumulation intraneuronale de fibres aboutissant à la mort cellulaire aussi appelée dégénérescence neurofibrillaire (**figure 6 C-D-E**) (Hippius and Neundörfer, 2003).



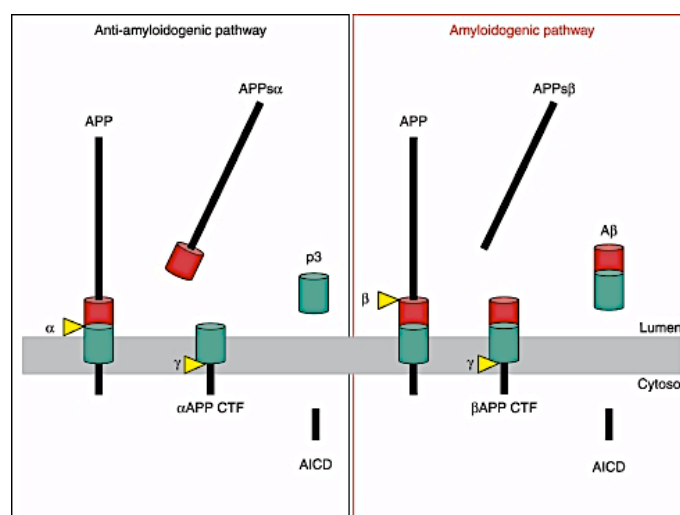
**Figure 6 :** A-B-Photographie du Dr Alois Alzheimer (A) et de sa première patiente Augusta Deter (B). C-D-E-Images des résultats de l'examen *post-mortem* du cerveau de la patiente (C) révélant la présence des plaques séniles (D) par imprégnation argentique et des fibres neurofibrillaires intraneurales (E) (Mufson et al., 2015).

Malgré la description de la pathologie réalisée par le Dr Alzheimer, la plupart des psychiatres de l'époque s'accordèrent à dire, à la vue des symptômes, que la maladie faisait partie du processus normal de vieillissement et parlent de démences séniles. Il aura fallu attendre les années 1960 pour que les différentes avancées technologiques, notamment dans les domaines de la microscopie électronique et photonique ainsi que l'immunohistochimie permettent de mettre en évidence le lien entre déclin cognitif et présence des deux lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Pour finir, à la fin des années 1980 sera révélée l'implication de deux protéines clef dans l'établissement de la maladie : le peptide amyloïde  $\beta$  (peptide  $A\beta$ ) et la protéine Tau.

## B. La maladie d'Alzheimer : une Tauopathie mais pas que...

### i. Peptide A $\beta$ et plaques séniles

Le peptide A $\beta$  est la première protéine identifiée comme acteur dans la MA. En effet, en 1984, Glenner et collaborateurs caractérisent les plaques séniles de patients atteints et montrent qu'elles sont en fait constituées d'un peptide de 4 kDa (39 à 42 acides aminés) : le peptide A $\beta$  (Glenner and Wong, 2012). Celui-ci provient du clivage d'une protéine précurseur, la protéine APP (*amyloid precursor protein*) codée par le gène du même nom localisé sur le chromosome 21. L'épissage alternatif de ce gène entraîne la production de 3 isoformes de 695, 751 et 770 acides aminés, la première étant exclusivement retrouvée au niveau neuronal (Rubinsztein, 1997). On note qu'une mutation de ce gène APP est responsable d'une forme rare autosomale dominante de la MA caractérisée par une surproduction de peptide A $\beta$  (Goate et al., 1991). La protéine APP codée par ce gène est une protéine transmembranaire de type 1 comprenant un long domaine N-terminal extracellulaire et une partie C-terminale intracellulaire, le domaine AICD (*APP IntraCellular Domain*). Elle est la cible des  $\alpha$ -,  $\beta$ -, et  $\gamma$ -sécrétases, enzymes protéolytiques impliquées dans le clivage du précurseur en différents fragments. L'action séquentielle de ces enzymes permet de distinguer deux voies : les voies amyloïdogène et non-amyloïdogène (**figure 7**) qui aboutissent à la production de différents fragments ayant des fonctions biologiques distinctes .

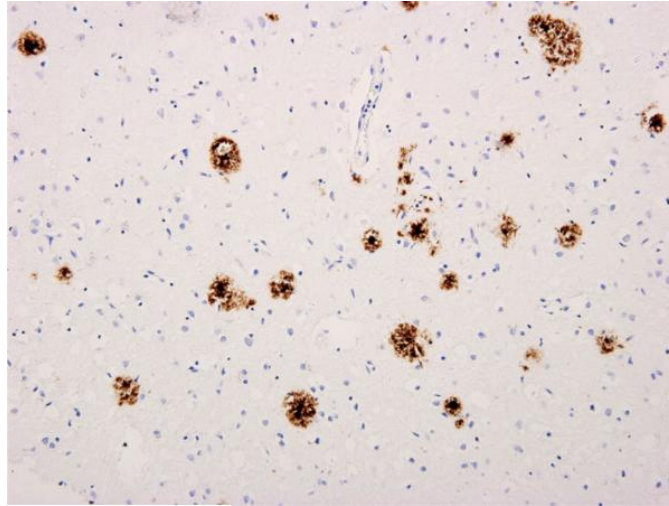


**Figure 7 :** Représentation schématique des deux voies de clivage de la protéine APP. A gauche est représentée la voie non-amyloïdogène et à droite la voie amyloïdogène aboutissant à la formation du peptide A $\beta$  (Haass et al., 2012).

L'APPs $\alpha$  générée par l'action de l' $\alpha$ -sécrétase joue un rôle neuroprotecteur et participe au développement cérébral (Hick et al., 2015). En effet, l'augmentation du niveau d'APPs $\alpha$  au niveau cortical (par surexpression d'ADAM-10 qui possède une activité  $\alpha$ -sécrétase) entraîne une augmentation de la synaptogénèse, étape cruciale du développement du système nerveux (Bell et al., 2008). En revanche, bien qu'elle soit quasi identique à son homologue  $\alpha$ , l'APPs $\beta$ , plus courte de 16 acides aminés n'est pas impliquée dans les processus de neuroprotection et semble même intervenir dans la voie d'activation de la caspase-3, enzyme impliquée dans le processus neurodégénératif (Nikolaev et al., 2009).

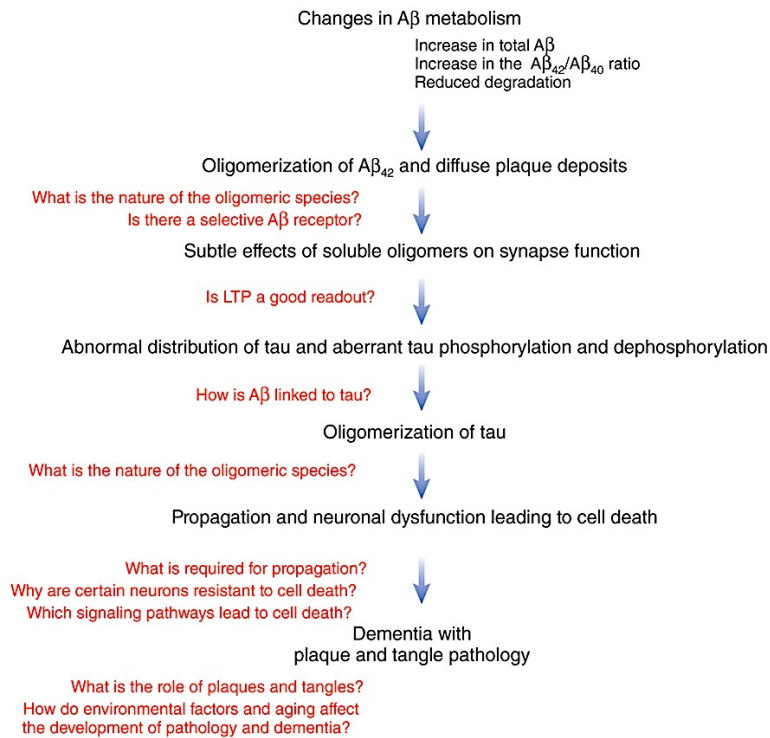
L'AICD, domaine intracellulaire d'APP, est impliqué dans différentes voies de signalisation (Schettini et al., 2010) (interactions avec la protéine Ras, MAPK) mais peut aussi être transloqué au noyau où il exerce un rôle de régulateur transcriptionnel, notamment de gènes impliqués dans la survie neuronal (Multhaup et al., 2015).

Pour finir, le peptide A $\beta$  est généré par la voie amyloïdogène par l'action séquentielle des  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases. Dans des conditions physiologiques saines, l'activité  $\alpha$ -sécrétase est prédominante (Hick et al., 2015) et limite ainsi la production de peptide A $\beta$ . En revanche, comme évoqué précédemment, dans le processus neurodégénératif des mutations (gène APP ou *presenilin-1* et -2) conduisent à une augmentation de la quantité de peptide A $\beta$  générée, par modulation de l'activité sécrétase (Duff et al., 1996; Rubinsztein, 1997). Cette augmentation se traduit donc par une accumulation neurotoxique de peptide aussi bien dans le compartiment extracellulaire qu'au niveau cytosolique et même nucléaire (Multhaup et al., 2015). Le dépôt extracellulaire de peptide A $\beta$  conduit donc à la formation d'oligomères et plaques séniles, lésion cérébrale majeure retrouvée chez les patients atteints par la maladie (**figure 8**). A ce jour, on estime que les oligomères d'A $\beta$  représentent la forme la plus toxique du peptide et seraient responsables de perturbations du métabolisme calcique aboutissant à l'apoptose (Zhao et al., 2012).



**Figure 8** : Immuno-marquage (anticorps anti-A $\beta$ ) d'une coupe de cortex temporal d'un patient atteint par la maladie d'Alzheimer. Les plaques séniles apparaissent en marron (Perl, 2010)

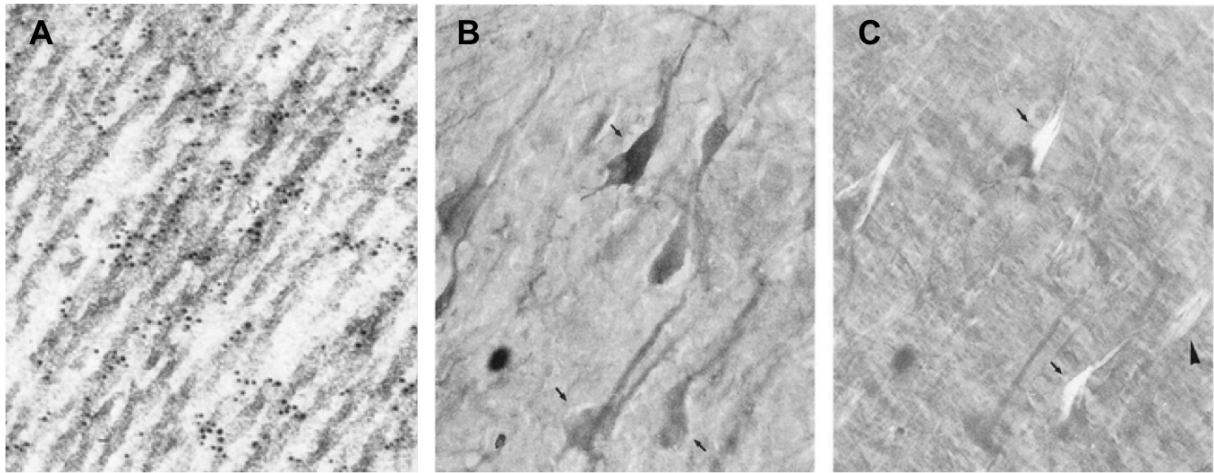
Le peptide A $\beta$  joue donc un rôle central dans l'établissement et l'évolution du processus neurodégénératif. A l'heure actuelle, beaucoup de scientifiques s'accordent à dire que ces changements du métabolisme A $\beta$  aboutissant à la formation des plaques séniles seraient l'événement précurseur, initiateur de la maladie : c'est l'hypothèse de « la cascade amyloïde » (**figure 9**) (Beyreuther and Masters, 1991). Celle-ci met en relation les deux protéines majeures impliquées dans la neurodégénération, le peptide A $\beta$  et la protéine Tau. En formulant cette hypothèse, la communauté scientifique tente de répondre à la question qui demeure toujours sans réponse : « Quel est l'événement initiateur du processus neurodégénératif ? » en d'autres termes « Les perturbations du métabolisme A $\beta$  entraînent-elles l'agrégation de la protéine Tau ou inversement ? »... plus familièrement « qui est l'œuf ? qui est la poule ? ».



**Figure 9** : Hypothèse de la cascade amyloïde selon laquelle la formation des plaques séniles et oligomères d'Aβ serait l'élément déclencheur du processus neurodégénératif et précéderait l'agrégation de la protéine Tau. On constate qu'à ce jour beaucoup de questions restent sans réponses (Beyreuther and Masters, 1991)

## ii. Tau et dégénérescence neurofibrillaire

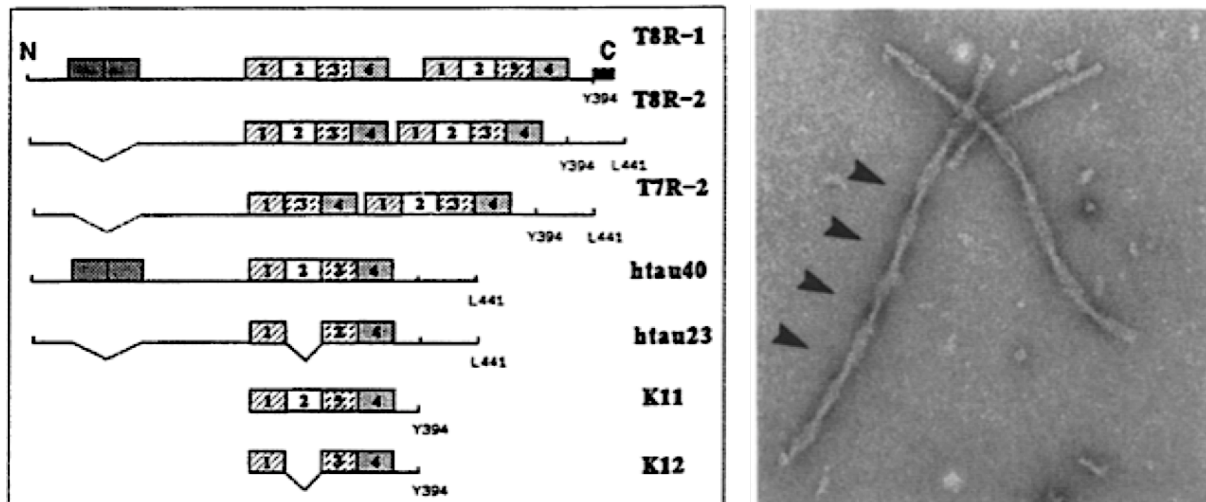
En 1963, Kidd observe pour la première fois, en microscopie électronique, des neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Il décrit la présence de neurones normaux et de neurones contenant des amas fibrillaires, la proportion de ces derniers augmentant avec la sévérité des symptômes cliniques. L'analyse de ces amas intraneuronaux permet de déceler la présence de fibres torsadées formant une double hélice : les PHFs (*Paired Helical Filaments*) (Kidd, 1963). Mais ça n'est qu'en 1985 que le Pr. Jean-Pierre Brion met en évidence la protéine Tau comme constituant majeur des filaments observés chez les patients atteints de la maladie (Brion et al., 1985) par l'utilisation de l'immunohistochimie couplée à la microscopie électronique (**figure 10**). De plus, par purification et analyses biochimiques des PHFs isolés de cerveaux de patients, d'autres équipes confirment les résultats obtenus par le Pr. Brion (Goedert et al., 1988; Wischik et al., 1988) Ces études marquent le début d'un long périple vers la compréhension du mécanisme d'agrégation de la protéine Tau.



**Figure 10** : Immunomarkage sur coupe d'hippocampe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. **A**-Anticorps « anti-filaments anormaux » marqués à l'or colloïdale et observés en microscopie électronique. On constate que les anticorps reconnaissent les PHFs ; **B**-Anticorps « anti-Tau » couplés à une enzyme et observés en microscopie optique. **C**-Contre-coloration de la coupe au rouge-congo permettant de mettre en évidence les PHFs. Par comparaison des clichés B et C, on constate que les anticorps « anti-Tau » reconnaissent les PHFs (figure adaptée de (Brion et al., 1985))

Dans le même temps, Grundke-Iqbal et collaborateurs prouvent que cette forme pathologique de Tau retrouvée dans les PHFs est anormalement phosphorylée (Grundke-Iqbal et al., 1986). Ainsi est proposé l'agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée sous forme de PHFs, ces derniers étant un des marqueurs spécifiques de la maladie d'Alzheimer. A cette époque, aucune hypothèse sur le mécanisme moléculaire d'agrégation de la protéine n'est formulée. Mais face à la recrudescence du nombre de cas déclarés, la nécessité d'un traitement préventif et/ou curatif se fait de plus en plus pressente et c'est pourquoi, au début des années 1990, la communauté scientifique commence à se pencher sur l'étude moléculaire du mécanisme d'agrégation. Ainsi de nombreux travaux sont entrepris sur l'étude *in vitro* de la protéine Tau, purifiée de cerveau ou produite de manière recombinante. En effet, en 1987, Avila et collaborateurs montrent que la Tau extraite de cerveaux de porc a tendance à agréger dans certaines conditions de pH et salinité (Montejo de Garcini and Avila, 1987). Par la suite, en 1992, Wille et collaborateurs étudient la capacité d'agrégation de différentes constructions de Tau recombinantes et montrent qu'une protéine recombinante se résumant aux segments répétés (Tau K12) est capable de former des fibres semblables aux PHFs isolées de cerveaux de patients malades (**figure 11**) (Crowther et al., 1992; Wille et al., 1992).

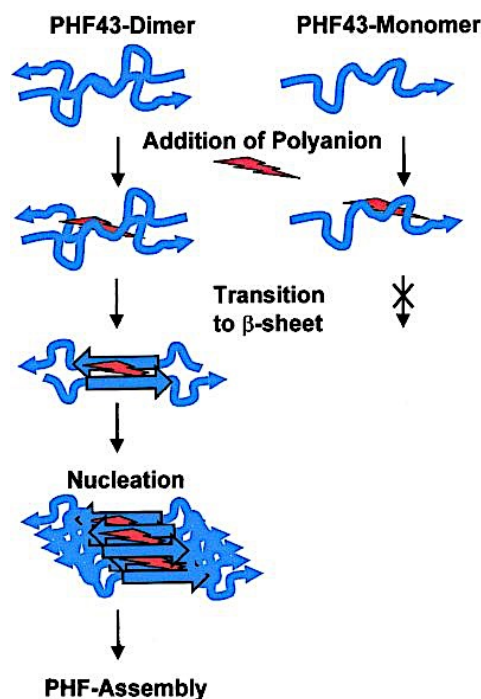
Ces études permettent, d'une part de définir les conditions optimales d'agrégation de la protéine Tau *in vitro*, et d'autre part identifient le MBD comme région impliquée dans l'agrégation.



**Figure 11** : Représentation schématique des différentes constructions de Tau testées par Wille et collaborateurs et fibres obtenues après agrégation de TauK12, observées en microscopie électronique (figure adaptée de (Wille et al., 1992))

Basées sur ces premières études *in vitro*, d'autres équipes vont s'intéresser au mécanisme moléculaire de l'agrégation de la protéine Tau et l'état se resserre peu à peu autour de ce domaine de liaison aux microtubules identifié comme impliqué dans l'agrégation. En effet, en 2001, Bhattacharya et collaborateurs mettent en évidence le rôle des cystéines 291 et 322 dans l'agrégation, l'oxydation des cystéines entraînant la formation d'un pont disulfure entre deux protéines Tau indépendantes : c'est la dimérisation, étape cruciale dans la formation des fibres (Bhattacharya et al., 2001). Au même moment, Von Bergen et collaborateurs démontrent la capacité de deux hexapeptides localisés dans ce MBD à former des fibres de manière spontanée (**figure 12**) : le PHF6\* (VQIINK) situé entre les segments répétés 1 et 2 (*inter-repeat 1*) et le PHF6 (VQIVYK) entre les segments répétés 2 et 3 (*inter-repeat 2*) (von Bergen et al., 2000). L'interaction de ces hexapeptides se traduit par la formation de feuillets- $\beta$  caractéristiques du cœur des PHFs (**figure 12**) (von Bergen et al., 2000). Ces résultats indiquent donc que la formation des PHFs est initiée par l'interaction intermoléculaire de deux protéines

Tau par le biais des résidus cystéines et de deux séquences peptidiques capables de s'auto-assembler *in vitro*. Pour finir, plusieurs études démontrent que le MBD, contenant les deux cystéines et hexapeptides impliqués dans l'agrégation, est aussi le site d'interaction de divers polyanions, tels que l'héparine, capables de déclencher l'agrégation (Mukrasch et al., 2005; Pérez et al., 1996; Sibille et al., 2006). Sur la base de ces nombreuses études, un modèle d'agrégation *in vitro* de la protéine Tau est proposé : l'oxydation des cystéines conduit à une dimérisation de la protéine, étape cruciale dans la formation des PHFs puisqu'elle permet d'aligner les PHF6 et PFH6\* et donc de déclencher l'agrégation. Ce mécanisme peut-être catalysé par la présence de polyanions extracellulaire tels que l'héparine (Goedert et al., 1996; Pérez et al., 1996) ou intracellulaires tels que les chaînes polyglutamate ou l'ARN (Kampers et al., 1996).



**Figure 12** : Représentation schématique du modèle d'agrégation de la protéine Tau induite et catalysée par l'utilisation de polyanions (von Bergen et al., 2000)

De nos jours, ce modèle d'agrégation *in vitro* est encore très utilisé dans l'étude du mécanisme moléculaire d'agrégation de la protéine Tau mais omet un détail non négligeable : le rôle de la phosphorylation dans l'agrégation de la protéine



Tau, celle-ci étant retrouvée hyperphosphorylée dans les PHFs (Brion et al., 1985; Grundke-Iqbal et al., 1986). On note néanmoins que l'implication de la phosphorylation dans le processus d'agrégation pathologique de la protéine Tau reste un sujet controversé. En effet, dès l'aube des années 1990, le Pr. Wischik remet en cause les conclusions des travaux d'Iqbal et collaborateurs (Grundke-Iqbal et al., 1986) en indiquant que le traitement des PHFs par la phosphatase suivi d'une immuno-révélation utilisant l'anticorps Tau-1 (Binder et al., 1985) ne permet pas de conclure quant à la nature hyperphosphorylée des PHFs (Wischik, 1989). Pour mémoire, la reconnaissance de Tau par l'anticorps Tau-1 nécessite une déphosphorylation préalable de l'échantillon. L'hypothèse formulée par Iqbal et collaborateurs repose, entre autre, sur l'observation d'une reconnaissance des PHFs par Tau-1 uniquement après traitement par la phosphatase alcaline (Grundke-Iqbal et al., 1986). Or la même procédure utilisée par Papasozomenos et Binder permet de mettre en évidence une réactivité de Tau-1 pour la protéine Tau extraite de cerveaux de rat et ayant subi le traitement par la phosphatase alcaline, ceci dans un contexte non pathologique donc en absence de PHFs (Papasozomenos and Binder, 1987). De plus, Wischik et collaborateurs démontrent le faible niveau de phosphorylation de la protéine Tau extraite de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer (Wischik et al., 1995). Sur la base de ces différentes études, ils proposent un mécanisme d'agrégation indépendant de la phosphorylation, reposant sur des interactions Tau/Tau par le MBD permise par les clivages en N- et C-terminaux (Lai et al., 2016; Mena et al., 1996).

### **iii. Complexité du lien entre le peptide A $\beta$ et la protéine Tau**

Comme précédemment évoqué, l'élucidation du lien entre la protéine Tau et le peptide A $\beta$  reste une étape cruciale dans la compréhension de la maladie d'Alzheimer. De nombreux scientifiques s'accordent à dire que l'élément essentiel et initiateur du processus neurodégénératif serait l'accumulation dans le cerveau du peptide A $\beta$  qui, par la suite, induirait la toxicité de Tau : c'est l'hypothèse de la cascade amyloïde (**figure 9**) (Haass, 2010). Selon celle-ci, l'agrégation du peptide A $\beta$  serait à l'origine des premiers troubles neuronaux et entrainerait une modification du profil de phosphorylation de la protéine Tau aboutissant à la forme hyperphosphorylée agrégée retrouvée dans les PHFs (Haass, 2010). Zheng et

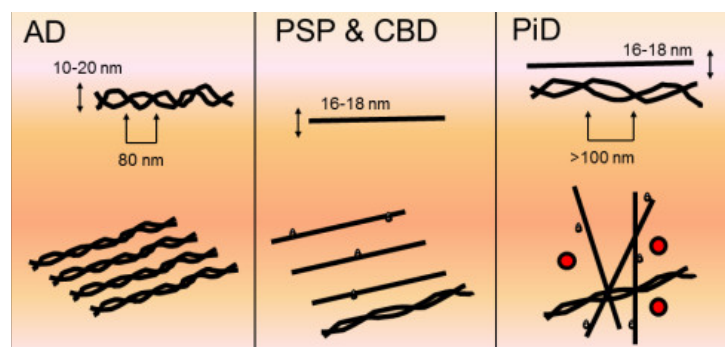
collaborateurs montrent même que l'hyperphosphorylation de Tau est induite par l'activation des kinases GSK-3 et MAPK en présence de peptide A $\beta$ , ceci de manière dose-dépendante (Zheng et al., 2002). Ainsi, de nombreuses études démontrent que la pathologie Tau est induite par la présence de peptide A $\beta$  et soutiennent donc l'hypothèse de la « cascade amyloïde » (Bolmont et al., 2007; Götz et al., 2001a; Pooler et al., 2015).

Néanmoins, en parcourant la littérature et à la vue des avancées dans le domaine thérapeutique, on se rend compte que d'autres études ne valident pas toujours cette hypothèse. En effet, on constate tout d'abord qu'à ce jour, l'efficacité des traitements « anti-plaques » reste modérée voire inexistante : les plaques séniles disparaissent mais les troubles cognitifs persistent (Caselli et al., 2017). De plus, la corrélation positive entre déclin cognitif et accumulation de peptide A $\beta$  reste un sujet très controversé puisque des lésions cérébrales, notamment des plaques séniles, sont observées chez les personnes âgées sans pour autant qu'une démence y soit associée (Nelson et al., 2012). *In vitro*, par l'utilisation d'un modèle cellulaire neuronale, Rapoport et collaborateurs montrent que la toxicité d'A $\beta$  n'est observée qu'en présence de la protéine Tau, ce qui suggère un dialogue entre ces deux protéines clés dans la dégénérescence neuronale (Rapoport et al., 2002). Pour finir, des études menées chez les primates ont montré que l'accumulation des plaques séniles chez les singes âgés n'étaient pas automatiquement associée à la présence de PHFs, ni à une démence avérée (Heuer et al., 2012). L'identification conjointe des plaques amyloïdes et des PHFs a uniquement été réalisée chez les chimpanzés âgés, espèce phylogénétiquement la plus proche de l'homme (Rosen et al., 2008). Toutes ces études suggèrent donc un développement synergique des deux lésions moléculaires caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

En conclusion, les critères diagnostiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer étant définis comme l'identification conjointe des plaques séniles et des fibres intraneuronales (Hyman et al., 2012), ceci amène la communauté scientifique à reconsidérer le rôle de la protéine Tau dans le déclenchement de la maladie.

### C. Les autres Tauopathies

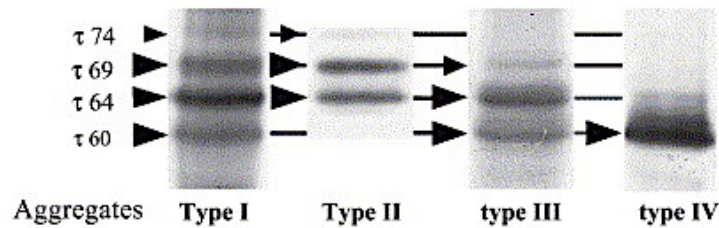
Suite à l'identification de Tau comme constituant majeur des *PHFs* intraneuronaux caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, d'autres équipes ont montré que cette protéine était aussi impliquée dans d'autres pathologies regroupées sous le terme de « Tauopathies ». On peut notamment citer la maladie de Pick, le syndrome de Down, les Paralysies Supranucléaires Progressives (PSP), les démences fronto-temporales avec parkinsonisme liées au chromosome 27 (FTDP-17) et bien d'autres. Toutes ces « Tauopathies » sont caractérisées par la présence de fibres de Tau intraneuronales, mises en évidence *post-mortem* sur coupes de cerveau par l'utilisation de différents protocoles de coloration utilisant l'argent (Yamamoto and Hirano, 1986). Par l'observation de ces fibres en microscopie électronique, plusieurs équipes ont montré des morphologies variables en fonction de la maladie. En effet, comme indiqué précédemment, la maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence de filaments appariés en hélice alors que, par exemple, des filaments droits sont caractéristiques de la PSP (**figure 13**).



**Figure 13** : Représentation schématique des différentes structures de fibres propres à chaque Tauopathies (Murray et al., 2014). AD : *Alzheimer Disease* ; PSP : *Progressive Supranuclear Palsy* ; CBD : *Corticobasal Degeneration* ; PiD : *Pick Disease*.

Quelque soit le type de fibre et donc la pathologie associée, le constituant majeur reste la protéine Tau hyperphosphorylée. Des études biochimiques ont montré que les Tauopathies diffèrent par la présence de certaines isoformes « préférentielles » ainsi que par des différences de phosphorylation de la protéine Tau (Sergeant et al., 2005). Sur la base de ces études a été proposée une classification des Tauopathies en cinq catégories :

- La classe 0 se caractérise par un défaut d'expression de la protéine Tau et donc une perte des fonctions associées : on parle de DLBDH (« *Dementia Lacking Distinctive Histopathological features* »). Cette absence de protéine Tau se caractérise par une dégénérescence du lobe frontal, non-Alzheimer et non-Pick puisqu'aucun agrégat ou fibre n'est observé (Zhukareva et al., 2001)
- La classe 1 se caractérise du point de vue biochimique par la présence de 4 bandes sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 60, 64, 69 et 72 kDa (**figure 14**) (Goedert et al., 1992). Ces bandes correspondent à l'agrégation des 6 isoformes de la protéine Tau. La maladie d'Alzheimer ainsi que le syndrome de Down et le FTDP-17 sont les tauopathies les plus connues entrant dans cette catégorie.
- La classe 2 se caractérise du point de vue biochimique par la présence de 2 bandes sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 64 et 69 kDa correspondant essentiellement à l'agrégation de la forme 4R de la protéine Tau (**figure 14**). La PSP est la tauopathie majeure de cette catégorie (Sergeant et al., 1999). Cette classe 2 définit le concept de « 4R-Tauopathie ».
- La classe 3 se caractérise du point de vue biochimique par la présence de 2 bandes sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 60 et 64 kDa (**figure 14**). Celles-ci correspondent à l'agrégation de la forme 3R de la protéine retrouvée exclusivement dans la maladie de Pick (Delacourte, 2006) qui peut donc être qualifiée de « 3R-Tauopathie »
- Pour finir, la classe 4 se caractérise du point de vue biochimique par une unique bande sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 60KDa (**figure 14**). La dystrophie myotonique de type 1 est la seule Tauopathie de cette catégorie (Peric et al., 2014).



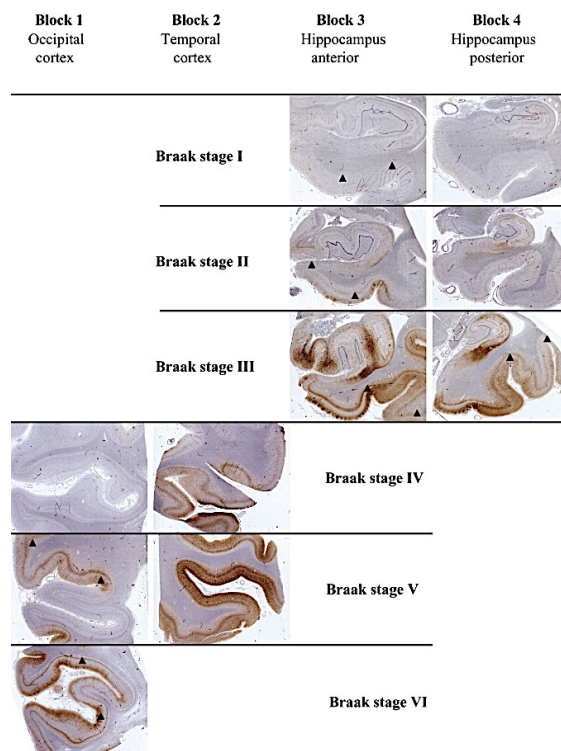
**Figure 14** : Western Blot anti-Tau pathologique (anticorps AD2 anti-pS396/404) obtenu par séparation sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE de tissus cérébraux de patients souffrant de tauopathies différentes. On identifie clairement les différentes bandes, base de la classification biochimique des tauopathies (Sergeant et al., 2005)

## D. Etiologie des Tauopathies

Même si toutes les tauopathies précédemment citées sont cliniquement et biochimiquement bien caractérisées, il n'en reste pas moins que les causes ainsi que le(s) élément(s) déclencheur(s) de la pathologie ne sont pas connus. Pendant longtemps, la communauté scientifique se demandait même si l'agrégation de la protéine Tau était une cause ou une conséquence de la maladie. Le problème fut résolu lorsqu'en 1998, plusieurs scientifiques décrivent des mutations du gène *MAPT* (Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998; Spillantini et al., 1998). A ce jour, 59 mutations ont été recensées au niveau de ce gène entraînant des perturbations des propriétés d'agrégation et de liaisons au microtubules (mutations touchant l'exon10) mais aussi des mutations affectant l'épissage de l'ARNm ayant comme conséquence directe le déséquilibre du ratio 3R/4R (mutations touchant les introns) (Hong et al., 1998). Par exemple, la mutation P301L provenant d'une mutation de l'exon10 entraîne une agrégation plus rapide que la forme non mutée (von Bergen et al., 2000; Goedert et al., 1999) et une liaison plus faible aux microtubules (Hong et al., 1998). Ainsi toutes ces études démontrent clairement que la génétique est un facteur étiologique responsable des FTDP-17... mais qu'en est-il des « Tauopathies sporadiques », telles que la maladie d'Alzheimer, qui surviennent sans prédisposition génétique?

La maladie d'Alzheimer, maladie neurodégénérative la plus étudiée, est unique car caractérisée par deux lésions cérébrales majeures. Suivant l'hypothèse de la cascade amyloïde, la MA ne serait qu'une pathologie cérébrale entraînée par une accumulation de peptides Aβ neurotoxiques et les PHFs n'apparaîtraient qu'à des stades très avancés de la maladie. Au départ, de nombreux chercheurs et

industriels ont tenté de développer des traitements sur la base de cette hypothèse mais se sont heurtés à une réalité plus compliquée. En effet, l'accumulation d'études sur la dégénérescence neurofibrillaire et la progression de la maladie a peu à peu changé la perception de la pathologie et inclut dans l'équation globale la protéine Tau. En 1991, le neuropathologiste allemand Heiko Braak observe l'évolution des deux lésions, plaques et fibres, au cours du temps et propose ainsi de découper l'évolution de la maladie en plusieurs stades allant de I (initial) à VI (sévère) (**figure 15**) (Braak and Braak, 1991). Par ses observations, il met en évidence la progression de la dégénérescence neurofibrillaire suivant un chemin bien précis, le point de départ étant la région transentorhinale. Jusque-là, le diagnostic de la MA reposait uniquement sur le nombre de plaques amyloïdes observées (Khachaturian, 1985) mais en 1997, les travaux menés par Heiko Braak sont finalement inclus dans les critères diagnostiques. Ainsi la MA n'est déclarée qu'après observation des fibres intraneuronales et des plaques amyloïdes, lésions observées 90 ans auparavant par le Dr Alois Alzheimer.



**Figure 15** : Immunohistomarquage de coupes de cerveaux de patients atteints par la MA aux différents stades décrits par le Dr. Braak (utilisation de l'anticorps AT8, marqueurs spécifiques de la forme pathologique de Tau). On constate la progression de la dégénérescence neurofibrillaire depuis la région transentorhinale vers le striatum (Alafuzoff et al., 2008).

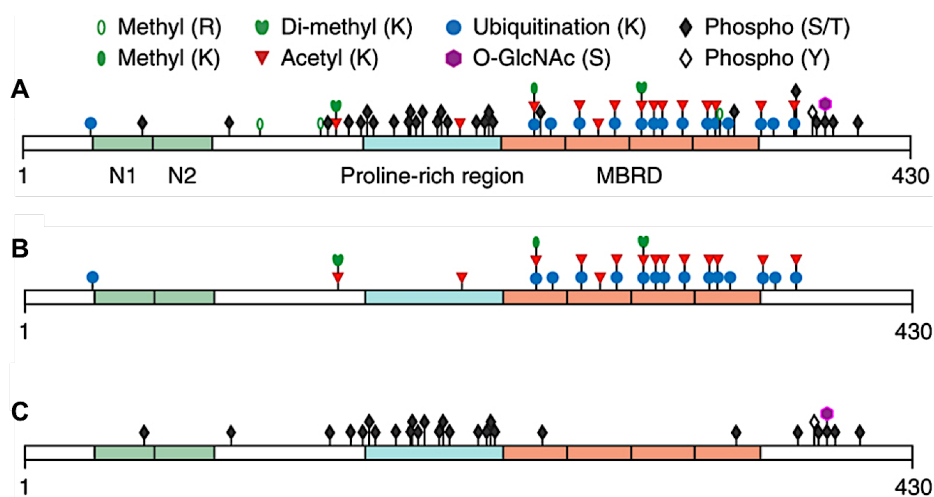
Ainsi, en 1997, le paramètre dégénérescence neurofibrillaire impliquant Tau est pris en compte dans l'établissement du diagnostic de la MA mais ça n'est pas pour autant que les facteurs étiologiques de la maladie sont déterminés : les acteurs principaux sont connus mais toujours pas les causes et la relation existant entre les deux. Même si depuis 40 ans de nombreuses études ont été menées sur ces deux acteurs moléculaires caractéristiques de la MA, à l'heure actuelle aucun lien clair n'est établi entre la protéine Tau, le peptide A $\beta$  et le déclenchement de la pathologie. Des études montrent qu'une accumulation de peptide A $\beta$  a pour conséquence une hyperphosphorylation de la protéine Tau (Grueninger et al., 2010) et qu'un traitement contre la neurotoxicité induite par A $\beta$  diminue la phosphorylation de Tau (Song et al., 2008) ce qui suggère donc que ce peptide A $\beta$  soit l'élément déclencheur de la maladie. D'autres études ont montré qu'un neurone exprimant Tau dégénère en présence d'A $\beta$  mais qu'en absence de Tau (KO), la cellule survit (Rapoport et al., 2002). De plus, l'atrophie synaptique retrouvée non seulement dans la MA mais aussi dans d'autres tauopathies est directement liée au dysfonctionnement de la protéine Tau (Lipton et al., 2001). Ces résultats posent donc le peptide A $\beta$  comme précurseur de la maladie. On peut donc dire que la toxicité induite par le peptide A $\beta$  et la protéine Tau n'est plus à prouver mais qu'en 2017 aucun lien clair n'est établi. Concernant la protéine Tau, sujet central de ma thèse, il apparaît clairement que la phosphorylation joue un rôle, aussi bien dans le processus d'agrégation (Brion et al., 1985; Goedert et al., 1992; Grundke-Iqbal et al., 1986) que dans le lien pathologique (éventuel) avec le peptide A $\beta$  (Song et al., 2008). Cette phosphorylation est même devenue un marqueur spécifique dans la détection *post-mortem* de la maladie d'Alzheimer par l'utilisation d'anticorps reconnaissant des épitopes phosphorylés tel que l'AT8 (pS202+pT205) (Alafuzoff et al., 2008). Outre le rôle joué par la phosphorylation, on peut légitimement se demander quels sont les rôles joués par d'autres modifications post-traductionnelles (MPTs) telles que l'acétylation, la O-GlcNAcylation... toujours dans le but de comprendre le processus d'agrégation pathologique impliquant la protéine Tau.

### III. Tau et modifications post-traductionnelles (MPTs)

De manière générale, les protéines peuvent subir des modifications durant ou après leur synthèse : on parle respectivement des modifications co-traductionnelles

(MCTs) et des modifications post-traductionnelles (MPTs). Quelque soit le type de modifications considéré, celles-ci peuvent jouer des rôles différents : modifications locales ou globales de la structure, modulation de l'activité, localisation cellulaire...

Par sa nature intrinsèquement désordonnée (IDP), Tau est une cible privilégiée pour les enzymes de modifications. En effet, l'absence de structures secondaires et tertiaires définies facilite l'accès aux différents sites de modifications possibles : sérine, thréonine, lysine... (**figure 16**). Les principales modifications étudiées dans le cadre de ma thèse sont la phosphorylation des résidus sérines et thréonines, l'acétylation des lysines et pour finir l'O-GlcNAcylation des sérines et thréonines. On note qu'il existe d'autres modifications telles que la méthylation, l'ubiquitination, la polyamination, le clivage peptidique... qui vont cibler spécifiquement certaines régions de la protéine. Ceci sera abordé de manière plus précise dans la suite du manuscrit.



**Figure 16** : **A**-Représentation schématique des modifications post-traductionnelles principales (liste non exhaustive) retrouvée sur la protéine Tau isolée de cerveau de souris saine. **B** et **C**-Modifications post-traductionnelles ciblant spécifiquement les lysines (**B**) et les sérines/thréonines (**C**) (figure adaptée (Morris et al., 2015))

## A. Les modifications post-traductionnelles principales

### i. La phosphorylation

La phosphorylation est probablement la modification post-traductionnelle la plus représentée et la plus étudiée. En effet, l'isoforme la plus longue de la protéine Tau (2N4R) est porteuse de 85 sites cibles de diverses kinases (80 sérines-



thréonines et 5 tyrosines) (Morris et al., 2015). La protéine Tau est donc la cible de nombreuses kinases pouvant être classés en 3 groupes :

- Les *Proline-Directed Protein Kinases* (PDPK) qui phosphorylent spécifiquement les motifs Ser/Thr-Pro telles que la GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*), la CDK5 (*Cyclin-Dependent protein Kinase 5*) ou encore ERK2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase 2*) (Pelech, 1995).
- Les *non-Proline-Dependant Protein Kinases* (nPDPK) sont aussi responsables de la phosphorylation de la protéine Tau sur les résidus sérines et thréonines sans nécessité d'un résidu proline au voisinage. A titre d'exemple, on peut citer la CaM kinase II (*calcium/calmoduline-dependant protein kinase II*) ou les CK-1 et -2 (*casein kinase 1 et 2*) (Singh et al., 1996).
- Les *Tyrosine-Kinases* (TK) qui ciblent spécifiquement les cinq résidus tyrosine de la protéine Tau (Tyr18-Tyr29-Tyr197-Tyr310-Tyr394). Plusieurs TK sont impliquées dans la phosphorylation de Tau telles que les kinases de la famille Src, la SyK (*spleen tyrosine kinase*) ou encore la kinase c-Abl (*Abelson murine leukemia viral oncogene*) (Lebouvier et al., 2009).

Cette modification post-traductionnelle est réversible par l'action de diverses protéines phosphatases telles que PP-1, -2A, -2B (calcineurine), -5 qui ciblent les résidus Ser/Thr phosphorylés (Braithwaite et al., 2012; Liu et al., 2005) et les protéines tyrosine phosphatases telle que STEP (*Striatal-Enriched Tyrosine Phosphatase*) (Braithwaite et al., 2012).

Physiologiquement, Tau est phosphorylée à hauteur de 2-3 moles de phosphate par mole de protéine (Ksiezak-Reding et al., 1992). Cette phosphorylation joue un rôle fondamental dans la régulation des fonctions physiologiques de Tau : polymérisation, liaison et stabilisation des microtubules. Par exemple, la phosphorylation des résidus sérines retrouvés au sein des motifs KXGS des segments répétés du domaine de liaison aux microtubules (Ser262, Ser293, Ser324 et Ser356) par MARK, PKA ou encore CaMKII (nPDPK) réduit l'affinité de Tau pour les microtubules (Hanger et al., 2009; Schneider et al., 1999). De plus, la phosphorylation des résidus sérines et thréonines de la région riche en prolines diminue l'interaction de Tau pour les microtubules (Liu et al., 2007). En particulier,

selon Lu et collaborateurs la phosphorylation de la Thr231 entrainerait une trans→cis isomérisation conduisant à un changement structural local à l'origine de la diminution d'affinité (Lu et al., 1999). Pour finir, la polymérisation de la tubuline par Tau apparaît augmentée lorsque les résidus Ser396 et Ser404 sont phosphorylés (Liu et al., 2007). Toutes ces études, et bien d'autres, prouvent ainsi que la phosphorylation régule l'activité MAP (*microtubule-associated protein*) de Tau. Outre cela, l'état de phosphorylation aurait également un effet sur les autres fonctions de Tau, notamment dans l'interaction avec les kinésines impliquées dans le transport axonal (Cuchillo-Ibanez et al., 2008). Selon Stern et collaborateurs, cette régulation impliquerait la phosphorylation de la Tyr18 et souligne donc ici l'importance des tyrosine-kinases (Stern et al., 2017).

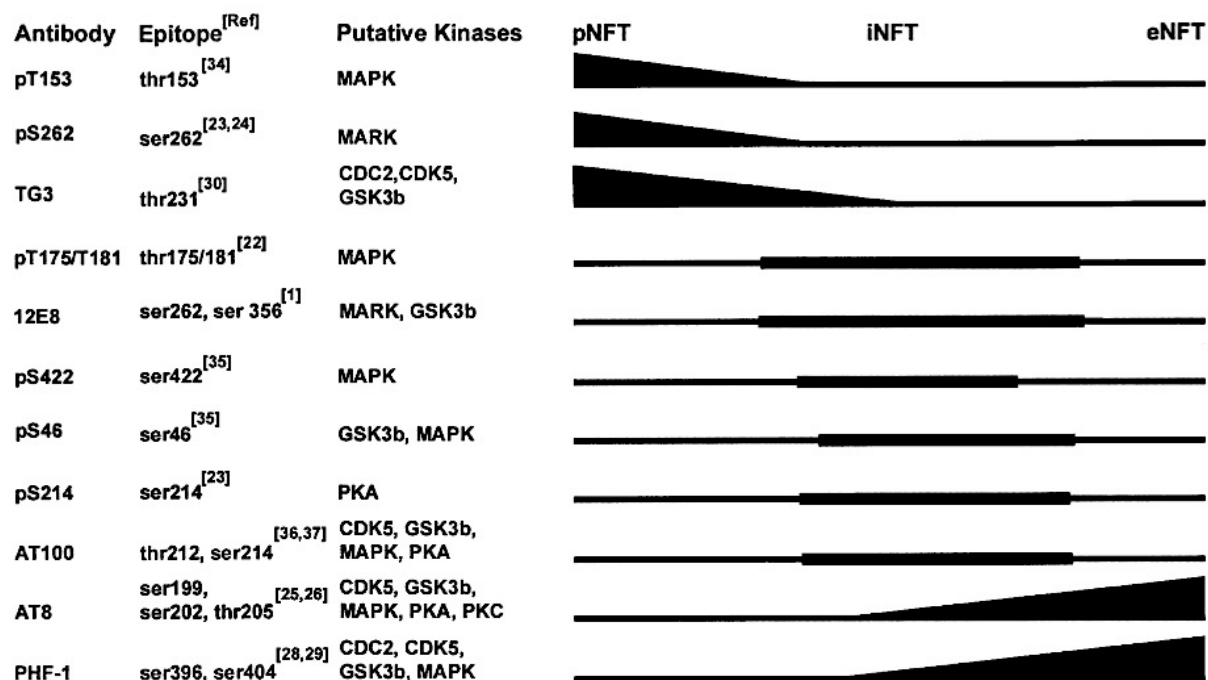
Une perturbation du processus de phosphorylation de la protéine Tau est impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer. Comme évoquée précédemment, Tau est retrouvée hyperphosphorylée dans les PHFs (Grundke-Iqbal et al., 1986). Ce terme d'hyperphosphorylation définit une augmentation de la phosphorylation des sites physiologiques et une apparition de sites phosphorylés, non modifiés dans le cas sain. A titre de comparaison avec le cas sain, la protéine Tau « pathologique » retrouvée au niveau des fibres serait porteuse de 6 à 8 moles de phosphate par mole de protéine soit une augmentation de la phosphorylation d'un facteur 3 (Grundke-Iqbal et al., 1986). L'étude de PHFs isolés de patients Alzheimer par spectrométrie de masse menée en 1998 par Hanger et collaborateurs (Hanger et al., 1998) a permis de mettre en évidence les principaux sites de phosphorylation « pathologique » caractéristiques de la maladie. Sur cette base, des anticorps reconnaissant spécifiquement les phospho-épitopes pathologiques ont été développés et permettent donc, entre autres, l'identification *post-mortem* de la maladie d'Alzheimer.

Phospho-épitope	Anticorps
pThr181	AT270
pSer202 + pThr205	AT8
pThr212 + pSer214 + pThr217	AT100
pThr231 + pSer235	AT180
pSer262 / pSer356	12E8/Ab262
pSer396 + pSer404	PHF1
pSer422	AP422

**Tableau 1** : Liste non-exhaustive des sites de phosphorylation identifiés par Hanger et collaborateurs (Hanger et al., 1998) et phospho-épitopes correspondants.

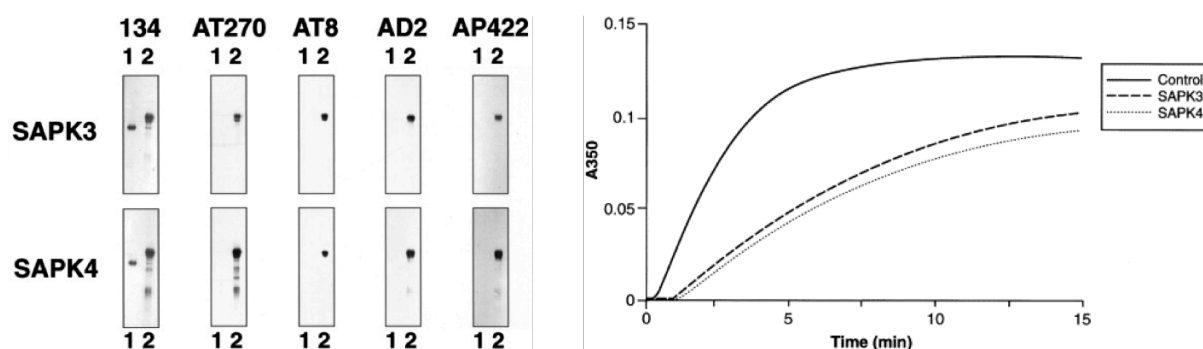
Augustinack et collaborateurs ont même corrélé l'état de phosphorylation de la protéine Tau et donc les différents phospho-épitopes pathologiques avec les différents stades de la maladie d'Alzheimer. D'après cette étude, les stades précoces sont caractérisés par la phosphorylation des résidus Thr153, Thr231 et Ser262 (**figure 17**). En revanche, dans les stades intermédiaires de la maladie, la phosphorylation des résidus Ser46, Thr212, Ser214, Thr175, Thr181, Ser262, Ser356 et Ser422 est observée (**figure 17**). Pour finir, les stades avancés de la maladie sont synonymes de phosphorylation des résidus Ser199, Ser202, Thr205, Ser396 et Ser404 (**figure 17**) (Augustinack et al., 2002). Imaginons l'étude des différents stades par l'utilisation d'anticorps anti-phospho épitopes :

- Stade précoce : 12E8/Ab262
- Stade intermédiaire : AT270, 12E8/Ab262, AT100, AP422
- Stade avancé : AT8 et PHF1



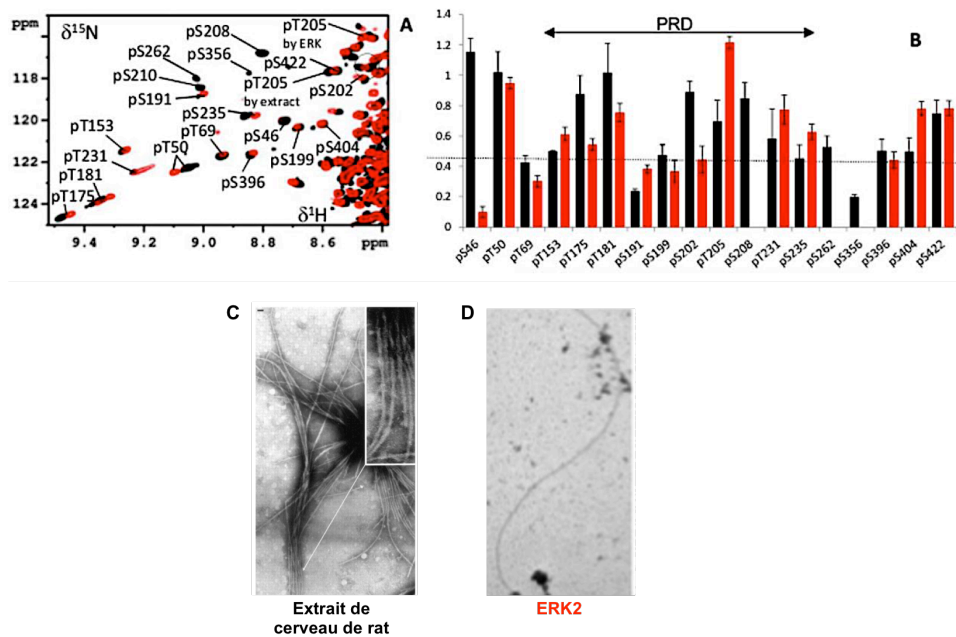
**Figure 17** : Corrélation entre l'état de phosphorylation de la protéine Tau et les différents stades de la maladie d'Alzheimer. pNFT : stades précoces, détection des pré-NFT ; iNFT : stades intermédiaires ; eNFT : stades tardifs (Augustinack et al., 2002).

Du point de vue fonctionnel, la phosphorylation de ces sites qualifiés de « pathologiques » est responsable de la cytotoxicité de la protéine Tau : inhibition de sa fonction MAP et/ou agrégation aboutissant à la formation des PHFs. Concernant la capacité de polymérisation et de stabilisation des microtubules, de nombreuses études ont été menées sur les conséquences fonctionnelles de l'hyperphosphorylation des phospho-épitopes cités ci-dessus. On peut par exemple citer l'étude menée par Goedert et collaborateurs qui montrent que la phosphorylation de Tau *in vitro* par les kinases SAPK3 (ERK6 et p38 $\gamma$ ) et SAPK4 diminue la capacité d'assemblage des microtubules (**figure 18**) (Goedert et al., 1997). En recentrant la problématique sur les épitopes AT8 et AT180, Amniai et collaborateurs montrent que la phosphorylation simultanée de ceux-ci se traduit par l'inhibition de la polymérisation mais n'a aucun effet sur l'interaction de Tau avec les microtubules (Amniai et al., 2009). En revanche, la phosphorylation de la Ser262 par MARK entraîne le détachement de Tau des microtubules et donc l'instabilité de ceux-ci (Drewes et al., 1997).



**Figure 18** : Phosphorylation de Tau par SAPK3 et SAPK4 (p38delta). Le western blot permet de mettre en évidence la phosphorylation des épitopes AT270, AT8, AD2 (=PHF1) et AP422 (ligne 1 : Tau ; ligne 2 : Tau + SAPK). L'expérience de polymérisation de la tubuline met en évidence le rôle inhibiteur joué par la phosphorylation des dits-épitopes dans l'assemblage des microtubules (Goedert et al., 1997).

En revanche, concernant l'agrégation de la protéine Tau en PHFs, à l'heure actuelle, aucune étude ne révèle clairement le mécanisme moléculaire liant l'agrégation et l'hyperphosphorylation pathologique. Quelques études se sont penchées sur l'implication de la phosphorylation de certaines régions de la protéine Tau dans le mécanisme d'agrégation. Ainsi, Liu et collaborateurs décrivent la phosphorylation des résidus (Ser/Thr) de la région riche en prolines et la partie C-terminale de Tau comme promotrice de l'agrégation (Liu et al., 2007). A l'inverse, Schneider et collaborateurs décrivent la phosphorylation de la Ser262 comme protectrice de l'agrégation (Schneider et al., 1999). De façon plus générale, au sein du laboratoire, Qi et collaborateurs ont montré que la phosphorylation de Tau par ERK2 permet la formation de quelques fibres (Qi et al., 2016), en quantité bien moins importante que les résultats obtenus par Alonso et collaborateurs lorsque Tau est phosphorylée par un extrait de cerveau de rat (Alonso et al., 2001). L'analyse par résonance magnétique nucléaire des protéines Tau phosphorylées par ERK2 ou par l'extrait de cerveau de rat a permis de mettre en évidence 15 à 18 sites potentiellement impliqués dans l'agrégation (**figure 19**) (Qi et al., 2016). Plusieurs questions se posent : « ces sites sont-ils tous nécessaires pour l'agrégation ? », « existe-t-il une combinaison minimale capable de déclencher l'agrégation ? ». Ainsi comprendre le lien entre hyperphosphorylation et agrégation serait une avancée certaine dans la compréhension des mécanismes de formation des fibres de Tau.

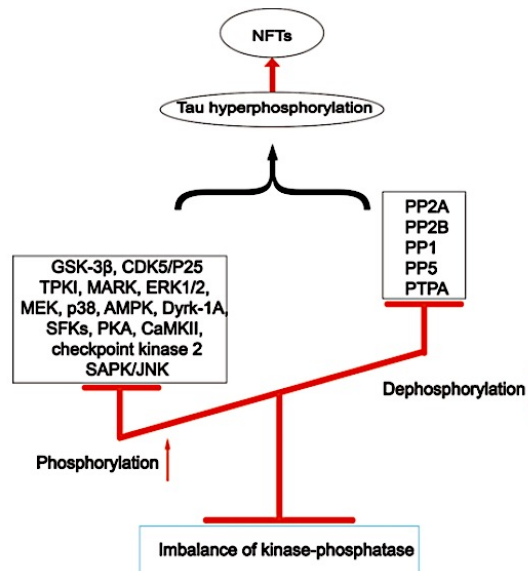


**Figure 19 :** Comparaison par résonance magnétique nucléaire des *patterns* de phosphorylation de Tau obtenus par incubation avec ERK2 (rouge) ou par incubation avec un extrait de cerveau de rat (noir). L'expérience d'agrégation sans héparine ni autre inducteur d'agrégation révèle la présence de nombreux filaments lorsque Tau est préalablement phosphorylée par l'extrait de cerveau. (figure adaptée de (Alonso et al., 2001; Qi et al., 2016).

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées quant à l'origine de cette hyperphosphorylation : une sur-activation des kinases ? Une inhibition des phosphatases ? La concomitance des deux ?

Concernant l'activité kinase visant Tau, plusieurs études montrent une augmentation de l'activité des principales protéines kinases impliquées dans la maladie d'Alzheimer. En effet, Swatton et collaborateurs montrent une augmentation de l'activité MAPK telles que ERK1/2, Cdk5, JNK, p38 (PDPK kinases) (Swatton et al., 2004). A cela s'ajoute une sur-activation de la GSK3 $\beta$  dès les stades précoces de la maladie (Hanger et al., 1992; Leroy et al., 2007; Mandelkow et al., 1992). En se référant à la figure 18, on constate donc que l'activation de ces différentes kinases aboutit progressivement à l'hyperphosphorylation pathologique. Celle-ci pourrait-être contrebalancée par une sur-activation des protéines phosphatases ce qui n'est malheureusement pas le cas dans la maladie. En effet, il a été démontré à plusieurs reprises que les activités protéines phosphatases PP-1, -2A, -5 sont diminuées chez les patients atteints par la maladie (Liu et al., 2005). Seule l'activité PP-2B (calcineurine) est augmentée d'un facteur 3 chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer. Ceci est en lien direct avec les perturbations du métabolisme calcique

aboutissant à une activation de la calpaïne I à l'origine de l'activation de la phosphatase PP-2B par clivage (Qian et al., 2011). Malheureusement, cette seule activation ne permet pas de combler le manque d'activité des autres protéines phosphatases. Toutes ces études permettent de mettre en évidence un déséquilibre de la balance kinases/phosphatases dans la maladie d'Alzheimer qui conduit donc à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (**figure 20**).



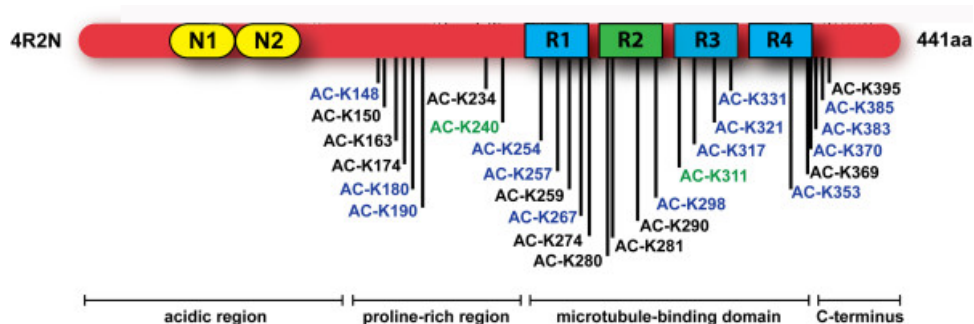
**Figure 20** : Représentation schématique du déséquilibre en activités kinases et phosphatases aboutissant à l'hyperphosphorylation de Tau et à la formation des PHFs (Wainaina et al., 2014).

En conclusion de cette partie, la phosphorylation de la protéine Tau est impliquée dans l'agrégation aboutissant à la formation des PHFs. Les études menées par spectrométrie de masse couplées aux analyses par Western blot du profil de phosphorylation de la Tau pathologique extraite de cerveaux ont permis d'identifier avec certitude les sites principaux retrouvés dans la pathologie. Parallèlement à cela, les études cellulaires ont permis d'identifier les principales kinases impliquées dans la phosphorylation. A l'heure actuelle, aucun mécanisme moléculaire de l'agrégation de la protéine Tau phosphorylée n'est établi, ce qui, selon nous, reste un enjeu majeur dans la compréhension de la pathologie.

## ii. L'acétylation

L'acétylation des lysines, deuxième modification étudiée au cours de ma thèse, cible 44 résidus sur la forme 2N4R de la protéine. Elle est catalysée par deux acétyl-transférases majeures : la protéine CBP (*CREB-binding protein*) et la protéine

p300 (**figure 21**) (Cohen et al., 2011). Parallèlement à cela, Cohen et collaborateurs ont démontré l'existence d'une activité d'auto-acétylation intrinsèque sur la protéine Tau (Cohen et al., 2016). Celle-ci implique les résidus cystéines 291 et 322 du domaine de liaison aux microtubules et peut être intra- ou inter-moléculaire : on parle respectivement d'activité *cis*- ou *trans*-acétyl-transférase. De même que la phosphorylation, l'acétylation des lysines de Tau est une réaction réversible ; la désacétylation est catalysée principalement par HDAC6 (*Histone Deacetylase 6*) (Cook et al., 2012) et par SIRT1 (Min et al., 2010).

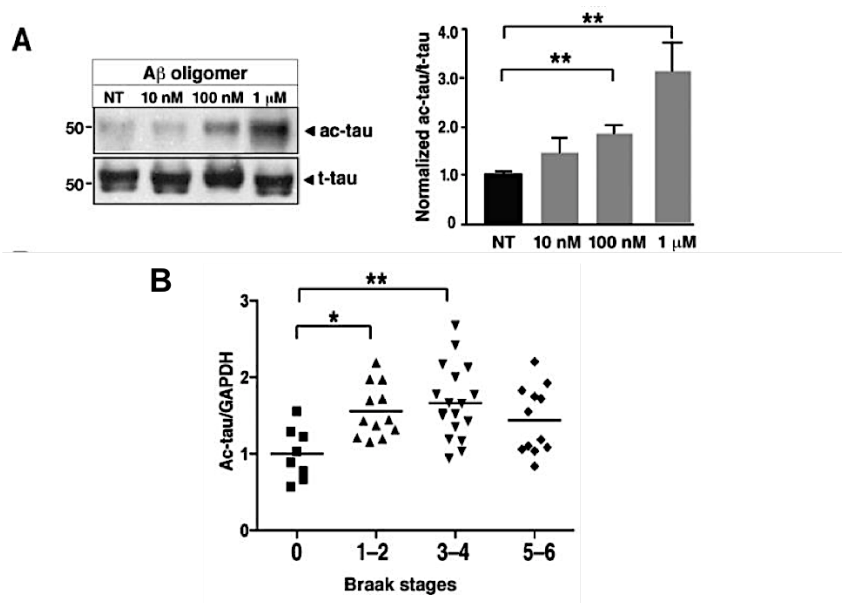


**Figure 21** : Représentation schématique de la protéine Tau acétylée *in vitro* par CBP et p300 (noir), uniquement CBP (vert) et uniquement p300 (bleu). Figure adaptée de (Cook et al., 2014a).

En conditions physiologiques, la protéine Tau est acétylée sur 14 lysines principalement localisées dans le domaine de liaison aux microtubules (Morris et al., 2015). Par comparaison avec la phosphorylation qui vise principalement la région riche en proline, ceci illustre bien le fait que chaque modification post-traductionnelle peut-être attribuée à une région de la protéine.

Bien que l'étude de l'implication de l'acétylation dans le processus neurodégénératif soit récente, quelques auteurs se sont penchés sur le rôle joué par cette modification. Concernant le taux d'acétylation, Min et collaborateurs ont montré qu'en conditions pathologiques (neurones primaires traités avec du peptide amyloïde), le niveau global d'acétylation est augmenté (**figure 22-A**) (Min et al., 2010). Dans la même étude, la détermination du taux de protéine Tau acétylée extraite du cortex frontal de patients atteints par la maladie d'Alzheimer à différents stades a permis de confirmer les résultats obtenus en culture primaire : il existe une corrélation positive entre l'acétylation de la protéine Tau et le degré de sévérité de la maladie (**figure 22-B**) (Min et al., 2010).

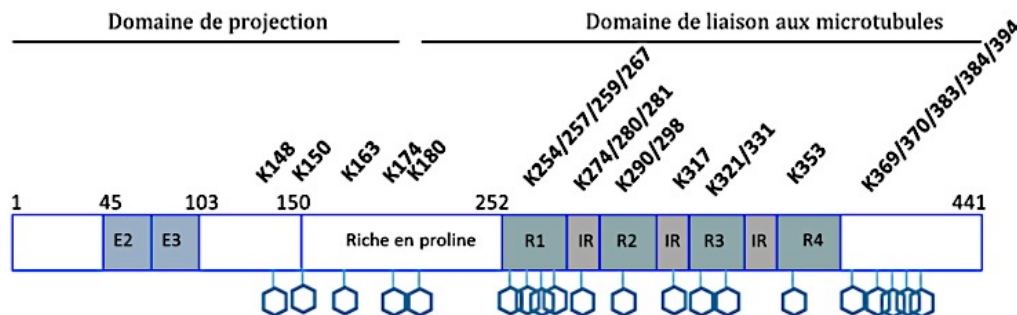




**Figure 22** : Elévation du niveau d'acétylation de la protéine Tau dans des conditions pathologiques. **A**-On constate que l'acétylation de Tau est augmentée lorsque les neurones primaires sont incubés en présence d'oligomères Aβ en faible quantité. **B**-Taux d'acétylation de la protéine Tau en fonction du stade de la maladie défini par le Dr. Braak. (Figure adaptée de (Min et al., 2010))

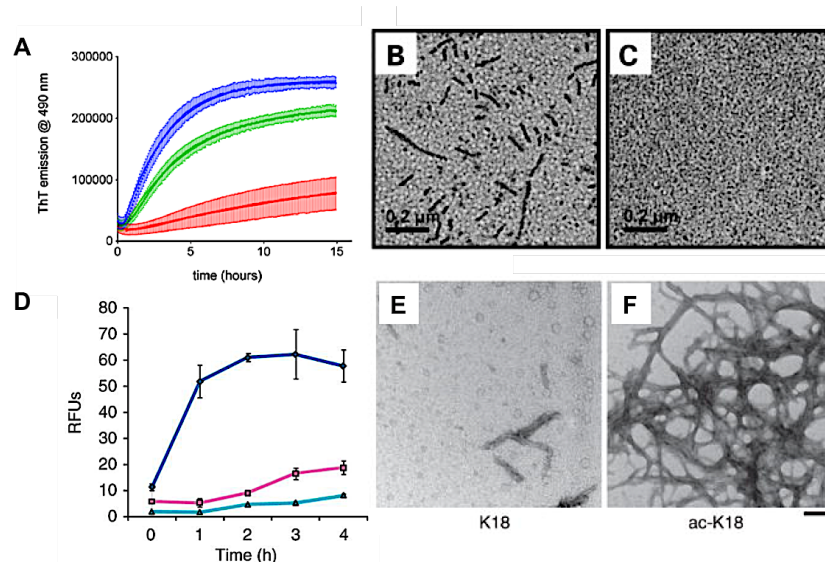
L'analyse par spectrométrie de masse de cette protéine Tau acétylée *in vitro* par p300 a permis d'identifier 23 sites d'acétylation, dont 13 localisés dans le domaine de liaison aux microtubules (**figure 23**) (Min et al., 2010), soit une augmentation d'un facteur 2 par comparaison avec l'analyse de l'acétylation endogène de Tau en conditions non pathologiques menée par Morris et collaborateurs (Morris et al., 2015). Ceci est confirmé par Kamah et collaborateurs qui utilisent la résonance magnétique nucléaire pour caractériser la protéine Tau acétylée par CBP et identifient aussi plus de 20 sites d'acétylation (Kamah et al., 2014). Ainsi, quelle que soit l'enzyme utilisée, globalement le profil de modification reste identique. On peut par exemple citer l'acétylation de la lysine 280 (Ac-K280) qui est probablement l'épitope acétylé caractéristique de la maladie d'Alzheimer mais aussi de la maladie de Pick et de la dégénérescence cortico-basale. En effet, par immunohistomarquage de coupes de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer, on observe une parfaite co-localisation des anticorps anti-PHF1 (phosphorylation) et anti-Ac-K280 (Irwin et al., 2012). Min et collaborateurs ont aussi

montré que l'acétylation de la lysine 174 était aussi associée aux stades précoces de la maladie d'Alzheimer ce qui renforce encore le rôle joué par l'acétylation dans la neurodégénération (Min et al., 2015).



**Figure 23** : Sites d'acétylation identifiés par spectrométrie de masse après phosphorylation de Tau par p300 (Min et al., 2010). L'acétylation de Tau par p300 conduit à une perte de fonction de la protéine, sujet abordé dans la suite du manuscrit.

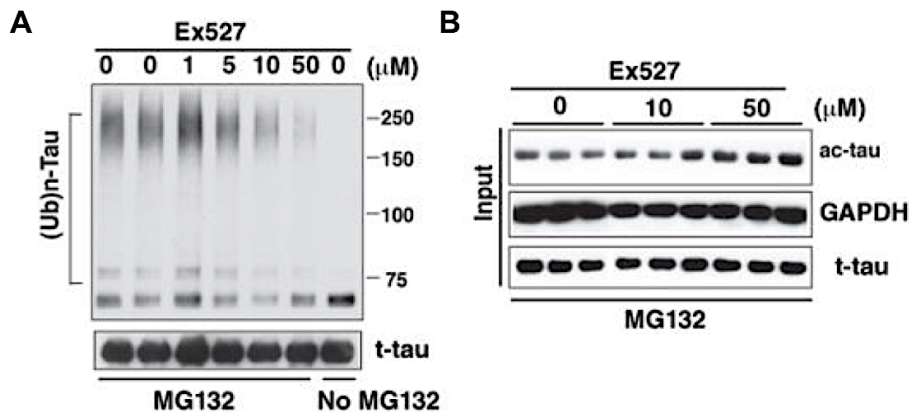
Du point de vue fonctionnel, l'acétylation pathologique de Tau va être synonyme de perte de fonction entraînant la cytotoxicité : diminution de sa solubilité et de sa capacité d'assemblage des microtubules. En effet, l'acétylation par CBP du fragment K18, correspondant au seul domaine de liaison aux microtubules, conduit à une inhibition de la capacité de polymérisation des microtubules. Ceci s'explique par l'acétylation de la lysine 280 au sein du motif  $^{275}\text{VQIINKK}^{281}$  essentiel à la liaison aux microtubules (Cohen et al., 2011). Concernant l'agrégation, les auteurs ont montré que l'acétylation, toujours par CBP, augmentait la capacité d'agrégation du fragment K18 (**figure 24 D-E-F**). En revanche, si l'on considère la protéine Tau complète, aucun effet de l'acétylation par CBP sur l'agrégation n'est observé (Cohen et al., 2011). De la même manière, par l'acétylation *in vitro* de la protéine Tau 2N4R par p300, Cook et collaborateurs ont montré que cette réaction d'acétylation conduisait à une diminution de la capacité d'agrégation de Tau, toujours par l'utilisation d'un modèle d'agrégation induit par l'héparine (Cook et al., 2014b). De même, Kamah et collaborateurs montrent que l'acétylation de Tau 2N4R par CBP diminue la capacité d'agrégation de la protéine Tau (**figure 24 A-B-C**) (Kamah et al., 2014) ce qui contredit directement les observations réalisées sur le fragment K18 (**figure 24 D-E-F**).



**Figure 24** : Contradiction des résultats concernant le rôle de l'acétylation sur l'agrégation de la protéine Tau dans un modèle d'induction par l'héparine. **A-B-C**-Agrégation de Tau2N4R acétylée par p300 ou CBP. **A**-Kamah et collaborateurs démontrent que l'acétylation par CBP diminue la capacité d'agrégation de Tau2N4R (rouge) par comparaison avec la Tau non modifiée (bleue) ou auto-acétylée (vert) (Kamah et al., 2014), résultats confirmés par Cook et collaborateurs par observations en microscopie électronique en transmission des échantillons non acétylé (**B**) et acétylé par p300 (**C**) (Cook et al., 2014b). En revanche, Cohen et collaborateurs montrent que l'acétylation du fragment K18 par CBP (**D**-bleu et **F**) augmente la capacité d'agrégation par comparaison avec le fragment non acétylé (**D**-rose et **E**). On note que la courbe turquoise correspond au K18 porteur de la mutation K311D inhibitrice de l'agrégation (Cohen et al., 2011).

Ces différentes études révèlent une nouvelle fois la complexité du lien entre mécanisme d'agrégation et modifications post-traductionnelles et mettent en avant l'insuffisance du modèle d'agrégation induit par l'héparine qui, dans ce cas, ne permet pas de conclure clairement sur le rôle de l'acétylation. Néanmoins, quelle que soit l'étude considérée, il apparaît clairement que l'acétylation joue un rôle non négligeable dans le processus neurodégénératif. Outre cela, elle est directement impliquée dans la dégradation des protéines par compétition directe avec l'ubiquitination, modification post-traductionnelle signalant le départ de la protéine vers la voie de dégradation protéasomale. Ainsi, on imagine relativement facilement qu'une acétylation accrue de la protéine Tau diminuerait l'ubiquitination et donc conduirait à une accumulation. Ce troisième rôle joué par l'acétylation a été démontré par Min et collaborateurs par l'utilisation d'un modèle cellulaire HEK293T exprimant la protéine Tau et l'ubiquitine porteuse d'un tag hemagglutine (HA). Dans ce modèle, les voies de désacétylation par SIRT1 et de dégradation protéasomale sont inhibées respectivement par EX527 et MG132 de manière à observer les conséquences de l'acétylation sur l'ubiquitination et donc indirectement la

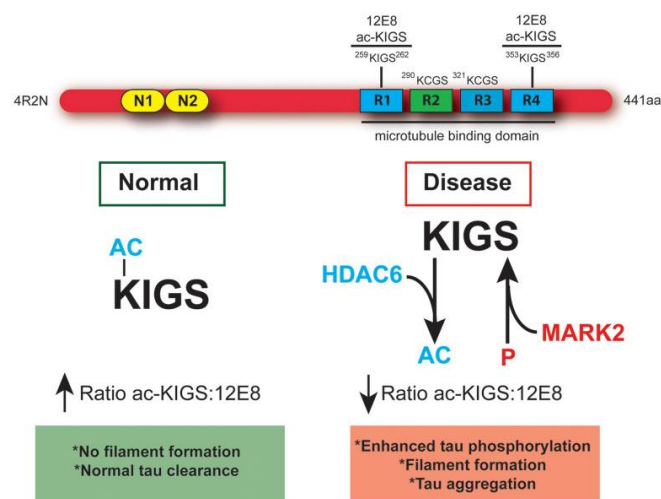
dégradation de la protéine (Min et al., 2010). Par ce modèle, les auteurs ont donc montré que l'inhibition de SIRT1 par EX527 entraîne une augmentation de l'acétylation de Tau de manière dose-dépendante. Cette augmentation corrèle parfaitement avec la diminution de l'ubiquitination de Tau et à une accumulation de la protéine qui n'est donc plus dégradée (**figure 25**).



**Figure 25** : L'augmentation de l'acétylation de Tau induit une diminution de l'ubiquitination et donc une accumulation de la protéine qui n'est plus dégradée (Min et al., 2010).

Ceci pose donc la question du rôle joué par les désacétylases dans la maladie d'Alzheimer. En effet, comme évoqué précédemment, le niveau d'acétylation de la protéine Tau est augmenté dans les conditions pathologiques ce qui entraîne une accumulation de la protéine et une modification de ses propriétés. Tout ceci sous-entend une perturbation du système de désacétylation qui, dans le cas sain, devrait contre-balancer la sur-acétylation. Pour mémoire, les deux enzymes majeures responsables de la désacétylation de Tau sont SIRT1 et HDAC6. Concernant la première, Julien et collaborateurs ont montré une réduction significative de la quantité de SIRT1 (-29% des ARNm et -45% des protéines) chez les sujets atteints par la maladie d'Alzheimer (Julien et al., 2009). De plus, il a été démontré par l'utilisation d'un modèle de souris Alzheimer que la surexpression de SIRT1 protège contre la neurodégénération induite par Tau (Kim et al., 2007). Ainsi, à l'heure actuelle il est admis que SIRT1 joue un rôle neuroprotecteur mais le mécanisme sous-jacent n'est toujours pas clairement établi. Concernant HDAC6, la situation n'est pas aussi claire que SIRT1 et plus complexe car celle-ci désacétyle spécifiquement les motifs KXGS du domaine de liaison au microtubules. Cook et

collaborateurs démontrent que l'acétylation de ce motif inhibe l'agrégation de Tau (Cook et al., 2014b). Mais, ces motifs sont également porteurs d'un site de phosphorylation, la sérine 262. Lorsque cette dernière se retrouve phosphorylée (épitope 12E8, observé dans les stades précoces (Augustinack et al., 2002)), l'affinité de la protéine Tau pour les microtubules est drastiquement réduite. De plus, cette même phosphorylation entraîne une impossibilité de prise en charge par l'ubiquitine-ligase CHIP (*C-terminus of Hsc Interacting Protein*) et donc une diminution de l'ubiquitination conduisant à une accumulation de Tau (Dickey et al., 2006). Or il s'avère que si le résidu lysine à proximité de cette sérine du motif KXGS est acétylé, la phosphorylation est bloquée et donc tout le processus pathologique qui en découle aussi (Cook et al., 2014b). Ainsi, en désacétylant la lysine voisine, HDAC6 déstabilise la balance acétyle/phospho autour de l'épitope 12E8 et favorise le processus pathologique neurodégénératif. En d'autres termes, diminuer l'activité HDAC6 protégerait contre la dégénérescence neurofibrillaire liée à Tau (**figure 26**). Cet exemple illustre parfaitement l'interconnexion entre les différentes modifications post-traductionnelles et, une nouvelle fois, la complexité du processus pathologique qui en découle. On se trouve donc dans une situation de « pseudo-compétition » inter-modifications post-traductionnelles qui ciblent le même motif et non le même acide aminé, sujet développé dans la suite du manuscrit.

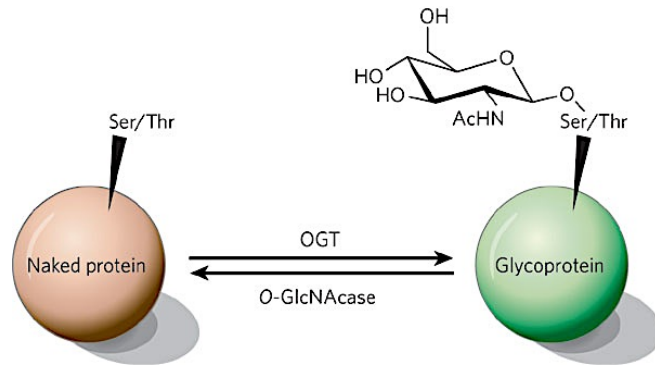


**Figure 26** : Schéma résumant le rôle joué par HDAC6 dans la déacétylation des motifs KXGS et dans la « pseudo-compétition » entre acétylation et phosphorylation pouvant aboutir à la pathologie (Cook et al., 2014b)

Pour conclure sur l'acétylation, cette deuxième modification post-traductionnelle apporte un degré de complexité supplémentaire au mécanisme liant les modifications post-traductionnelles et l'agrégation de la protéine Tau, dans la maladie d'Alzheimer mais aussi dans d'autres tauopathies. L'équilibre subtil en acétyl-transférases et désacétylases, apparaît crucial dans l'inhibition ou le déclenchement de l'agrégation de la protéine Tau mais aussi dans l'accumulation de celle-ci par inhibition de la machinerie de dégradation cellulaire. L'étroite connexion avec la phosphorylation et la compétition avec l'ubiquitination semble peu à peu démontrer que l'agrégation de la protéine Tau n'est pas uniquement liée à son état de phosphorylation mais implique un large panel de modifications post-traductionnelles.

### iii. L'O-GlcNAcylation

L'O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle décrite récemment, dans les années 1980, par Hart et Torres lors de l'étude des polysaccharides de surface des lymphocytes (Torres and Hart, 1984). Elle consiste en l'ajout d'un groupement  $\beta$ -D-N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur les résidus sérines et thréonines *via* une liaison O-glycosidique (**figure 27**). A l'inverse des N- et O-glycosylations qui se déroulent spécifiquement dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, la O-GlcNAcylation a lieu dans de nombreux compartiments cellulaires tels que le noyau, la mitochondrie, le cytoplasme et même au niveau membranaire (Varki et al., 2009). Ainsi il s'agit d'une modification ubiquitaire visant un grand nombre de protéines exerçant des fonctions cellulaires différentes : facteurs de transcription, protéines du cytosquelette, protéines transmembranaires etc... En dépit du grand nombre de protéines ciblées par l'O-GlcNAcylation, seules deux enzymes catalysent la réaction : l'O-GlcNAc transférase (OGT) et l'O-GlcNAcase (OGA) qui sont responsables respectivement de l'ajout et de l'élimination du résidu GlcNAc (Hart et al., 2007).



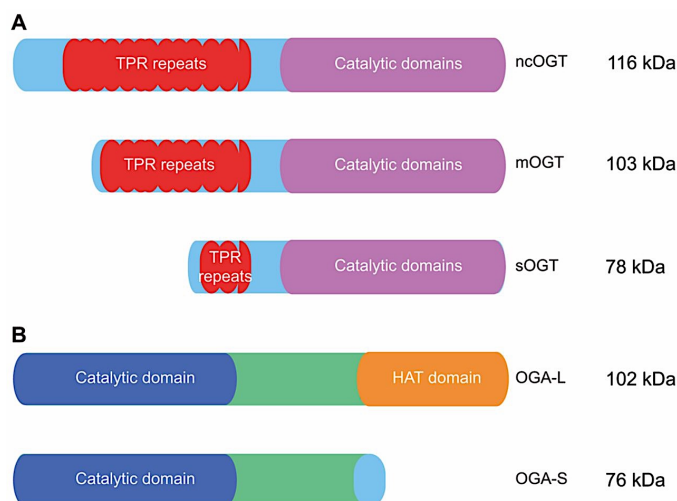
**Figure 27** : Représentation schématique du cycle réversible de l'O-GlcNAcylation d'une protéine (Hart et al., 2007).

L'OGT, principalement retrouvée au niveau hépatique et cérébral, est une enzyme constituée de deux domaines principaux : le domaine N-terminal composé de plusieurs tétratricopeptides (domaine TPR) et le domaine C-terminal porteur de l'activité catalytique glycosyltransferase et du domaine de liaison au substrat, l'UDP-GlcNAc. Le domaine TPR est constitué par la répétition (3 à 12 fois) de motifs identiques de 34 acides aminés qui s'organisent en tandem d'hélices- $\alpha$  et constituent l'échafaudage structurant des interactions protéine-protéine. Il existe 3 isoformes de l'OGT provenant de l'épissage d'un ARNm qui distinguent par leur domaine TPR plus ou moins long (**figure 28-A**) (Harwood and Hanover, 2014; Iyer and Hart, 2003) :

- Nucleocytoplasmique (**ncOGT**) : 12 TPRs
- Mitochondriale (**mOGT**) : 9 TPRs + séquence d'adressage à la mitochondrie
- « Short » OGT (**sOGT**) : 2 TPRs

L'OGA, retrouvée principalement au niveau pancréatique et cérébral, est non seulement porteuse en N-terminal du domaine catalytique O-GlcNAcase mais possède aussi une activité histone acétyltransférase (HAT) en C-terminal. De manière similaire à l'OGT, il existe 2 isoformes de l'OGA qui se distinguent par leur localisation cellulaire (**figure 28-B**) (Harwood and Hanover, 2014) :

- Cytoplasmique (**OGA-L**) : long domaine HAT C-terminal
- Nucléaire (**OGA-S**) : absence de domaine HAT



**Figure 28** : Représentation schématique des différentes isoformes de l'OGT (A) et de l'OGA (B) (Harwood and Hanover, 2014)

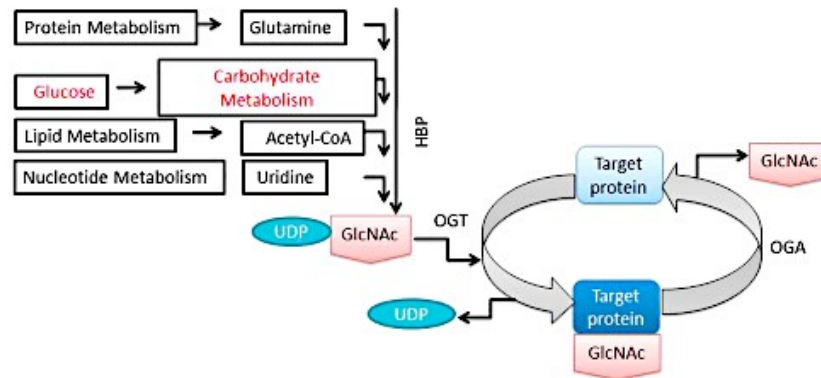
Ainsi pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, le niveau global d'O-GlcNAcylation est régulé par deux moyens : la régulation des activités OGA et OGT ainsi que la régulation de la quantité de substrat disponible, l'UDP-GlcNAc. Concernant l'activité enzymatique Shen et collaborateurs ont montré que la quantité d'UDP-GlcNAc disponible influe directement sur l'activité OGT/OGA et donc sur le taux d'O-GlcNAcylation intracellulaire (Shen et al., 2012). Le problème se complique si l'on considère la synthèse de l'UDP-GlcNAc qui est générée à partir du glucose intracellulaire empruntant la voie de biosynthèse des hexosamines. En effet, celle-ci pourra être activée/inhibée en fonction des différentes étapes de la biosynthèse. En omettant volontairement les activités enzymatiques impliquées dans cette voie, on distingue plusieurs éléments indispensables à la synthèse du substrat final (**figure 29**) (Wani et al., 2016) :

- **Glucose** intracellulaire amené par le métabolisme des carbohydrates
- **Glutamine** amenée par le métabolisme protéique et nécessaire à l'étape de transformation du fructose-6-phosphate en glucosamine-6-phosphate
- **Acetyl-CoA** issue du catabolisme lipidique, protéique ou glucidique
- **Uridine** issue du métabolisme des acides nucléiques

On constate donc que la quantité finale d'UDP-GlcNAc disponible pour les enzymes de modification sera, en majeure partie, liée à la quantité de glucose



disponible. Ce constat pose donc la question de l'O-GlcNAcylation des protéines dans le cas de perturbations du métabolisme glucidique tel que le diabète.

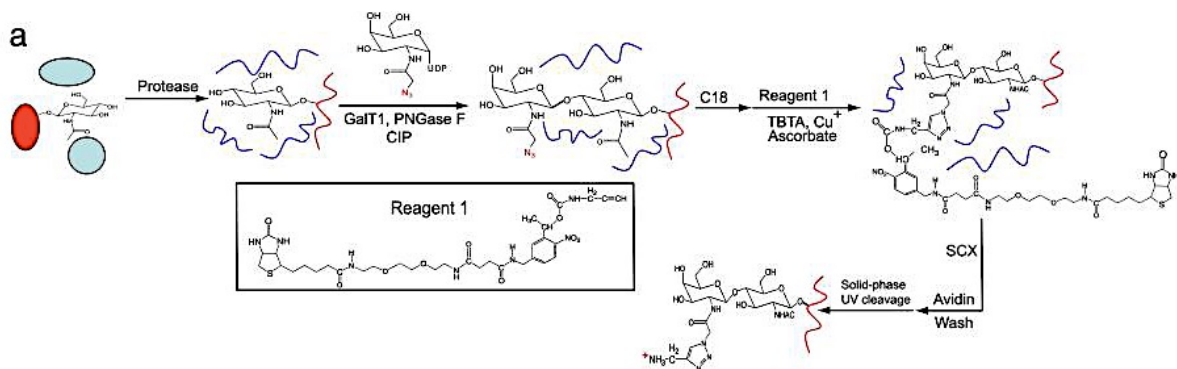


**Figure 29** : Schéma résumant les principales voies métaboliques aboutissant à la synthèse d'UDP-GlcNAc. HBP = Hexosamine Biosynthesis Pathway (Wani et al., 2016)

Des études protéomiques sur des extraits de cerveaux de souris et d'Homme ont permis d'identifier plus de 1000 protéines O-GlcNAcylées occupant diverses fonctions-clefs dans le fonctionnement neuronal : transduction du signal *via* la cascade d'activation MAPK, régulation de l'expression des gènes ou encore dégradation des protéines (Skorobogatko et al., 2011). Mais ça n'est qu'en 1996 qu'Arnold et collaborateurs décrivent l'O-GlcNAcylation de la protéine Tau bovine, quelle que soit l'isoforme considérée (Arnold et al., 1996). La même année, Wang et collaborateurs démontrent que les PHFs issus de patients atteints par la maladie d'Alzheimer sont non seulement phosphorylés mais aussi glycosylés alors que la protéine Tau « saine » ne l'est pas (Wang et al., 1996). Ces deux études proposent donc pour la première fois l'O-GlcNAcylation comme modification potentiellement impliquée dans le processus neurodégénératif impliquant Tau, notamment par une potentielle compétition avec la phosphorylation pour les résidus Ser/Thr.

Mais ça n'est que dans les années 2010 que paraît la première étude sur l'identification des sites O-GlcNAcylés (Wang et al., 2010). Il faut souligner la stratégie complexe mise en oeuvre afin d'isoler et enrichir spécifiquement la fraction Tau O-GlcNAcylée à partir d'un extrait de cerveau (**figure 30**) :

- 1) Digestion de l'extrait par la trypsine
- 2) Digestion par la PNGase F afin de dégrader les potentiels N-glycanes porteurs de GlcNAc en position N-terminale
- 3) Marquage spécifique des peptides O-GlcNAcylés par un azido-sucre (UDP-GalNAz) transféré par la galactosyltransférase GalT1
- 4) Ajout de phosphatase alcaline pour hydrolyser l'UDP généré afin d'éviter l'inhibition de la GalT1
- 5) Purification en phase inverse (C18) pour éliminer l'excès d'UDP-GalNAz
- 6) Réaction de *click-chemistry* entre le groupement azido et un alcyne porteur d'une biotine et d'un groupement clivable par irradiation.
- 7) Purification du produit de ligation sur colonne avidine et élution du produit par irradiation UV

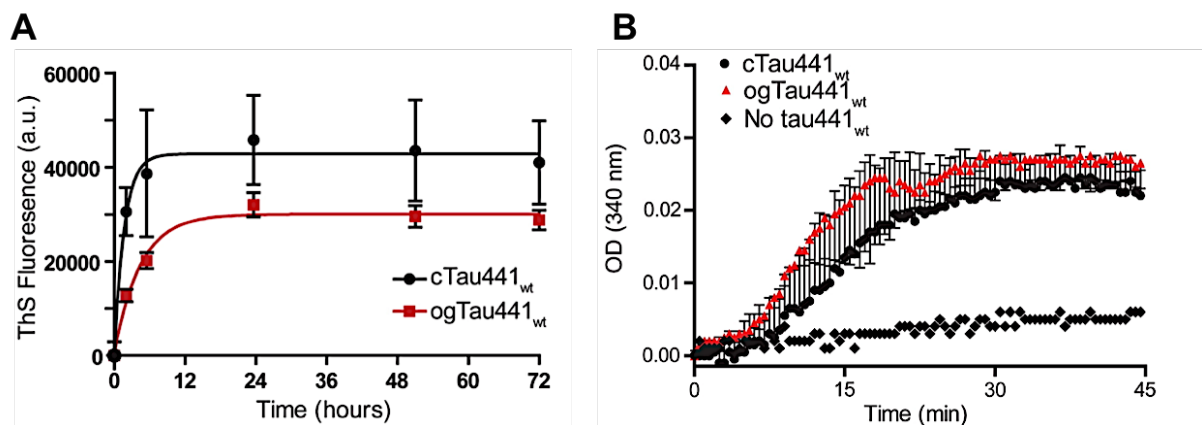


**Figure 30** : Stratégie d'enrichissement de la fraction Tau O-GlcNAcylée à partir d'un extrait de cerveau de rat (Wang et al., 2010).

Par l'analyse en spectrométrie de masse de la fraction purifiée, les auteurs ont mis en évidence l'O-GlcNAcylation de la sérine 400. Face aux multiples étapes nécessaires à l'enrichissement de la fraction d'intérêt à partir d'un extrait de cerveau, Yuzwa et collaborateurs développent un modèle de coexpression de la protéine Tau et de l'OGT. Ceci permet une nouvelle fois d'identifier la Ser400 mais aussi la Thr123 et un troisième résidu parmi les Ser409/412/413 (Yuzwa et al., 2011). Dans la foulée, le criblage de peptide de Tau modifiés *in vitro* par l'OGT met en évidence l'O-GlcNAcylation des Ser208, Ser238 et une nouvelle fois de la Ser400 (Smet-Nocca et

al., 2011). En 2015, l'étude menée par Morris et collaborateurs sur l'O-GlcNAcylation de la protéine Tau murine met en évidence un unique site d'O-GlcNAcylation : la Ser400 (Morris et al., 2015). Quelque soit l'étude considérée, l'analyse de cette « nouvelle » modification post-traductionnelle met en avant les difficultés techniques de détection ce qui explique probablement sa découverte tardive. Néanmoins, toutes s'accordent sur un site principal d'O-GlcNAcylation de la protéine Tau, la Ser400.

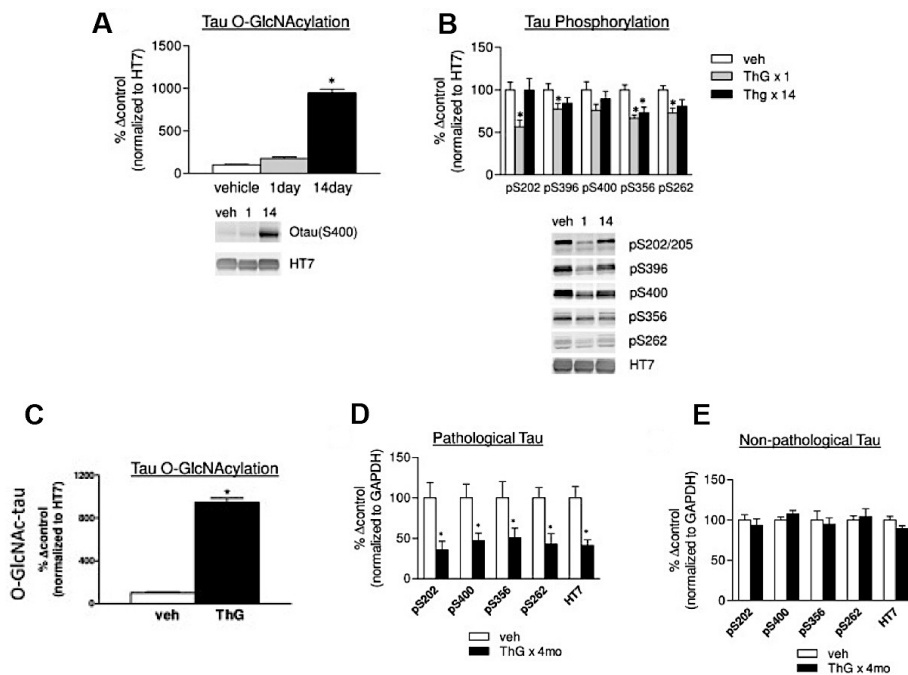
Actuellement, peu d'études portant sur les conséquences fonctionnelles de l'O-GlcNAcylation de Tau sont recensées dans la littérature. Récemment Vocadlo et collaborateurs ont démontré que celle-ci, principalement localisée sur la Ser400, entraîne une diminution des capacités d'agrégation de la protéine Tau 2N4R, dans un modèle d'agrégation induit par l'héparine sans altérer la capacité de polymérisation des microtubules (Yuzwa et al., 2014). Ainsi dans ce modèle *in vitro*, l'O-GlcNAcylation de la Ser400 aurait un effet anti-agrégatif de la protéine Tau et jouerait donc un rôle protecteur contre la maladie d'Alzheimer (**figure 31**).



**Figure 31** : Etude *in vitro* des conséquences fonctionnelles de l'O-GlcNAcylation de Tau sur la Ser400 dans un modèle d'agrégation induit par l'héparine (**A**) et dans un modèle de polymérisation des microtubules (**B**). cTau441wt = Tau2N4R coexprimée avec le mutant OGT H558A inactif ; ogTau441wt = Tau2N4R coexprimée avec l'OGT wt active. (Figure adaptée de (Yuzwa et al., 2014))

Cette hypothèse formulée *in vitro* sur le rôle protecteur de l'O-GlcNAcylation se confirme *in vivo* par l'utilisation d'un modèle Alzheimer de souris transgéniques (rTg4510) surexprimant la mutant Tau-P301L connu pour ses propriétés d'agrégation rapide. Une administration répétée de thiamet G, inhibiteur de l'activité OGA, durant 14 jours réduit la pathologie Tau sans altérer la phosphorylation physiologique de la

protéine. Ces observations confirment donc le rôle protecteur de l'O-GlcNAcylation dans le processus d'agrégation de la protéine Tau (Graham et al., 2014). De plus, les auteurs montrent même une diminution de la phosphorylation sur certains épitopes pathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, notamment l'épitope AT8 et 12E8, 4h après l'administration du thiamet G ou suite à une administration régulière durant 4 mois (**figure 32**) (Graham et al., 2014), ce qui soulève donc la question de la compétition entre phosphorylation et O-GlcNAcylation pour les résidus sérines et thréonines. L'O-GlcNAcylation de sites potentiellement impliqués dans la pathologie bloquerait-elle la phosphorylation et donc l'agrégation ? Cet aspect sera développé plus tard dans le manuscrit lorsque sera abordée la notion de compétition entre modifications post-traductionnelles.



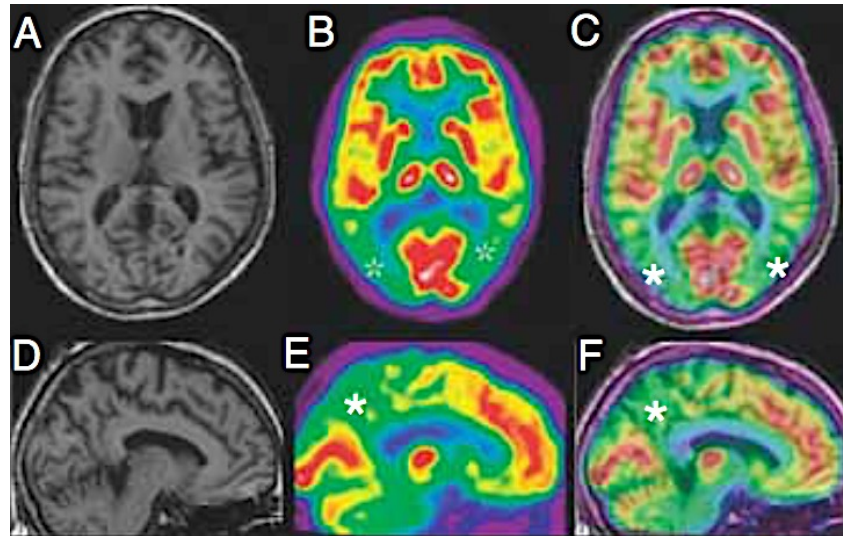
**Figure 32** : Effets de l'administration de thiamet G dans des souris rTg4510 sur l'O-GlcNAcylation de la protéine Tau durant 14 jours (**A et B**) ou 4 mois (**C, D et E**). Vehicle (veh) = souris contrôles n'ayant pas reçu le thiamet G. (Figure adaptée de (Graham et al., 2014))

Sur la base de ces études et de cette hypothèse, on peut donc logiquement penser que les patients atteints par la maladie d'Alzheimer présenteraient un défaut d'O-GlcNAcylation permettant donc l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine. Robertson et collaborateurs montrent une diminution du niveau d'O-

GlcNAcylation de la protéine Tau extraite de cerveaux de patients atteints par la maladie, par comparaison avec des patients sains ce qui corrobore l'hypothèse initialement formulée et l'étend même au cas des démences fronto-temporales (Robertson et al., 2004). Mais comment expliquer cette baisse du niveau d'O-GlcNAcylation ? Inhibition de l'OGT ? Sur-activation de l'OGA ? Perturbations sur la voie de biosynthèse du précurseur UDP-GlcNAc au niveau cérébral?

Le métabolisme du glucose au niveau cérébral représente 50% de la consommation glucidique corporelle globale. Ceci s'explique par la capacité limitée qu'a le cerveau à produire son énergie *via* les autres sources métaboliques (Peters et al., 2004). Des études ont montré une diminution du métabolisme glucidique liée à l'âge chez les sujets sains par l'utilisation la tomographie par émission de positrons (TEP) (Ivančević et al., 2000).

Cette technique est basée sur l'utilisation d'un analogue radioactif du glucose porteur d'un atome  $^{18}\text{F}$  à la place de l'hydroxyle en position 2 : le 2-désoxy-2- $(^{18}\text{F})$ fluoro-D-glucopyranose ( $^{18}\text{F}$ -FDG,  $\frac{1}{2}$  vie : 110 minutes). Par radioactivité  $\beta^+$ , l'atome  $^{18}\text{F}$  se désintègre en  $^{18}\text{O}$  entraînant l'émission de positrons qui s'annihilent avec des électrons (1 positron + 1 électron) pour libérer deux photons qui seront détectés par scintigraphie. Ainsi le  $^{18}\text{F}$ -FDG est utilisé comme traceur métabolique : lors de son injection, il est principalement métabolisé par les cellules consommatrices de glucose, les neurones dans le cas présent. Dans le cas de l'O-GlcNAcylation, il entrera donc dans la voie de biosynthèse des hexosamines aboutissant à la synthèse d'UDP-GlcNAc et donc de protéines O-GlcNAcylées. Ainsi, par des méthodes de traitement du signal, cette technique permettra de mesurer l'activité du métabolisme glucidique cérébrale et de reconstituer dans les trois dimensions une image la résumant en fonction des différentes régions (**figure 33**). Cette technique peu invasive se pose donc en tant que technique de choix dans la détection des troubles du métabolisme du glucose en relation, ou non, avec les pathologies neurodégénératives caractérisées par une diminution de l'activité métabolique glucidique (Herholz, 2014).



**Figure 33** : Clichés montrant des images par IRM (A et D), par TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG (B et E) et par TEP/IRM fusionnées (C et F) obtenues chez une patiente âgée de 70 ans ayant un diagnostic de maladie d'Alzheimer probable. L'astérisque indique l'hypométabolisme glucidique touchant la région temporo-pariétale ainsi que le corps calleux postérieur caractéristique de la MA. L'activité métabolique est directement liée à la couleur. Rouge = forte ; Jaune = intermédiaire ; Verte = faible (Herholz, 2014).

Il est reconnu que l'âge reste le risque majeur de développement de la maladie d'Alzheimer. De nombreuses études ont révélées la présence de perturbations du métabolisme du glucose dans la maladie d'Alzheimer. En effet, dès les années 1990 avant la découverte de l'O-GlcNAcylation de la protéine Tau, il est démontré, par comparaison avec des sujets sains, que l'activité métabolique diminue de manière drastique au niveau du cortex temporo-pariétal et du lobe frontal chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer (Heiss et al., 1991). Dans ces conditions, un lien potentiel peut être établi entre la diminution du métabolisme glucidique liée à l'âge et le développement de la pathologie Alzheimer. En 2009, Liu et collaborateurs mettent en évidence le fait que ces perturbations métaboliques entraînent directement une baisse de l'O-GlcNAcylation de la protéine Tau ce qui permet l'hyperphosphorylation déclencheur de l'agrégation. De plus, par l'utilisation du modèle murin, ils montrent aussi que l'inhibition de la GFAT (*Glutamine :Fructose-6-phosphate Aminotransferase*), intervenant dans la voie de biosynthèse des hexosamines, par l'injection intracérébroventriculaire de DON (6-diazo-5-oxonorleucine) provoque une diminution de l'O-GlcNAcylation et une nouvelle augmentation de la phosphorylation de Tau (Liu et al., 2009). Ceci s'explique par le fait que l'activité OGT est très sensible à la quantité d'UDP-GlcNAc disponible. Ainsi,

une baisse de substrat entraîne une baisse d'activité et donc une baisse du taux de modification (Taylor et al., 2008). Enfin, une étude portant sur les transporteurs cérébraux de glucose, GLUT1 et 3, dans la maladie d'Alzheimer démontre une diminution de l'expression de ceux-ci qui corrèle avec la diminution de l'O-GlcNAcylation et, une nouvelle fois, l'augmentation de la phosphorylation (Liu et al., 2008). Ces différentes études s'accordent toutes sur le fait que les perturbations du métabolisme du glucose sont potentiellement une cause, et non une conséquence, de la maladie d'Alzheimer. Cette affirmation soulève donc une dernière question : quel lien peut-il exister avec le diabète, trouble majeur de la glycémie ? Cette dernière question ne sera pas développée ici en détails mais plusieurs études ont démontré un lien entre diabète de type 2 et neurodégénération, deux pathologies liés à l'âge (de Matos et al., 2017). Brièvement, le diabète de type 2 est caractérisé par une résistance des cellules à l'insuline qui entraîne une diminution du glucose intracellulaire : dans ces conditions, il est facile d'envisager la baisse d'UDP-GlcNAc formée et donc la diminution d'O-GlcNAcylation de la protéine Tau.

En conclusion, l'O-GlcNAcylation apparaît donc comme une modification post-traductionnelle protectrice de l'agrégation de la protéine Tau caractéristique de la maladie d'Alzheimer et d'autres tauopathies. Ce rôle protecteur repose sur une compétition avec la phosphorylation pour des sites clés du processus agrégatif, aspect développé dans la suite du manuscrit.

## **B. Les autres modifications post-traductionnelles**

Même si phosphorylation, acétylation et O-GlcNAcylation se posent en tant que modifications post-traductionnelles principales impliquées dans la modulation des propriétés de la protéine Tau, il n'en est pas moins qu'il existe d'autres modifications, moins étudiées et moins répandues, pouvant être regroupées en deux catégories : covalentes et non covalentes. Parmi les modifications covalentes, dont font parties les 3 modifications précédemment décrites, on distinguera les modifications par ajout d'un groupement chimique, glucidique ou peptidique. Par opposition, les modifications non covalentes consistent en une modification de la structure primaire (clivage) ou conformationnelle locale de la protéine par modification de l'équilibre *cis-trans* des prolines. En effet, étant une protéine

intrinsèquement désordonnée, Tau possède 43 prolines soit 10% de sa séquence qui seront la cible de diverses PPlases.

## **i. Modifications covalentes par ajout d'un groupement chimique**

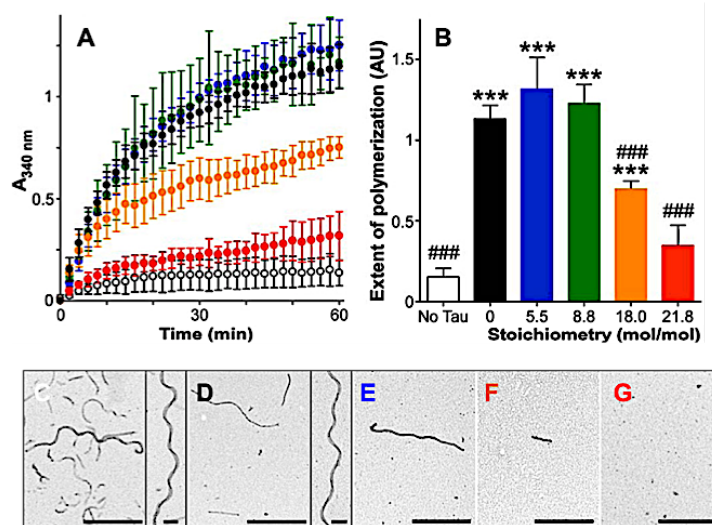
### **a. La méthylation**

La méthylation des protéines est une modification post-traductionnelle ciblant principalement les résidus lysines et arginines. Elle consiste en un transfert d'un groupement méthyle, diméthyle sur la chaîne latérale des acides aminés cibles. On note que les lysines peuvent aussi être modifiées par triméthylation (Guo et al., 2014). Ces réactions sont catalysées par deux familles d'enzymes : les PRMTs (*protein arginines methyltransferases*) et les PKMTs (*protein lysines methyltransferases*). Pendant longtemps la méthylation des protéines était considérée comme irréversible jusqu'à la découverte en 2007 des déméthylases (Anand and Marmorstein, 2007). La méthylation des protéines est surtout impliquée dans la régulation de la transcription en ciblant spécifiquement les résidus lysines des histones. En effet, l'interaction électrostatique entre l'ADN, chargé négativement, et les chaînes latérales des résidus lysines des histones entraîne l'inhibition de la transcription par compaction de l'ADN. Dans le cas de la méthylation, cette inhibition est levée car l'interaction électrostatique est rompue ce qui permet un dépliement de la molécule d'ADN et donc la transcription.

La méthylation de la protéine Tau est une modification post-traductionnelles très récemment décrite. Peu d'études se sont penchées sur les conséquences fonctionnelles de cette modification. En 2012, Thomas et collaborateurs ont montré, par l'analyse en spectrométrie de masse de PHFs isolées de patients atteints de la maladie d'Alzheimer que 7 lysines étaient méthylées : Lys44, Lys163, Lys174, Lys180, Lys254, Lys267 et Lys290 (Thomas et al., 2012). Par comparaison avec l'étude de Funk et collaborateurs qui identifient 11 sites de méthylation sur Tau isolée de personnes saines (Funk et al., 2014), on conclut donc à une diminution de la méthylation de Tau dans la maladie d'Alzheimer. De plus, *via* l'utilisation de la voie chimique (alkylation réductive des groupements amines de chaînes latérales de lysines), ils ont introduit différents méthyles sur la protéine Tau dans des proportions stoechiométriques différentes et ont montré, d'une part, que la méthylation protège



de l'agrégation, dans un modèle induit au thiazine red, et d'autre part qu'elle n'est pas incompatible avec l'activité MAP de Tau (**figure 34**) (dans des conditions de stoechiométrie physiologique) (Funk et al., 2014).



**Figure 34** : Modulation des propriétés de Tau par méthylation. Les fonctions amines des chaînes latérales des lysines sont méthylées par réaction d'alkylation réductive. **A et B** représentent la capacité de polymérisation des microtubules. Pour les conditions inférieures à 8,8 moles de méthyle par mole de Tau (physiologique) on constate que l'activité n'est pas perturbée. De plus les tests d'agrégation montrent, toujours dans les mêmes conditions de méthylation, que l'agrégation de Tau est inhibée, quel que soit l'état de méthylation (**C, D, E, F, G**). (figure adaptée de (Funk et al., 2014))

Ainsi du point de vue fonctionnel, la méthylation serait donc protectrice de la pathogénicité de Tau par compétition avec d'autres modifications post-traductionnelles décrites comme impliquées dans la maladie notamment l'acétylation et l'ubiquitination qui ciblent, elles aussi, les lysines de la protéine. Cet aspect sera développé avec la notion de compétition et de dialogue entre les différentes modifications post-traductionnelles.

## b. La polyamination

La polyamination des protéines est catalysée en 2 étapes par les transglutaminases (TGs) : une première réaction avec les glutamines pour former un intermédiaire covalent suivie d'une réaction avec la fonction amine (nucléophile) des chaînes latérales des lysines. Cette réaction aboutit à la formation d'une liaison isopeptidique  $\gamma$ -glutamyl- $\epsilon$ -lysine. Murthy et collaborateurs ont identifié sur la protéine Tau 10 lysines localisées autour du domaine de liaison aux microtubules et 8

glutamines, dont les principales sont respectivement les Lys163, Lys240 et les Gln351 et Gln424 (Murthy et al., 1998). A ce jour, peu d'études sur le rôle physiologique de la polyamination de Tau ont été publiées. Dans un modèle cellulaire SH-SY5Y, il a été démontré que la polyamination joue un rôle protecteur contre la dégradation sans altérer la capacité de liaison aux microtubules (Tucholski et al., 1999). En revanche, il est facile d'imaginer la formation d'un véritable réseau de protéine Tau grâce à cette modification, ce qui l'implique donc potentiellement dans la formation des PHFs, véritable enchevêtrement de Tau pathologique. Dans un modèle de souris transgéniques exprimant Tau P301L, il a été démontré que les transglutaminases sont impliquées dans la formation et la stabilisation des PHFs à partir de protéine Tau phosphorylée (Halverson et al., 2005). De plus, Johnson et collaborateurs, par l'analyse de l'activité transglutaminase de cortex préfrontaux recueillis chez des patients atteints par la maladie d'Alzheimer, ont démontré une activité enzymatique accrue dans le cas pathologiques (Johnson et al., 1997). Ces différentes études proposent le mécanisme de polyamination comme impliqué dans la formation des PHFs.

## **ii. Modifications covalentes par ajout d'un groupement glucidique**

### **a. La N-glycosylation**

La N-glycosylation des protéines consiste en l'ajout d'un groupement glucidique sur les résidus asparagines. Cette modification a lieu essentiellement au niveau du reticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Il a été démontré que Tau n'est pas N-glycosylée dans le cas sain mais que cette modification est retrouvée chez les patients Alzheimer (Sato et al., 2001; Wang et al., 1996). Le traitement à la PNGase-F de PHFs isolés de cerveaux de patients malades entraîne leur dissociation (Wang et al., 2010). En revanche, le mécanisme liant la N-glycosylation à l'agrégation de la protéine Tau n'est pas clairement établi. A l'inverse de l'O-GlcNAcylation, la N-glycosylation joue un rôle délétère sur la phosphorylation de Tau : Liu et collaborateurs ont montré que cette glycosylation pathologique entraîne une phosphorylation accrue des résidus Ser214, Ser262/Ser356 (épitope 12E8) par PKA mais surtout une inhibition de la déphosphorylation des Ser198, Ser199 et Ser202 (épitope AT8) par PP2A et PP5 (Liu et al., 2002).

## **b. La glycation**

A l'inverse de toutes les modifications post-traductionnelles présentée jusqu'à présent, la glycation n'est pas catalysée par une ou plusieurs enzymes. Elle consiste en la réaction des chaînes latérales de lysines avec un groupement glucidique. Cette modification fut initialement découverte lors de l'étude du lien entre la glycémie et la concentration en hémoglobine Alc (HbA1c, hémoglobine glyquée) chez les patients diabétiques (Koenig et al., 1976). Du point de vue fonctionnel, il a été démontré que la glycation des protéines perturbait les propriétés biologiques et était liée à de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose, le diabète, diverses pathologies liées à l'âge... mais surtout impliquée dans les neuropathies (Brownlee et al., 1988; Lee and Cerami, 1992).

*In vitro* douze sites de glycation ont été identifiés sur Tau dont sept sont localisés dans le domaine de liaison aux microtubules ce qui pourrait potentiellement perturber son activité MAP (Nacharaju et al., 1997). Cette modification a pour conséquence de bloquer le processus de dégradation et donc favoriser l'accumulation de Tau au niveau cellulaire. De plus, cette protéine Tau glyquée est sensible à l'oxydation ce qui entraîne la production de radicaux libres, très toxiques pour la cellule (Smith et al., 1996). Ainsi même si la glycation promeut l'accumulation d'agrégats de Tau, il a été démontré qu'à elle seule, elle n'est pas capable de déclencher l'agrégation (Necula and Kuret, 2004).

## **iii. Modifications covalentes par ajout d'un groupement peptidique**

### **a. L'ubiquitination**

L'ubiquitination des protéines consiste en l'ajout d'une ou plusieurs petites protéines de 76 acides aminés, l'ubiquitine, préférentiellement sur les résidus lysines mais aussi, dans le cas des histones par exemple, sur les serines, thréonines et cystéines (Cadwell and Coscoy, 2005). Cette modification post-traductionnelle est séquentiellement catalysée par trois grandes classes d'enzymes : E1-, E2- et E3-ligases. Les USP (*ubiquitin specific peptidase*) catalysent la réaction inverse ce qui permet donc la désubiquitination des protéines et le recyclage de l'ubiquitine.

Plusieurs fonctions sont attribuées à cette modification post-traductionnelle dont la plus connue est la dégradation des protéines ubiquitinées par la voie protéasomale.

En conditions physiologiques, il a été démontré que Tau, phosphorylée ou non, peut être dégradée suivant la voie protéasomale « classique » nécessitant l'ubiquitination préalable de la protéine (Zhang et al., 2005). De plus, David et collaborateurs ont montré que Tau, ainsi que d'autres protéines intrinsèquement désordonnées, peuvent être directement dégradées par le cœur catalytique 20S du protéasome, sans ubiquitination (David et al., 2002). L'analyse par spectrométrie de masse de Tau purifiée de PHFs révèle la présence de trois sites d'ubiquitination dans sa partie C-terminale au niveau des lysines Lys254, Lys311 et Lys353 du domaine de liaison aux microtubules (Cripps et al., 2006). Concernant la longueur des chaînes polyubiquitines identifiées sur ces résidus, les auteurs ont montré que celles-ci étaient principalement modifiées par trois polyubiquitination majeures : 6, 11 et 48 modules d'ubiquitine, cette dernière étant majoritaire et servant de signal déclencheur pour la dégradation (Cripps et al., 2006). Une question se pose donc : « Pour quelle(s) raison(s) la protéine Tau essentiellement ubiquitinée par des chaînes polyUb(48) n'est-elle pas dégradée ? ». Plus récemment, il a été montré que la polyubiquitination par des chaînes polyUb(6) inhibe la voie de dégradation protéasomale (Shang et al., 2005) ce qui suggère donc que ce type d'ubiquitination serait impliquée dans l'accumulation de Tau.

## **b. La SUMOylation**

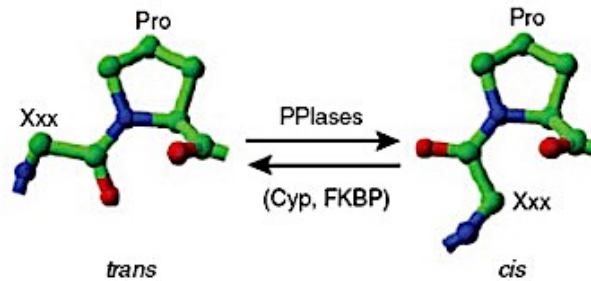
La SUMOylation des protéines est une modification post-traductionnelle très proche de l'ubiquitination. En effet, elle vise aussi les résidus lysines et implique une cascade enzymatique similaire à l'ubiquitination. Elle consiste donc en l'ajout de peptide SUMO (*small ubiquitin-like modifier*, 12 kDa) sur les lysines d'une protéine cible. A ce jour, quatre protéines SUMO ont été caractérisées : SUMO-1 à -4. Tout comme l'ubiquitination, cette modification est réversible par l'action des protéases de la famille SENP (*Sentrin protease*). Cette modification intervient notamment dans le contrôle de l'activité enzymatique, la localisation cellulaire ou encore la modulation de la stabilité des protéines cibles (Dorval and Fraser, 2006).

Par l'utilisation du modèle cellulaire HEK293 cotransfecté par un vecteur Tau/SUMO-his, Dorval et collaborateurs ont identifié la lysine 340 comme site majeur de SUMOylation (SUMO-1) de Tau (Dorval and Fraser, 2006). De plus, les auteurs ont montré que celle-ci est stimulée par la phosphorylation, ce qui suggère donc un lien entre phosphorylation et SUMOylation (Dorval and Fraser, 2006). Ces résultats ont été confirmés dans le modèle de souris transgéniques hAPP par Takahashi et collaborateurs qui observent une colocalisation de SUMO-1 et phospho-Tau par marquage immunohistochimique de coupes de cerveaux (Takahashi et al., 2008). Même si ces deux modifications semblent liées, à ce jour aucune hypothèse impliquant la SUMOylation dans le mécanisme d'agrégation n'est formulée. Etant donné la compétition entre ubiquitination et SUMOylation, on peut imaginer un mécanisme de compétition liant ces deux modifications et entraînant ou non l'accumulation de la protéine qui sera par la suite phosphorylée. Cet aspect sera développé dans la partie portant sur le dialogue entre les modifications post-traductionnelles.

#### iv. Modification par changement conformationnel : les peptidylprolyl *cis-trans* isomérases (PPIases)

Pour rappel, la séquence primaire d'une protéine est constituée par l'enchaînement d'acides aminés reliés entre eux par une liaison peptidique pouvant exister sous deux conformations : *cis* ou *trans* (**figure 35**). Cependant, du fait de l'encombrement stérique induit par les chaînes latérales, la conformation *trans* est très nettement favorisée. A la différence des autres acides aminés, la proline possède une fonction amine secondaire cyclique : sa chaîne latérale est donc plus compacte (moins de degrés de liberté). Du point de vue structural, cette particularité confère à la proline l'avantage de pouvoir adopter, dans certains cas, une conformation *cis*. Cette dynamique *cis-trans* ainsi que l'absence de fonction amide N-H donneur/accepteur de liaisons hydrogènes rendent la proline incompatible avec l'adoption de structures secondaires rigides telles que les hélices- $\alpha$  et les feuillets- $\beta$ . C'est pourquoi la séquence primaire des protéines intrinsèquement désordonnées est caractérisée par un fort taux de prolines, 43 sur 441 pour Tau. L'inter-conversion de la liaison peptidique X-Pro (X étant un acide aminé différent de la proline) est catalysée par les peptidylprolyl *cis-trans* isomérases (PPIases). Plusieurs groupes de

PPIases ont été identifiées : les parvulines, les *FK506 Binding proteins* (FKBP) et les cyclophilines (Cyp), ces deux derniers groupes faisant parties de la famille des immunophilines (Lu et al., 2007).

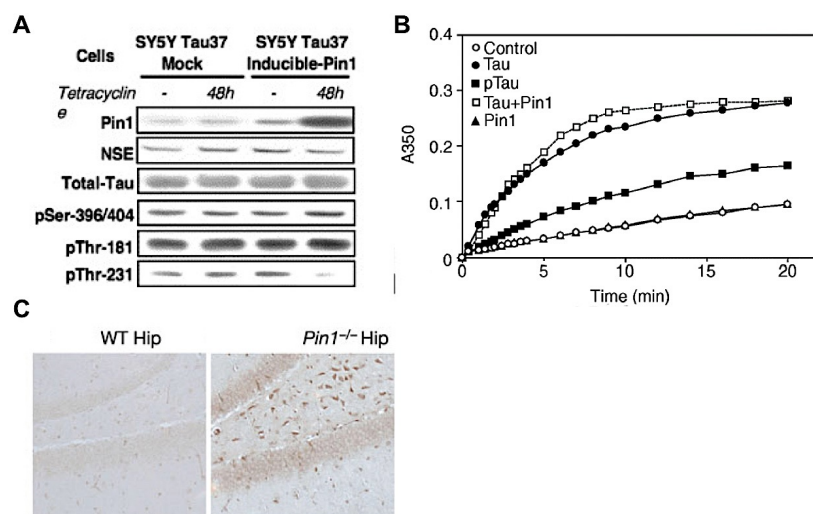


**Figure 35** : Isomérisation de la liaison peptidique X-Pro catalysée par les peptidylprolyl *cis-trans* isomérasés (PPIases) (Lu et al., 2007).

A ce jour, la protéine Tau a été décrite comme cible de la parvuline Pin1 (*peptidylprolyl cis-trans isomerase NIMA interacting 1*) et de trois immunophilines FKBP : FKBP12, FKBP51 et FKBP52.

En effet, Pin 1 isomérisé spécifiquement le lien peptidique *pSer/pThr-Pro*. En 1999, Lu et collaborateurs démontrent *in vitro* et par marquage immunohistologique de coupes de cerveaux que Tau phosphorylée est la cible de Pin1 et définissent la pThr231 comme le site d'interaction principale de l'interaction (Lu et al., 1999). Cependant, des études menées par résonance magnétique nucléaire au sein de notre laboratoire ont montré une absence de spécificité de reconnaissance des phospho-épitopes par Pin1 (Smet et al., 2004, 2005). En effet, Smet et collaborateurs démontrent tout d'abord une interaction avec plusieurs phosphopeptides de Tau contenant les motifs pThr212-Pro213, pThr217-Pro218 et pThr231-Pro232. De plus, ils démontrent que le dipeptide pThr-Pro est reconnu avec une affinité similaire à celle déterminée sur les peptides de Tau. En revanche, même si l'interaction ne semble pas si spécifique, l'activité PPIase de Pin1 n'est pas observée dans tous les cas et n'est mise en évidence *in vitro* qu'au niveau de l'épitope AT100 (pThr212-Pro213-pSer214-Leu215) ce qui semble élargir le domaine d'action de Pin1 par rapport à l'étude de Lu et collaborateurs (Lu et al., 1999). De manière générale, l'activité PPIase de Pin1 sur un motif pThr/pSer-Pro de Tau va donc accélérer l'inter-conversion *cis-trans* de la liaison peptidique ce qui entraîne donc une modification locale de la structure et donc une meilleure accessibilité au motif

phosphorylé pour d'autres partenaires tels que les phosphatases *trans*-spécifiques telle que PP2A (Landrieu et al., 2011; Zhou et al., 2000). En effet, par l'utilisation d'un modèle neuronal, Hamdane et collaborateurs ont démontré l'existence d'un lien entre l'expression de Pin1 et la déphosphorylation de Tau, plus spécifiquement au niveau du motif pThr231-Pro232 (**figure 36-A**) (Hamdane et al., 2006). Il s'avère que cette déphosphorylation est permise par l'intervention de la protéine phosphatase PP2A dont l'action est induite par l'activité PPIase de Pin1 (Bulbarelli et al., 2009). Cette déphosphorylation de la pThr231 a pour conséquence la restauration de la capacité de liaison aux microtubules (**figure 36-B**) (Lu et al., 1999). Pour mémoire, ce motif pThr231 a été identifié comme un site précocement phosphorylé dans la maladie d'Alzheimer (Goedert et al., 1994) ce qui suggère donc un rôle protecteur de Pin1 vis-à-vis de la phosphorylation et donc de l'agrégation de Tau. Cette hypothèse est renforcée par l'étude menée par Liou et collaborateurs qui démontrent que des souris n'exprimant plus Pin1 (*knock-out* Pin1) présentent des signes de dégénérescence neurofibrillaire (**figure 36-C**) (Liou et al., 2003).

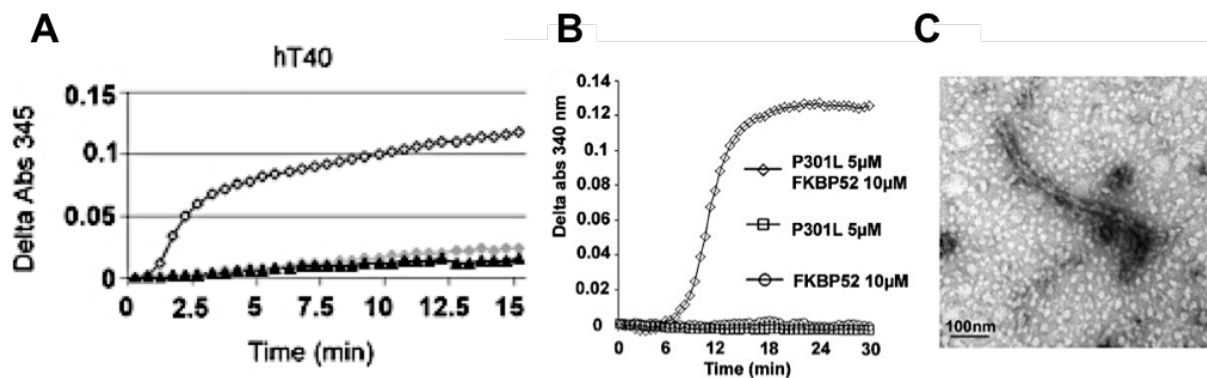


**Figure 36** : Conséquence de l'activité PPIase de Pin1 sur la phosphorylation de la protéine Tau (A), sa capacité de liaison aux microtubules (B) et sur le déclenchement de la dégénérescence neurofibrillaire (C). **A**-Analyse par western blot de la phosphorylation de Tau après induction de l'expression de Pin1 par la tétracycline. On constate la déphosphorylation spécifique de la pThr231 48h après l'induction de Pin1 (Hamdane et al., 2006). **B**-Capacité d'assemblage des microtubules en présence/absence de Pin1 et de Tau native ou phosphorylée par Cdc-2. On constate qu'en présence de Pin1, phospho-Tau est de nouveau capable de polymériser les microtubules (Lu et al., 1999). **C**-Coloration « Gallyas silver » des neurones d'une coupe de cerveau de souris sauvage ou KO-Pin1. On constate le développement d'une dégénérescence neurofibrillaire chez les souris n'exprimant plus Pin1 (Liou et al., 2003).

Concernant le groupe des *FK-506 binding protein* (FKBP), ces immunophilines possèdent une double fonction à l'origine de leur dénomination. En effet, en plus de leur activité PPIase, elles sont capables de se lier à l'immunosuppresseur FK-506 qui cible la calcineurine plus connue sous le nom de protéine phosphatase 2B (PP2B). Différentes études ont montré un lien entre cette molécule et la régulation de Tau et A $\beta$  *in vivo* mais les conclusions de ces études sont quelques peu contradictoires. Dans un modèle de souris transgénique TauP301S, Yoshiyama et collaborateurs ont démontré une diminution de la pathologie Tau par traitement au FK-506 (Yoshiyama et al., 2007). En revanche, dans des souris sauvages, Luo et collaborateurs ont montré l'effet inverse (Luo et al., 2008) : l'injection intracérébrale de FK-506 conduit à une inhibition de PP2B qui se traduit par une augmentation de la phosphorylation de Tau et l'apparition de certains phospho-épitopes pathologiques tels que la pSer262 (12E8), pSer199, pSer202 et pSer396/404 (PHF-1). Même si les conclusions de ces deux études sont différentes, elles démontrent l'implication des FKBP dans la protection/déclenchement de la pathologie Tau.

FKPB52, probablement l'immunophiline de la famille FKBP la plus étudiée, est composée de trois domaines, TPR (comme celui de certaines OGTs) et PPIase. Elle est codée par le gène FKPB4 dont l'expression est élevée au niveau cérébral. Initialement FKBP52 est décrite comme impliquée dans la translocation nucléaire du récepteur aux glucocorticoïdes (Tatro et al., 2009). Chambraud et collaborateurs ont démontré que cette immunophiline est aussi impliquée dans une interaction avec Tau se traduisant par une inhibition *in vitro* de sa capacité à polymériser les microtubules (**figure 37-A**) (Chambraud et al., 2010). De plus, l'extinction du gène FKBP4 et donc l'absence de FKPB52 dans un modèle *zebrafish* P301L restaure l'activité synaptique (Giustiniani et al., 2014). Les auteurs montrent aussi que cette absence de FKBP52 est à relier à une diminution de phosphorylation de la pThr181. Pour finir, *in vitro* il a été démontré que FKBP52 induit l'agrégation de la protéine TauP301L (**figure 37-B-C**) (Giustiniani et al., 2014). Ces résultats suggèrent donc un rôle pathologique de l'immunophiline dans la maladie d'Alzheimer.





**Figure 37** : Effets de FKBP52 sur la capacité de polymérisation des microtubules (A) et sur la capacité d'agrégation (B et C) de Tau. **A**-Test de polymérisation de la tubuline. La tubuline est extraite de cerveaux de rats et incubée avec (losanges blancs) ou sans (losange gris) Tau et en présence de Tau+FKBP52 (triangle noirs). On constate une inhibition de la polymérisation de la tubuline en présence de FKBP52 (Chambraud et al., 2010). **B- et C**-Test d'agrégation *in vitro* de Tau P301L avec ou sans FKBP52 dans un modèle sans héparine et observations en microscopie électronique en transmission. On constate que FKBP52 déclenche l'agrégation de la protéine Tau P301L (Giustiniani et al., 2014).

Mais en 2012, l'étude par immunohistofluorescence menée par la même équipe sur des coupes de cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer nuance ce potentiel rôle de FKBP52. En effet, les auteurs ont montré une diminution de l'expression de FKBP52 au niveau cérébral chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer (Giustiniani et al., 2012). De plus, ils constatent que FKBP52 co-localise avec Tau chez les patients sains mais pas chez les sujets malades. Tout ceci révèle donc la complexité du mécanisme liant FKBP52, Tau et la maladie d'Alzheimer.

FKPB51, homologue de FKBP52 codée par le gène *FKPB5*, est aussi très exprimée au niveau cérébral où elle est impliquée dans le processus de régulation de l'activité du récepteur aux glucocorticoïdes (Tatro et al., 2009). Le lien entre cette deuxième immunophiline et Tau a aussi été exploré notamment par Jinwal et collaborateurs qui ont montré dans un modèle cellulaire surexprimant FKBP51 une accumulation de Tau (moins de dégradation) ainsi qu'une modulation de la phosphorylation des résidus Ser396, Ser404, Thr231 et Ser212. En effet, les auteurs montrent qu'un mutant FKBP51 W90A ou F130A qui n'a plus d'activité PPIase, favorise la phosphorylation des résidus précédemment cités (Jinwal et al., 2010). Ces résultats suggèrent donc un rôle protecteur de FKBP51 contre la dégradation et la phosphorylation de Tau. Cette hypothèse est confirmée par l'étude menée *in vivo*

par Blair et collaborateurs sur des souris transgéniques FKBP51<sup>-/-</sup>. En effet, une nouvelle fois les auteurs démontrent une diminution de la quantité de Tau chez les souris mutantes par rapport au contrôle ce qui souligne une nouvelle fois le rôle protecteur de FKBP51 contre la dégradation (Blair et al., 2013). Une nouvelle fois, ces études prouvent la complexité du lien entre l'activité PPIase des immunophilines et le déclenchement de la maladie d'Alzheimer.

Pour finir, FKBP12, aussi retrouvée au niveau cérébrale, est la plus petite FKBP interagissant avec la protéine Tau. Sugata et collaborateurs ont montré une co-localisation de FKBP12 et des PHFs ainsi qu'une diminution de son expression dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Sugata et al., 2009). De plus, l'étude menée sur l'agrégation *in vitro* d'un peptide de Tau correspondant au R3 a permis d'établir le rôle protecteur de l'agrégation joué par FKBP12 (Ikura and Ito, 2013). Ces études suggèrent donc que cette petite immunophiline empêcherait l'oligomérisation et l'agrégation de Tau et serait donc protectrice de la maladie. Cette hypothèse doit encore être explorée ainsi que le lien entre cette FKBP et la phosphorylation de Tau via son activité régulatrice de PP2B.

#### **v. Modification par clivage peptidique**

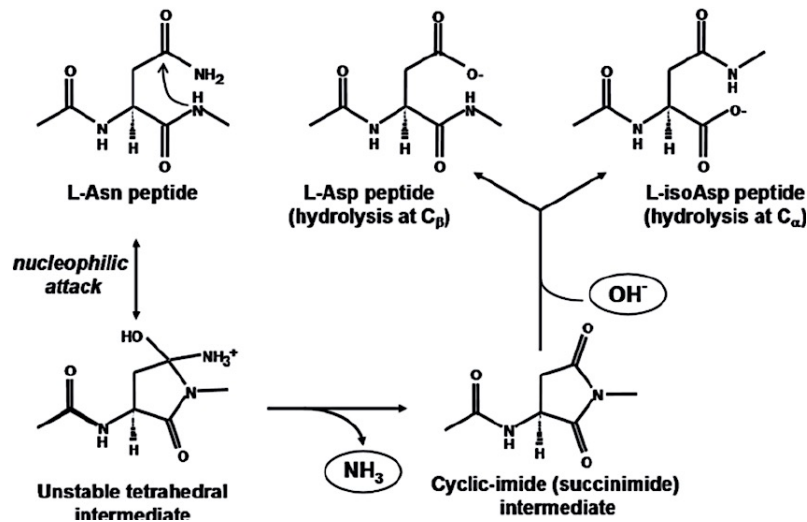
Le clivage peptidique est une modification post-traductionnelle plus rare qui consiste en la maturation protéolytique d'une (pré)-pro-protéine. En d'autres termes, la protéine précurseur sera clivée afin d'être activée suite à un signal cellulaire. On peut par exemple citer le cas de l'insuline qui est synthétisée sous forme de pré-insuline inactive. En cas d'hyperglycémie nécessitant le stockage intracellulaire du glucose sanguin, le précurseur est clivé par différentes enzymes entraînant l'activation de l'insuline. Ce clivage activateur est assuré par plusieurs groupes d'enzymes telles que les protéases à sérine (trypsine, thrombine...) et les protéases à cystéines (calpaïnes, caspases).

En conditions physiologiques, Tau ne subit pas de clivage protéolytique. En revanche cette modification post-traductionnelle a été identifiée chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer. En N-terminal, Tau est la cible de la caspase-6 au niveau de l'acide aspartique D13 (Horowitz et al., 2004). En C-terminal, deux sites de clivage par la caspase-3 ont été identifiés : l'acide glutamique E391 et l'acide

aspartique D421 (Basurto-Islas et al., 2008). D'un point de vue fonctionnel, ce clivage de la protéine Tau va directement influencer sur sa cytotoxicité. En effet, il a été prouvé que les produits de clivage de Tau par la caspase-3 contribuent au déclenchement de la mort neuronale (Chung et al., 2001). De plus, plusieurs études *in vitro* et/ou *in vivo* indiquent que ces espèces tronquées agrègent plus facilement (García-Sierra et al., 2008). Sur la base de ces études, le clivage peptidique semble donc être une modification impliquée dans les premières étapes de la formation des PHFs. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer à un stade précoce, une sur-activation de la caspase-3 a été observée (Gastard et al., 2003) entraînant ainsi l'accumulation de ces formes tronquées de la protéine Tau retrouvées au niveau des PHFs (Basurto-Islas et al., 2008; Horowitz et al., 2004).

vi. **Modification par changement de la nature de l'acide aminé : le cas de la désamidation**

La désamidation des protéines est une réaction chimique spontanée visant les fonctions amines portées par les chaînes latérales des asparagines et glutamines. Ces deux acides aminés sont alors respectivement convertis en acide aspartique ou iso-aspartique (**figure 38**) et acide glutamique ou pyroglutamique (5-oxoproline) (McKerrow and Robinson, 1971; Robinson, 2002). A pH physiologique, cela se traduit donc par l'apparition d'une charge négative (COO<sup>-</sup>) (**figure 38**) qui va donc potentiellement impacter la structure et donc la fonction biologique de la protéine (Robinson, 2002). Cette modification post-traductionnelle fut initialement observée sur deux protéines modèles : le cytochrome C (Robinson et al., 1974) et l'aldolase du muscle de rat (McKerrow and Robinson, 1974). Il a été démontré que la désamidation des asparagines et glutamines était impliquée dans le « *turnover* » des protéines (Robinson and Robinson, 2001). De plus, par l'étude de la micro-hétérogénéité de l'histone H1<sup>0</sup> extrait de cerveaux et de foies de rats, Lindner et collaborateurs ont montré l'existence d'une corrélation positive entre la désamidation de la protéine et le vieillissement des rats. (Lindner et al., 1998).



**Figure 38** : Mécanisme de la désamidation de l'asparagine (Asn) à pH neutre et basique. L'attaque nucléophile de la fonction amine de la chaîne latérale de l'Asn par la fonction amide de l'acide aminé en position *i*+1 entraîne la formation d'un intermédiaire succinimide qui, après hydrolyse, entrainera la formation d'aspartate ou d'iso-aspartate porteurs d'une charge négative sur leur chaîne latérale (Xie and Schowen, 1999)

Concernant la désamidation de la protéine Tau, dès 1986, Avila et collaborateurs suggèrent le rôle central joué par cette modification post-traductionnelle dans l'agrégation de la protéine Tau (Montejo de Garcini et al., 1986). Par l'utilisation de diverses enzymes (glutaminases, asparaginases...), les auteurs précisent que seule la désamidation des glutamines semble impliquée dans l'agrégation. En revanche, quelques années plus tard, l'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse de la protéine Tau isolée de cerveaux sains ou de patients atteints par la maladie d'Alzheimer (PHFs) permet d'identifier deux sites de désamidation, Asn167 et Asn279 (Hasegawa et al., 1992). En 2013, Dan et collaborateurs prouvent que cette désamidation de Asn279 est « spécifique » de la maladie d'Alzheimer. En effet, celle-ci n'est pas observée dans les cas de la dégénérescence cortico-basale ou de la paralysie supranucléaire progressive. De plus, les auteurs montrent, par l'utilisation d'un mutant Tau N279D, que la désamidation de la protéine Tau entraîne une diminution de sa capacité à polymériser les microtubules (Dan et al., 2013). Pour finir, on note que les Asn381 et Asn387 ont aussi été identifiées comme sites de désamidation en acide iso-aspartique et semblent impliqués dans les étapes de dimérisation conduisant à l'agrégation de la protéine Tau (Watanabe et al., 1999). En conclusion, même si à ce jour la désamidation de la protéine Tau reste une modification post-traductionnelle

peu étudiée, celle-ci semble impliqué dans l'agrégation pathologique de la protéine Tau. De plus, par analogie avec l'étude menée par Lindner et collaborateurs (Lindner et al., 1998), on peut imaginer une augmentation de la désamidation de la protéine Tau avec l'âge du patient, conduisant à l'agrégation pathologique de la protéine.

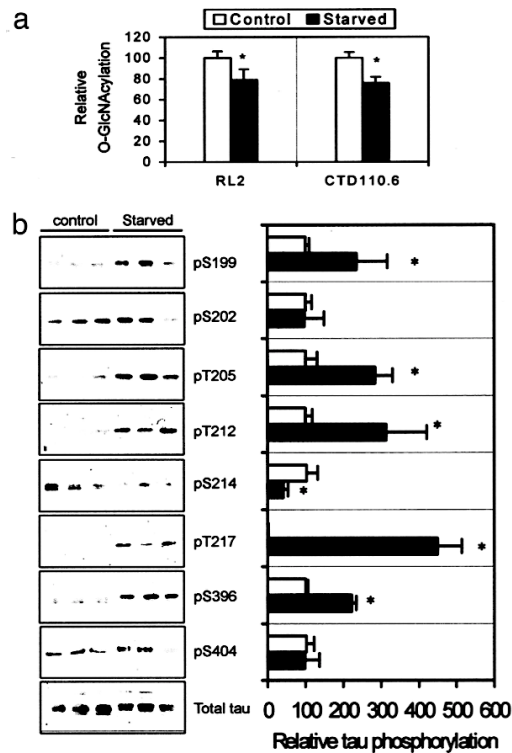
### **C. Dialogue et compétition entre modifications post-traductionnelles**

Ces notions de dialogue et de compétitions entre modifications post-traductionnelles ont émergé dans les années 2007 par l'analyse du « code des histones ». En effet, ces protéines impliquées dans la compaction de l'ADN doivent être extrêmement bien régulées et vont donc présenter un large panel de modifications telles que l'acétylation, méthylation, ubiquitination, phosphorylation etc...(Latham and Dent, 2007). Il est proposé que les diverses combinaisons possibles représentent le « code histone » qui sera lu par différents acteurs impliqués dans la modulation de la structure de la chromatine se traduisant donc par une activation/inhibition de la transcription. Deux cas de figure peuvent se présenter selon que la présence d'une modification sur un résidu X influence de manière positive ou négative la modification d'un résidu Y : on parle respectivement de dialogue positif ou négatif. La notion de compétition est un troisième cas de figure particulier puisque deux ou plusieurs modifications vont directement cibler le même résidu. Quel que soit le cas considéré, dialogue ou compétition, le panel de modifications post-traductionnelles peut et doit évoluer dans le temps afin de réguler l'activité des protéines-cibles ce qui ajoute un degré de complexité supplémentaire dans la compréhension des mécanismes de régulation par ces modifications.

Dans cette partie, nous allons donc présenter les principaux dialogues et compétitions entre modifications post-traductionnelles ciblant la protéine Tau et conduisant à des modifications des propriétés de celle-ci en relation directe ou non avec la pathologie Alzheimer.

### **i. Phosphorylation et O-GlcNAcylation : l'exemple-type**

Le lien entre ces deux modifications post-traductionnelles se situe à mi-chemin entre le dialogue et la compétition. En effet, bien que la phosphorylation soit nettement plus abondante que l'O-GlcNAcylation, ces deux modifications vont cibler les sérines et thréonines de Tau : on peut donc parler de la balance phospho/O-GlcNAc. En 2003, Lefebvre et collaborateurs démontrent que celle-ci affecte directement la localisation cellulaire de Tau : la protéine Tau O-GlcNAcylée et peu phosphorylée est préférentiellement transférée au noyau (Lefebvre et al., 2003). De plus ils montrent qu'une protéine Tau O-GlcNAcylée est peu phosphorylée et inversement, ce qui renforce donc cette notion de dialogue et compétition. Dans la foulée, Liu et collaborateurs prouvent que cette balance est impliquée dans la maladie d'Alzheimer. En effet par l'utilisation d'un modèle cellulaire PC12 surexprimant Tau, les auteurs prouvent qu'une augmentation de l'O-GlcNAcylation par inhibition de l'OGA (streptozocine et PUGNAc) entraîne une diminution de la phosphorylation des sites Ser199, Ser202, Thr205, Thr212, Ser214, Ser262 et Ser396. L'O-GlcNAcylation étant directement liée à la quantité de glucose disponible, ils ont ensuite fait varier les apports en glucose et montré qu'à faibles concentrations une augmentation de la phosphorylation est observée sur les résidus Ser199, Ser202, Thr205 et Ser396 uniquement (**figure 39**) (Liu et al., 2004). Cette condition est à mettre en parallèle avec l'hypométabolisme glucidique cérébral observé chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et suggère donc qu'une diminution de l'O-GlcNAcylation entraînerait une augmentation de la phosphorylation, notamment de l'AT8, phospho-épitope caractéristique de la maladie. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par utilisation d'un modèle de souris. Afin d'observer les conséquences de la diminution d'O-GlcNAcylation sur la phosphorylation, les souris n'ont pas été nourries durant 48h ce qui se traduit par une diminution des apports glucidiques. Suite à cette période, les auteurs ont constaté une nette augmentation des sites de phosphorylation précédemment cités dans le cas carencé par comparaison avec les souris contrôle ayant été nourries normalement (**figure 39-B**). On peut ici parler d'antagonisme entre phosphorylation et O-GlcNAcylation de la protéine Tau : la diminution de l'O-GlcNAcylation entraîne l'augmentation de la phosphorylation.



**Figure 39** : Etude in vivo de la balance O-GlcNAcylation/phosphorylation. Afin d'observer les conséquences d'une diminution de l'O-GlcNAcylation sur la phosphorylation, les souris n'ont pas été nourries durant 48h (groupe *Starved*). **A**-Niveau d'O-GlcNAcylation global des lysats de cerveaux de souris analysés par Western blot. **B**-Analyse par Western blot du profil de phosphorylation de Tau extraite des cerveaux des souris contrôles et carencées. On constate une augmentation globale de la phosphorylation lorsque l'O-GlcNAcylation est diminuée (Liu et al., 2004).

L'étude menée sur des peptides de Tau par Smet et collaborateurs (Smet-Nocca et al., 2011) met en évidence l'existence d'un dialogue entre O-GlcNAcylation et phosphorylation. En effet, la phosphorylation des résidus Ser396 et Ser404 diminue l'O-GlcNAcylation de la Ser400 qui, pour mémoire, reste le site principal identifié sur la protéine Tau (Morris et al., 2015). Mais la réciproque est vraie : l'O-GlcNAcylation préalable de la Ser400 diminue l'activité kinase de GSK3 pour les deux autres sérines adjacentes. Une nouvelle fois cette étude pose la question du rôle protecteur de l'O-GlcNAcylation puisque, dans ce cas, elle inhibe la phosphorylation du phospho-épitope PHF-1 impliqué dans la maladie d'Alzheimer. Nous sommes donc ici dans le cas d'une régulation locale puisque les 3 sites d'intérêt (Ser396/Ser400/Ser404) sont voisins. Nous pouvons tout à fait transposer cela à l'étude de Liu et collaborateurs précédemment citée qui montrent une augmentation de la phosphorylation du phospho-épitope AT8 et proposer une

potentielle régulation négative de la phosphorylation par l'O-GlcNAcylation du résidu adjacent, la Ser208, faiblement O-GlcNAcylée par l'OGT (Smet-Nocca et al., 2011).

## **ii. Phosphorylation, ubiquitination et SUMOylation**

En 2014, Luo et collaborateurs ont démontré un lien entre phosphorylation, SUMOylation et ubiquitination (Luo et al., 2014). Tout d'abord, par surexpression de SUMO-1 dans des cellules HEK293 exprimant Tau 2N4R, les auteurs ont montré une augmentation de la phosphorylation des sites Thr205, Ser214, Ser262, Ser396, Ser404. De plus, le traitement des cellules à l'acide okadaïque (inhibiteur de PP2A), induit une augmentation de la SUMOylation ce qui suggère donc une stimulation réciproque entre ces deux modifications post-traductionnelles aboutissant donc à une protéine Tau SUMOylée et hyperphosphorylée au niveau de certains phospho-épitopes pathologiques tels que le PHF-1 ou l'épitope 12E8. Outre cela, il s'avère que cette espèce Tau doublement modifiée n'est plus ubiquitinée et n'emprunte donc plus la voie de dégradation protéasomale (Luo et al., 2014). Tout ceci conduit donc à une accumulation de protéine Tau dont la solubilité est diminuée, ce qui se traduit donc par un potentiel démarrage de l'agrégation. Pour finir, l'analyse par immunomarquage anti-AT8 et anti-SUMO-1 de coupes de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer révèle une co-localisation de ces deux modifications post-traductionnelles, ce qui renforce donc l'idée d'une régulation réciproque de celles-ci.

## **iii. Phosphorylation et clivage peptidique**

A plusieurs reprises, la phosphorylation de la Ser422 a été identifiée comme phospho-épitope pathologique caractéristique de la maladie d'Alzheimer (Augustinack et al., 2002; Hanger et al., 1998). L'étude menée par Guillozet-Bongaarts et collaborateurs démontre un lien potentiel entre le site de clivage Asp421 de la caspase 3 (Basurto-Islas et al., 2008) et la phosphorylation de la Ser422. Le lien entre ces deux modifications est étudié par phospho-mimétique, la Ser422 étant mutée en acide glutamique. In vitro, il a été démontré que cette pseudo-phosphorylation en position 422 inhibe l'activité caspase-3 et réduit donc la production de fragments Tau propices à l'agrégation (Guillozet-Bongaarts et al.,



2006). Cette étude suggère donc un rôle protecteur de la phosphorylation. Or Mondragon-Rodriguez et collaborateurs démontrent *in vivo* que l'hyperphosphorylation de Tau précède le clivage dans l'établissement de la maladie d'Alzheimer (Mondragón-Rodríguez et al., 2008). En effet l'étude immunologique de coupes de cerveaux de patients atteints par la maladie à différents stades révèle la présence de structures préfibrillaires porteuses de l'épitope AT8 mais pas de l'épitope Tau-C3 (site de clivage de la caspase-3 en D421). En revanche, dans des stades plus tardifs de la maladie, espèces tronquées et phosphorylées sont retrouvées au niveau cérébral. Cette étude suggère donc que le clivage interviendrait dans les étapes de maturation des fibres, après la phosphorylation ce qui contredit partiellement les observations réalisées *in vitro*. Tout ceci révèle donc la complexité du lien entre phosphorylation et clivage peptidique. Un autre problème est soulevé par cette étude : l'étude de la phosphorylation par des techniques de phospho-mimétisme. En effet, une sérine phosphorylée n'a pas les mêmes propriétés chimiques qu'un acide glutamique notamment en terme d'affinité électronique. Or de ceci découlent directement les interactions électrostatiques. Le groupement phosphorylé ( $\text{PO}_3^{2-}$ ) a plus tendance à s'engager dans des liaisons que le groupement carbonyle ( $\text{COO}^-$ ). Ainsi même si le phospho-mimétisme s'est avéré efficace dans de nombreuses études, aux vues des difficultés à appréhender et comprendre le lien entre phosphorylation, autres modifications post-traductionnelles et agrégation, il me semble risqué de se limiter à des espèces phospho-mimées. Dans le cas présent, l'inefficacité de la mutation S422E n'est pas à exclure.

#### **iv. Phosphorylation et méthylation**

L'étude menée par Thomas et collaborateurs suggère un dialogue entre phosphorylation et méthylation. En effet, l'analyse par spectrométrie de masse en tandem de Tau purifiée de PHFs de patients malades (LC-MS/MS) révèle la présence d'un peptide [258-267] porteur des deux modifications, la *p*Ser262 et la *met*K267 (Thomas et al., 2012). La quantification des différentes espèces modifiées de ce peptide met en évidence le lien entre phosphorylation et méthylation. De la plus abondante à la plus rare les auteurs ont identifié : [258-267]-*met*K267, [258-267]-*p*S262-*met*K267, [258-267]-*p*S262, [258-267] natif. La phosphorylation serait donc favorisée par la méthylation sans que le mécanisme ne soit connu et démontré.

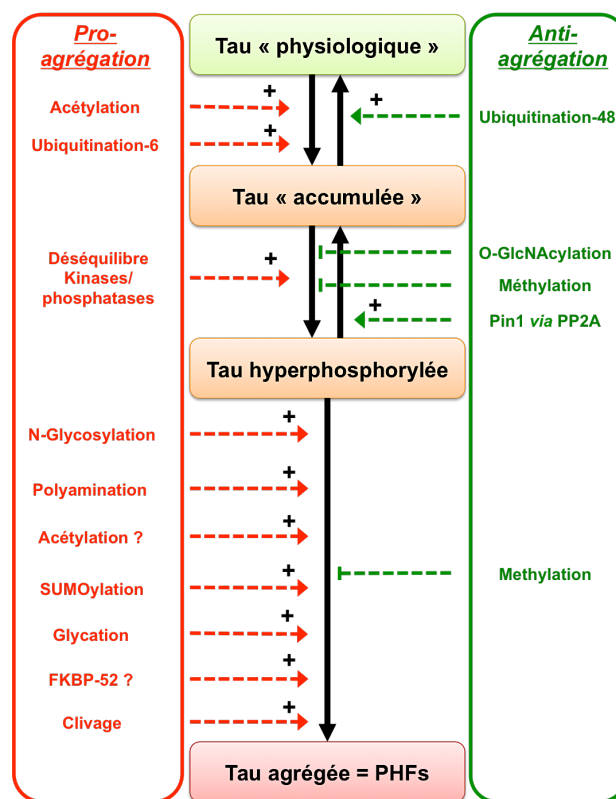
## v. Méthylation, acétylation et ubiquitination

Ces trois modifications ciblent les lysines de la protéine Tau. Pour mémoire, l'acétylation est la modification post-traductionnelle visant les lysines la plus abondante des trois, une vingtaine de sites potentiels ayant été identifiés (Min et al., 2010), contre 7 pour la méthylation (Thomas et al., 2012) et 3 pour l'ubiquitination (Cripps et al., 2006). Dans certains cas, une même lysine va donc être la cible de plusieurs enzymes de modifications. C'est notamment le cas de la lysine K254 qui peut être acétylée, ubiquitinée et méthylée. Thomas et collaborateurs démontrent même que la méthylation de cette lysine est la modification la plus abondante retrouvée au niveau des PHFs (Thomas et al., 2012). On constate aussi par comparaison des profils de méthylation et d'acétylation de la protéine Tau que six des sept sites potentiellement méthylés sont aussi la cible des acétyl-transférases (seule la lysine K44 n'est pas acétylée). Pour finir, la lysine K353 peut aussi bien être acétylée qu'ubiquitinée. Même si théoriquement tout est possible, à ce jour aucune donnée n'établit un lien clair entre ces trois modifications post-traductionnelles dans le processus neurodégénératif et l'agrégation de la protéine Tau.

## D. Conclusions sur les modifications post-traductionnelles

En conditions physiologiques, on constate que la protéine Tau est la cible d'un grand nombre de modifications post-traductionnelles réversibles pour la plupart, qui vont moduler l'activité et les propriétés de la protéine. Même s'il ne faut pas omettre le facteur génétique dans le déclenchement de certaines tauopathies, on s'aperçoit finalement qu'un grand nombre de ces modifications sont impliquées dans le déclenchement et l'établissement de la maladie d'Alzheimer (**figure 40**) mais aussi d'autres tauopathies telle que la maladie de Pick. Parmi elles, on constate que la phosphorylation, modification la plus abondante, se situe au centre du processus neurodégénératif (**figure 40**). A ce jour, aucun mécanisme clair liant la phosphorylation et l'agrégation de la protéine n'est établi, ce qui sera donc le sujet central de ma thèse. De plus, on s'aperçoit que la phosphorylation se situe au centre d'un dialogue impliquant la plupart des modifications post-traductionnelles. Celui-ci va donc influencer, directement ou indirectement, l'état de phosphorylation de la protéine. Ceci suggère donc le rôle non négligeable joué par d'autres modifications

post-traductionnelles telles que l'acétylation ou l'O-GlcNAcylation. Alors que cette dernière semble protéger Tau de l'hyperphosphorylation et donc de l'agrégation, le rôle de l'acétylation dans ce mécanisme reste encore très controversé mais on peut, par le biais des dialogues, imaginer un processus d'accumulation de la protéine Tau par inhibition de l'ubiquitination. Cette étape, antérieure à l'étape de phosphorylation, marquerait donc le point de départ de la pathologie. Cette hypothèse est appuyée par l'étude de Min et collaborateurs (Min et al., 2010) qui démontrent que l'acétylation précède la phosphorylation de Tau (**figure 40**).



**Figure 40 :** Schéma résumant l'implication de chaque modification post-traductionnelle abordée dans l'évolution de la pathologie Tau. A noter, l'ubiquitination-48 (Cripps et al., 2006) et -6 (Shang et al., 2005) correspondent respectivement à la longueur de chaîne Ub ajoutée sur le résidu lysine.

En conclusion, même si comme précédemment évoqué certains scientifiques s'accordent à dire qu'agrégation et modifications post-traductionnelles ne sont pas liées (Lai et al., 2016; Wischik, 1989; Wischik et al., 1995) nous pensons que la compréhension de ce mécanisme pathologique implique le décryptage du profil « global » de modification de la protéine Tau. Ainsi, depuis maintenant une

quarantaine d'années, l'ensemble de la communauté scientifique regroupée autour de cette thématique impliquant les modifications post-traductionnelles a développé un large panel de techniques destinées à élucider ce lien crucial dans la compréhension de la maladie et donc dans la recherche thérapeutique associée.

## IV. Moyens d'étude des MPTs et agrégation de Tau

### A. Modélisation de la pathologie Tau : MPTs et agrégation

L'étude du lien entre modifications post-traductionnelles et agrégation de la protéine Tau nécessite, d'une part la compréhension du mécanisme moléculaire et d'autre part la détermination des voies biologiques impliquées ainsi que les conséquences histologiques. Ainsi différents niveaux d'études sont nécessaires pour appréhender l'ensemble de la maladie. Alors que l'étude du mécanisme moléculaire implique une approche *in vitro* dans laquelle chaque paramètre est contrôlé, l'étude des conséquences biologiques et histologiques de la maladie nécessite une approche *in vivo* par différents modèles, cellulaires et animaux. Dans cette partie seront donc présentés quelques modèles d'études *in vivo* du lien entre modifications post-traductionnelles et agrégation de la protéine Tau ainsi que l'approche *in vitro* classiquement utilisée.

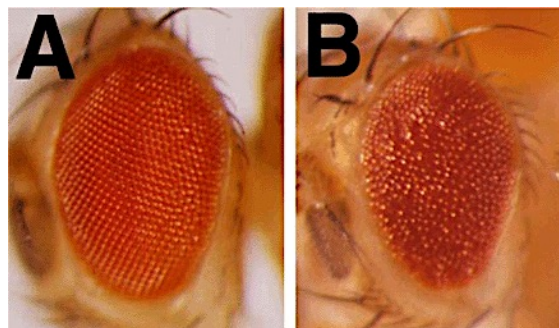
#### i. Les modèles d'étude *in vivo*

##### a. Eucaryotes inférieurs

L'intérêt des eucaryotes inférieurs réside dans la relative simplicité de leur génome qui est donc facilement manipulable à l'inverse des organismes dits « supérieurs » du point de vue évolutif qui présentent une complexité génétique accrue. Ainsi dans un premier temps, la drosophile et la lamproie ont été utilisées dans le but d'éclaircir le lien impliquant Tau dans la neurodégénération.

Chez la drosophile, un homologue de Tau a été identifié présentant 46% d'identité et 66% de similarité avec la protéine Tau humaine (Heidary and Fortini, 2001). Wittmann et collaborateurs ont développé un modèle de drosophile transgénique exprimant la Tau 2N4R humaine et un mutant R406W identifié chez des patients jeunes atteints de démences. L'inconvénient de ce modèle est l'absence

de formation de fibres de Tau dans le processus neurodégénératif : les drosophiles meurent prématurément dans les deux cas mais aucune fibre de Tau n'est identifiée (Wittmann et al., 2001). Grâce à ce modèle les auteurs montrent donc une toxicité liée à la protéine Tau mais ne tiennent pas compte du paramètre « modifications post-traductionnelles ». Par une approche similaire, Jackson et collaborateurs ont développé un nouveau modèle de drosophile transgénique surexprimant la protéine Tau humaine et l'homologue de la GSK-3 $\beta$ , la *Shaggy* (*Zeste-White3*) kinase (Jackson et al., 2002). Comme dans le modèle précédent, la neurodégénération est liée à Tau qui dans ce cas forme des fibres, ce qui souligne et renforce une nouvelle fois le rôle joué par la phosphorylation, notamment par la kinase GSK-3 $\beta$ . Pour finir, l'avantage du modèle drosophile est double : d'une part, son génome est totalement séquencé ce qui permet donc d'enlever ou muter n'importe quel gène et d'observer les conséquences sur le processus pathologique impliqué dans la maladie d'Alzheimer. D'autre part, il n'est pas nécessaire d'avoir recours à l'imagerie pour évaluer le degré de sévérité de la pathologie puisque le phénotype oculaire de la drosophile en reflète l'avancée (**figure 41**). Un œil très abîmé indiquera une maladie d'Alzheimer à un stade avancée (Dourlen, 2017).



**Figure 41** : L'expression de la Tau humaine chez la drosophile entraîne un phénotype oculaire « rugueux ». **A**-Phénotype « rugueux » retrouvé chez une drosophile exprimant Tau2N4R humaine sauvage. **B**-Phénotype retrouvé chez une drosophile exprimant Tau2N4R R406W. On constate une diminution de la taille de l'œil et une augmentation de la rugosité (Wittmann et al., 2001).

La lamproie marine est surtout utilisée pour étudier la fonction MAP de la protéine Tau. Son système nerveux est caractérisé par six neurones géants (ABCs : *Anterior Bulbar Cells*) qui s'apparentent aux neurones retrouvés chez les vertébrés. Hall et collaborateurs ont tout d'abord démontré que l'injection dans ces neurones d'un plasmide codant pour la protéine Tau humaine entraîne la formation de filaments intraneuronaux et une augmentation de la phosphorylation des phospho-

épitope AT8 et PHF-1 (Hall et al., 1997). Plus tard, ils ont prouvé que la formation de ces filaments est en fait accompagnée par une dégénérescence dendritique et une déstabilisation des microtubules du cytosquelette, des dendrites et des synapses entraînant progressivement la mort cellulaire (Hall et al., 2000).

## **b. Vertébrés**

La modélisation *in vivo* de la maladie d'Alzheimer et des maladies neurodégénératives n'est pas facile. En effet le modèle idéal doit présenter une tauopathie aboutissant à la dégénérescence neurofibrillaire et la mort neuronale mais aussi les troubles comportementaux qui en découlent sans oublier l'accumulation des plaques amyloïdes. De plus il faut aussi tenir compte de la pertinence du modèle du point de vue évolutif par comparaison avec l'Homme. Ainsi, les primates constitueraient potentiellement le modèle idéal d'autant plus qu'il a été démontré que les « vieux singes » présentaient parfois des tauopathies caractérisées par une accumulation d'agrégats de la protéine Tau et une dégénérescence neurofibrillaire s'apparentant à celle observée dans la maladie d'Alzheimer (Härtig et al., 2000). Mais ce modèle théoriquement idéal présente plusieurs inconvénients : taille de l'animal, réglementation et durée de vie (20 à 30 ans). De ce fait, la majorité des études *in vivo* réalisées sur les vertébrés utilisent le modèle murin. On distingue ainsi quatre grandes familles de modèles permettant d'étudier le fonctionnement physiopathologique de la protéine Tau :

- Les modèles murins déficients pour la protéine Tau
- Les modèles murins surexprimant les différentes isoformes de la protéine Tau sauvage
- Les modèles murins surexprimant la protéine Tau mutée sur des sites identifiés comme impliqués dans les tauopathies
- Les modèles murins présentant un déséquilibre de la balance kinases/phosphatases aboutissant à l'hyperphosphorylation, respectivement par surexpression des premières ou inhibition des secondes (technique du KO, *Knock-out*)

Les modèles murins déficients pour la protéine Tau sont les premiers modèles décrits. En 1994, Harada et collaborateurs génèrent la première lignée de

souris invalidées pour le gène Tau (Harada et al., 1994). Du point de vue histologique, le système nerveux de ces souris semble normal et l'élongation axonale n'est pas affectée : l'absence de protéine Tau est compensée par la protéine MAP1A. Seule la stabilité des microtubules des axones de petit calibre semble affectée par cette extinction de gène. Ainsi du point de vue purement histologique, l'absence de protéine Tau ne semble pas perturber la structure cérébrale globale. En revanche, du point de vue fonctionnel et comportemental, par rapport aux souris contrôle, l'absence de protéine Tau entraîne des dysfonctionnements moteurs, une faiblesse musculaire et des anomalies comportementales (peur, tendance à la chute) (Ikegami et al., 2000). Ainsi même si l'étude initiale n'indiquait pas de troubles majeurs liés à l'absence de Tau, l'analyse neurologique et comportementale menée 10 ans plus tard par Ikegami et collaborateurs a révélé de nombreux troubles associés à cette invalidation génique. Ces études confirment donc l'implication essentielle de la protéine Tau dans la polymérisation et la stabilisation des microtubules se traduisant par le bon fonctionnement neuronal (axogénèse et extension dendritique). Dans certaines conditions, cette fonction est partiellement substituée par la MAP1A qui ne comble pas totalement l'absence de la protéine Tau.

Sur la base de ce premier modèle de souris transgéniques a été développé en 1995 le premier modèle murin surexprimant l'isoforme la plus longue de la protéine Tau humaine, 2N4R (Götz et al., 1995). L'expression du transgène est sous le contrôle du promoteur Thy-1 mais le niveau d'expression ne représente que 10% de celui de la Tau murine endogène. Toutefois, en dépit de la faible expression, Götz et collaborateurs constatent une hyperphosphorylation de la protéine qui n'est pas associée à la formation de filaments et en concluent donc que ces souris transgéniques présentent un phénotype comparable aux stades précoces de la maladie d'Alzheimer. De manière à « booster » l'expression de la protéine Tau, cette lignée est reprise et modifiée : l'expression du transgène est alors contrôlée par un promoteur plus fort, Thy1.2 (Spittaels et al., 1999). Grâce à cela, l'expression de la Tau humaine est 4 fois supérieure à celle de la Tau endogène. Du point de vue phénotypique, ces souris présentent toutes les caractéristiques de la maladie d'Alzheimer notamment des dysfonctionnements moteurs forts. En revanche, l'analyse biochimique révèle la présence de protéine Tau phosphorylée ainsi qu'une

dégénérescence neuronale qui n'est pas associée à la formation de fibres. Ces deux études suggèrent donc que la surexpression de la protéine Tau 2N4R induit la mort neuronale mais n'est pas synonyme de formation de fibres. Un parallèle peut être établi avec certaines FTDP-17 caractérisées par un déséquilibre de la balance 4R/3R, physiologiquement égale à 1. En effet des mutations de l'exon 10 du gène MAPT entraînent une surproduction de l'isoforme 4R, un déséquilibre de la balance 4R/3R et une agrégation de la protéine. Pour mémoire, suite à ce premier modèle de surexpression, d'autres lignées transgéniques sont développées surexprimant cette fois l'isoforme 3R sous le contrôle du promoteur HKG-CoA reductase (Brion et al., 1999) ou PrP (Ishihara et al., 1999). En 2000, Duff et collaborateurs ont même généré une lignée de souris transgéniques exprimant les six isoformes de la protéine Tau humaine (Duff et al., 2000). Une nouvelle fois ces différents modèles de surexpression de protéine Tau humaine n'ont pas permis l'observation de PHFs en dépit d'un phénotype neuropathologique cohérent avec celui observé chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer. Ceci suggère donc l'importance de certains facteurs propres à l'organisme humain dans la formation des fibres... notamment le « code » de modification de la protéine.

La troisième famille de modèles murins regroupe toutes les souris transgéniques surexprimant des versions mutées de la protéine Tau identifiées au niveau du gène MAPT. Quelques unes sont regroupées dans le tableau 2 résumant les principales caractéristiques de chaque lignée. On constate que l'ensemble des modèles murins surexprimant des versions mutées de la protéine Tau présentent tous les caractéristiques des Tauopathies : dégénérescence neurofibrillaire et hyperphosphorylation de la protéine Tau. Il est important de souligner que la puissance du promoteur utilisé dictant directement le niveau d'expression de la protéine, un biais potentiel peut être introduit dans le développement et le degré de sévérité de la maladie. Pour finir, d'autres équipes ont généré de nouvelles lignées combinant plusieurs mutations telles que G272V et P301S (Schindowski et al., 2006) ce qui permet donc l'étude conjointe des conséquences de ces deux mutations.



<b>Mutation</b>	<b>Promoteur</b>	<b>Expression</b>	<b>Histologie</b>	<b>Comportement</b>
<b>R406W</b> (Tatebayashi et al., 2002)	CamKII	++	HP-Tau Filaments droits	Perte de mémoire Troubles moteurs
<b>V337M</b> (Tanemura et al., 2002)	PDGF	+++ (hippocampe)	HP-Tau PHFs	Perte de mémoire Troubles moteurs
<b>G272V</b> (Götz et al., 2001b)	PrP	+++	HP-Tau PHFs + Filaments droits	---
<b>P301S</b> (Allen et al., 2002)	Thy1.2	++	HP-Tau Filaments rubans	Beaucoup de troubles moteurs

**Tableau 2 :** Caractéristiques de quelques lignées de souris transgéniques (liste non-exhaustive) surexprimant des versions mutées de la protéine Tau identifiées dans les FTDP-17.

La dernière famille de modèles murins regroupe les différentes lignées transgéniques caractérisées par un déséquilibre de la balance kinases/phosphatases se traduisant donc par une hyperphosphorylation de la Tau endogène murine. On distingue donc deux stratégies possibles : une inhibition des protéines phosphatases ou une suractivation des kinases. Concernant la première, Arendt et collaborateurs ont montré que l'injection intracérébrale d'acide okadaïque entraîne une inhibition de PP-1 et PP-2A (Arendt et al., 1998). Cet inhibiteur est aussi utilisé *in vitro* lors de la phosphorylation de Tau par des extraits de cerveaux de rat ce qui permet l'obtention d'une protéine Tau hyperphosphorylée. La deuxième stratégie consiste en la suractivation de kinases notamment la GSK3 $\beta$ . Différentes lignées de souris transgéniques exprimant cette enzyme ou la version mutée (S9A) constitutivement active ont été générées. Dans tous les cas, une accumulation de protéine Tau hyperphosphorylée a été constatée n'entraînant pas forcément la formation de fibres (Engel et al., 2007). La kinase Cdk5 active en complexe avec p35, a aussi été étudiée : les souris transgéniques exprimant p25, la forme tronquée de p35,

présentent une hyperphosphorylation de Tau qui, une nouvelle fois, n'est pas forcément associée à une agrégation de la protéine (Bian et al., 2002).

En conclusion, les différents modèles murins permettent la caractérisation de la maladie d'Alzheimer ainsi que d'autres pathologies neurodégénératives du point de vue neuroanatomique mais ne donnent que peu d'informations quant aux mécanismes et aux modifications entraînant la pathologie Tau. Toutes ces stratégies de surexpression de la protéine sauvage ou mutée ainsi que la modulation des activités kinases et phosphatases sont bien évidemment transposables au modèle cellulaire ce qui permet l'obtention d'informations plus précises sur le mécanisme ainsi que les différents acteurs enzymatiques et donc les modifications impliquées dans le processus neurodégénératif. On comprend aisément que le modèle cellulaire simplifie l'équation puisqu'on s'affranchit de la complexité liée au fonctionnement de l'organisme. Néanmoins, l'environnement cellulaire reste tout de même complexe notamment dans l'étude des modifications post-traductionnelles puisque de nombreuses enzymes sont présentes, actives ou inactives en fonction des conditions. Ainsi, même si l'expérimentation cellulaire apporte sa pierre à l'édifice dans la compréhension des mécanismes de modifications de la protéine Tau conduisant à l'agrégation, bon nombre de paramètres ne peuvent être contrôlés. C'est pourquoi, de manière à étudier spécifiquement le rôle d'une modification post-traductionnelle dans le processus d'agrégation de la protéine Tau, un modèle d'agrégation *in vitro* a été développé.

## **ii. Le modèle d'agrégation *in vitro***

L'avantage d'un tel modèle réside dans le fait que chaque paramètre de l'expérimentation puisse être contrôlé : concentration protéique, température, durée, salinité, pH... ; le risque étant de s'éloigner des conditions physiologiques. Ainsi de nombreuses équipes ont participé au développement d'un test d'agrégation de la protéine Tau *in vitro* afin de sélectionner des composés thérapeutiques inhibant cette formation de fibres. Ces études ayant été précédemment décrites dans le manuscrit, l'aspect technologique et expérimental du test sera abordé dans cette partie.

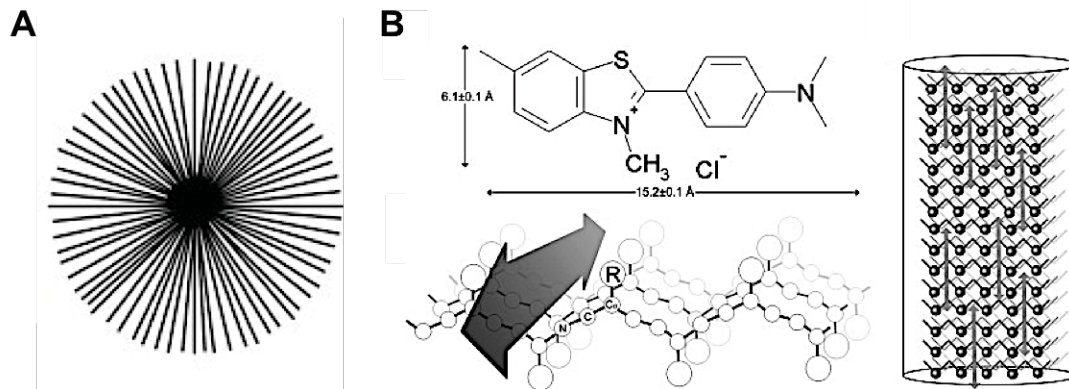
De manière générale, celui-ci consiste au déclenchement de l'agrégation de la protéine par ajout de facteurs polyanioniques tels que l'héparine (Goedert et al.,

1996), les acides nucléiques et acides gras ou encore les chaînes polyglutamates (Friedhoff et al., 1998a; Kampers et al., 1996; Mukrasch et al., 2005; Pérez et al., 1996; Sibille et al., 2006). Différentes techniques ont été adaptées au suivi de l'agrégation et à la détection des fibres formées : la fluorescence, le dichroïsme circulaire (CD), la spectroscopie Raman, la diffusion de la lumière et même la résonance magnétique nucléaire.

La méthode de suivi la plus couramment utilisée est la fluorescence. En 1998, Friedhoff et collaborateurs proposent l'utilisation de fluorophores tels que la thioflavine S (ThS) ou T (ThT) pour suivre la formation des PHFs (Friedhoff et al., 1998a). L'avantage de ceux-ci réside dans le fait qu'en solution ces molécules n'émettent pas de fluorescence. En revanche, lors du processus de fibrillation, le fluorophore est incorporé dans les fibres et émet un signal de fluorescence (à 340nm pour la ThT) proportionnel à la quantité de PHFs formés. L'étude cristallographique menée par Landau et collaborateurs a permis d'identifier le mécanisme d'interaction entre fluorophore et fibres (Landau et al., 2011). Par co-crystallisation du peptide PHF6 de Tau, connu pour sa capacité à former des feuillets  $\beta$  en solution (von Bergen et al., 2000), avec une molécule analogue de la thioflavine, l'orange G, les auteurs ont mis en évidence l'interaction de cette molécule avec les résidus lysines de deux peptides PHF6 face à face formant un feuillet  $\beta$  parallèle ce qui suggère un mécanisme d'interaction relativement spécifique. En revanche, d'autres fluorophores ont été testés, nettement moins spécifiques : les auteurs proposent un mécanisme selon lequel ces fluorophores apolaires « glisseraient » le long des fibres, interagissant avec les portions apolaires par des interactions hydrophobes. De ce fait, plusieurs fluorophores peuvent détecter la présence de structures amyloïdes. Ce caractère non-spécifique de l'interaction avait été abordé quelques années auparavant par Krebs et collaborateurs qui ont étudié le mécanisme d'interaction de la ThT avec des sphérulites formées à partir d'albumine sérique et de  $\beta$ -lactoglobuline bovines (Krebs et al., 2005).

En solution, ces deux protéines forment des structures sphériques contenant un noyau non structuré duquel partent de nombreuses fibres amyloïdes appelées « sphérulites » (**figure 42-A**). La ThT est incorporée de façon parallèle à l'axe de ces fibres amyloïdes contenant des feuillets  $\beta$ , ceci par simple interaction hydrophobe

**(figure 42-B).** Ces études soulèvent donc le problème de la spécificité du signal de fluorescence obtenu lors des expériences d'agrégation par utilisation de la ThT.



**Figure 42 :** Modèle d'incorporation de la Thioflavine T dans les sphérullites formées à partir d'albumine sérique et de  $\beta$ -lactoglobuline bovines (Krebs et al., 2005). **A-**Représentation schématique d'une sphérullite. Au centre en noir est représenté le noyau non structuré duquel partent de manière radiale, de nombreuses fibres amyloïdes composées de feuillets  $\beta$ . **B-**Structure de la Thioflavine T (ThT) et interaction avec les feuillets  $\beta$ . Les flèches grises sur les deux vues représentent la zone d'interaction entre ThT et feuillet.

Ainsi afin de lever toutes ambiguïtés concernant la nature du signal de fluorescence de la ThT obtenu dans les expériences d'agrégation de Tau, il me semble indispensable de réaliser des observations en microscopie électronique en transmission afin de confirmer ou non, la présence de fibres.

En conclusion même si ce modèle d'agrégation *in vitro* de la protéine Tau est utilisé depuis de nombreuses années notamment dans le screening de molécules à visée thérapeutique, il n'en est pas moins critiquable sur certains points. Tout d'abord, l'utilisation de molécules initiatrices de l'agrégation introduit un biais dans l'analyse, notamment lors des expériences d'inhibition de l'agrégation. D'autre part, la relative spécificité de la ThT dans la détection des structures amyloïdes implique l'utilisation de la microscopie électronique afin de confirmer le signal obtenu. Enfin, ce modèle d'agrégation ne tient pas compte du fait que les modifications post-traductionnelles de la protéine Tau jouent un rôle essentiel dans l'agrégation : dans ce modèle, que la protéine soit modifiée ou non, elle agrège.

Il est donc nécessaire pour la compréhension du processus liant les modifications post-traductionnelles et l'agrégation de développer un modèle

s'affranchissant des polyanions déclencheurs de l'agrégation. De plus, celui-ci, en plus d'apporter des informations mécanistiques, permettrait de tester et re-tester des molécules potentiellement inhibitrices de l'agrégation sans doute sur la spécificité d'inhibition : une potentielle interaction entre les polyanions et la molécule testée est tout à fait possible dans le modèle classique. Par modification *in vitro* de la protéine, ce nouveau modèle permettrait d'établir le profil de modifications post-traductionnelles « idéal » pour l'agrégation. En revanche ceci nécessite une caractérisation des modifications post-traductionnelles introduites *in vitro*.

## B. Etude des modifications post-traductionnelles de Tau

Pouvoir déterminer avec certitude les sites porteurs de modifications post-traductionnelles constitue un enjeu majeur dans l'étude de leur implication dans le processus agrégatif de la protéine Tau. Dans cette partie vont être présentées différentes techniques de détection et de quantification des modifications post-traductionnelles. On peut distinguer 3 grandes approches que sont les techniques biochimiques classiques, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire. Chacune de ces trois approches présente des avantages et inconvénients qui sont regroupées dans le tableau 3.

Technique	Avantages	Inconvénients
<b>Western-Blot, Immunohistochimie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité</li> <li>- Rapide</li> <li>- Peu couteux</li> <li>- Large panel de methodes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faux positifs</li> <li>- Informations globales</li> <li>- Spécificité des anticorps</li> </ul>
<b>Spectrométrie de masse</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Très sensible (nM-pM)</li> <li>- Information à l'échelle du résidu, site par site</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Technique destructive</li> <li>- Quantification difficile</li> <li>- Coût modéré</li> <li>- Problème des multiples modifications</li> </ul>
<b>Résonance magnétique nucléaire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Technique non destructive</li> <li>- Information à l'échelle atomique</li> <li>- Quantification possible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité moyenne</li> <li>- Coût élevé</li> <li>- Marquage isotopique</li> <li>- Limite de taille (80 kDa)</li> </ul>

**Tableau 3** : présentation des avantages et inconvénients des trois grandes approches permettant l'étude des modifications post-traductionnelles.

## **i. Les techniques biochimiques**

De façon générale, quelle que soit la technique biochimique considérée, une analyse préalable de l'échantillon par électrophorèse mono- ou bi-dimensionnelle est nécessaire. Dans le cas présent, on peut imaginer l'étude des modifications post-traductionnelles de la protéine Tau d'un lysat de cerveau (rat ou humain) : avant toute analyse, l'extrait est déposé et séparé par électrophorèse afin de repérer la protéine d'intérêt qui sera ensuite révélée et étudiée par différents moyens. Les trois techniques (liste non exhaustive) qui vont suivre permettent la révélation et la mise en avant des modifications portées par la protéine Tau. Parfois une digestion de la protéine par des protéases (trypsine, chémotrypsine...) sera nécessaire afin de localiser spécifiquement le site de modification.

### **a. L'autoradiographie et la fluorescence**

Bien que très réglementés, les isotopes radioactifs sont couramment utilisés en biochimie pour suivre des réactions et marquer des molécules. L'autoradiographie est une méthode de détection qualitative de composés radioactifs fixés sur un substrat (protéine, glucide etc...). Considérons l'exemple d'une protéine séparée par électrophorèse. Suite à cette première étape, le gel est mis au contact d'un film radiographique. Les radiations émises par l'échantillon protéique impressionnent le film qui est ensuite révélé.

Cette technique peut être illustré par l'exemple de la phosphorylation *in vitro* de la protéine Tau par une kinase recombinante telle que ERK2 (Qi et al., 2016). L'échantillon protéique à phosphoryler est alors mis en présence de  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP. Lors de l'étape de phosphorylation, le  $^{32}\text{P}$ , émetteur de radioactivité  $\beta^-$ , est alors transféré sur la protéine. Ainsi lors de la révélation par mise en contact avec le film radiographique, la protéine phosphorylée est détectée. De la même manière, d'autres modifications post-traductionnelles peuvent être étudiées telles que l'acétylation ou la glycosylation par utilisation d'autres radio-isotopes :  $^{14}\text{C}$  et  $^3\text{H}$  (tritium).

La fluorescence se pose en tant que technique alternative à la radioactivité. En effet, elle ne nécessite pas d'autorisations spécifiques ni de conditions particulières lors de l'expérimentation. Bien que peu utilisée dans la détection directe

des modifications post-traductionnelles, c'est une technique de premier choix dans le marquage cellulaire couplée ou non à des anticorps. Pour exemple, on peut citer la sonde Pro-Q Diamond utilisée pour le marquage spécifique des phospho-protéines sur gel d'acrylamide.

## **b. L'immunodétection**

Du fait de la spécificité des anticorps, l'immunodétection est très utilisée pour l'identification d'épitopes spécifiques tels que les modifications post-traductionnelles d'une protéine. Cette technique peut-être appliquée dans le cas d'échantillons préalablement séparés sur gel puis transférés sur membrane, le Western-Blot, mais aussi dans un contexte cellulaire vivant ou dans le cadre de marquages histologiques.

Brièvement, le Western-blot se résume au transfert sur membrane (nitrocellulose, PVDF) des protéines préalablement séparées sur gel d'électrophorèse. Cette membrane est ensuite mise en contact avec un anticorps primaire (mono- ou polyclonal) ciblant spécifiquement un épitope modifié. Ce premier anticorps peut être porteur d'un système de révélation mais dans la majeure partie des cas, un anticorps secondaire est utilisé. Celui-ci peut être couplé à différents systèmes de révélation : fluorescence, enzyme (peroxydase).

Dans le cas du marquage de coupes histologiques, l'anticorps secondaire peut être porteur d'une sonde fluorescente ou d'une particule dense aux électrons (ou colloïdal). Le premier type de marquage permet les observations en microscopie confocale alors que le second est réservé à la microscopie électronique en transmission.

Les différentes modifications post-traductionnelles de la protéine Tau pathologiques isolée de PHFs ont été identifiées, entre autre, par le biais de l'immunodétection. Il existe un grand nombre d'anticorps anti-Tau qui ciblent spécifiquement des séquences protéiques porteuses de modifications post-traductionnelles. Le tableau 4 présente quelques exemples d'études dans lesquelles les auteurs ont eu recours à l'immunodétection pour la caractérisation du profil de modification de la protéine Tau.

<b>Modification</b>	<b>Anticorps</b>	<b>Epitope reconnu</b>	<b>Référence</b>
<b>Phosphorylation</b>	AT8	pS202/pT205	(Biernat et al., 1992)
	PHF-1	pS396/pS404	(Greenberg et al., 1992)
<b>O-GlcNAcylation</b>	RL2	O-GlcNAcylation globales de la protéine	(Liu et al., 2004)
	CTD110.6		
	S400-O-GlcNAc	Tau-O-GlcNAc/S400	(Yuzwa et al., 2011)
<b>Acétylation</b>	Anti-AcK280	K280-Acétylée	(Cohen et al., 2011)
<b>Méthylation</b>	BL10744	Lysine mono-méthylée	(Guo et al., 2014)
<b>SUMOylation</b>	Anti-SUMO-1	SUMOylation globale	(Takahashi et al., 2008)

**Tableau 4 :** Exemples d'anticorps utilisés dans la détection des modifications post-traductionnelles.

Bien qu'un large panel d'anticorps soit disponible, il me semble risqué d'étudier les modifications de la protéine Tau uniquement par immunodétection. En effet, même si pour la phosphorylation de nombreux anticorps spécifiques ont été développés, le risque de faux positifs reste présent. De plus prenons le cas des anticorps RL2 et CTD110.6 : ceux-ci reconnaissent les O-GlcNAc portés par la protéine lorsqu'elle est modifiée mais ne donne aucune indication sur le site visé. Mais ces anticorps reconnaissent aussi les motifs N-Glycosylés ce qui soulève donc les limites de ces techniques basées sur l'utilisation de ceux-ci :

- L'information apportée reste limitée : on prouve la présence d'une modification mais la localisation à l'échelle du résidu et la quantification restent compliquées (même par l'utilisation de la fluorescence).
- La production d'anticorps hautement spécifiques, permettant avec certitude d'identifier le résidu et la modification, suppose la connaissance préalable de la séquence porteuse de la modification afin de générer un peptide homologue. Celui-ci servira à la production d'anticorps anti-peptide en modèle animal.

Ainsi même si ces méthodes de « biochimie classique » sont utiles et informatives, l'analyse exhaustive du profil de modification de la protéine Tau



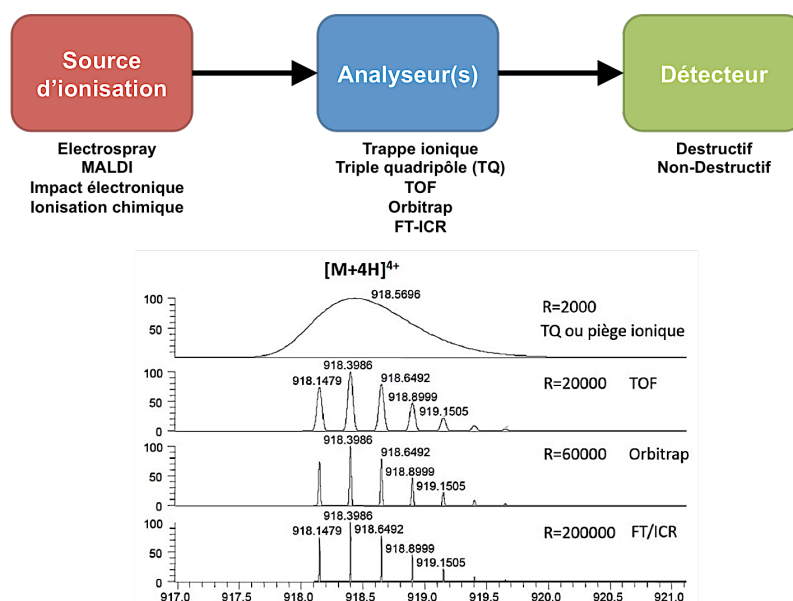
nécessite l'utilisation de techniques plus résolutive telles que la spectrométrie de masse ou la résonance magnétique nucléaire (RMN). Bien évidemment, il faut noter que les diverses expériences mises en œuvre seront fonction du type de matériel disponible. Par exemple, dans le cas de l'analyse de la protéine Tau extraite de cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, la plupart des expériences RMN appliquées aux protéines ne seront pas envisageables (enrichissement nécessaire de l'échantillon) : dans ce cas, les anticorps ou la spectrométrie de masse seront les techniques de choix pour mener cette analyse.

## ii. La spectrométrie de masse (MS)

### a. Généralités

La spectrométrie de masse est une technique permettant l'analyse et l'identification des molécules en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Grâce à sa sensibilité (de l'ordre du nM au pM), sa vitesse d'analyse et la possibilité de couplage avec différentes méthodes chromatographiques (liquide ou gazeuse), la spectrométrie de masse reste probablement la technique de premier choix dans les diverses approches protéomiques en dépit du caractère destructif de l'analyse. On distingue deux types d'approches protéomiques, « *Bottom up* » ou « *Top down* ». La première consiste en une hydrolyse préalable de la protéine et en l'analyse des fragments dans le spectromètre. La seconde repose sur l'introduction dans le spectromètre de la protéine native qui pourra ensuite être fragmentée à l'intérieur de la machine. Technique en constante évolution depuis le début des années 1930, elle permet à l'heure actuelle d'étudier des macromolécules de plus de 100 kDa avec une résolution inférieure au dalton.

Le principe de la spectrométrie de masse repose sur la séparation et la détection d'ions provenant de la molécule à analyser. Ainsi quelle que soit l'approche protéomique considérée, les ions générés au niveau de la source d'ionisation seront séparés dans l'analyseur en fonction de leur rapport  $m/z$ ,  $m$  correspondant à la masse de l'ion et  $z$  à sa charge (**figure 43**). On note que la résolution de l'analyse, c'est à dire la capacité qu'a l'analyseur à séparer deux ions de rapport  $m/z$  proches, se résume quasi-exclusivement au type d'analyseur utilisé. Pour information, à ce jour, l'analyseur le plus efficace mais aussi le plus cher est le FT-ICR (**figure 43**).



**Figure 43 :** Représentation schématique des trois parties d'un spectromètre de masse et exemples des différentes sources et analyseurs disponibles. La résolution de l'analyse est définie par le choix de l'analyseur ce qui est illustré par les différents spectres de masses obtenus pour un même ion 4 fois chargé dans différents analyseurs. On constate que l'analyseur le plus efficace mais aussi le plus cher est le FT-ICR.

Le MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight*) est probablement l'appareillage le plus utilisé en laboratoire. En effet, même si l'analyseur TOF n'est pas le plus résolutif, le système reste probablement le meilleur rapport qualité-prix pour une utilisation en routine.

### b. Application à la détection des MPTs

Par les diverses combinaisons possibles entre sources d'ionisation et analyseurs ainsi que par sa sensibilité, la spectrométrie de masse est devenue un outil de choix dans la caractérisation des modifications post-traductionnelles. En effet, quelle que soit la modification considérée, le changement de masse induit par celle-ci sera détectable. Les principaux changements de masse sont résumés dans le tableau 5.

<b>Modification post-traductionnelle</b>	<b>Différence de masse observable</b>
<b>Phosphorylation</b>	+ 80 Da
<b>Acétylation</b>	+ 42 Da
<b>O-GlcNAcylation</b>	+ 203 Da
<b>Méthylation (mono-, di-, tri-)</b>	+ 14 Da, + 28 Da, + 42 Da

**Tableau 5** : Différences de masse pour quelques modifications post-traductionnelles de la protéine Tau.

On note tout de même quelques difficultés qui peuvent être rencontrées lors de l'analyse des modifications post-traductionnelles d'une protéine par spectrométrie de masse :

- Certaines modifications rares nécessitent un enrichissement de la fraction modifiée : c'est notamment le cas pour l'étude de l'O-GlcNAcylation de la protéine Tau (Morris et al., 2015).
- Dans certains cas, notamment l'O-GlcNAcylation et la phosphorylation, le caractère labile de la liaison entre le résidu modifié et la modification pose problème lors de l'étape d'ionisation. Une ionisation ou une fragmentation (MS/MS) trop forte entraînera une rupture de cette liaison et une non-détection de la modification initialement présente.
- L'obtention d'informations structurales reste compliquée. Ainsi l'identification de structures locales induites par des modifications semble compliquée même s'il existe quelques méthodes basées sur l'échange avec des solvants deutérés. Brièvement, en absence de structuration, toutes les fonctions chimiques échangeables sont accessibles. En revanche, si la protéine se structure, certaines de ces fonctions deviennent inaccessibles au solvant. Ainsi l'utilisation de solvants deutérés permet de marquer spécifiquement les fonctions chimiques toujours accessibles et donc non-impliquées dans la structuration ce qui se traduira sur le spectre par un incrément de masse. Par exemple, la fonction amide -NH d'un résidu non impliqué dans l'établissement

d'une structure s'échangera avec le solvant et sera donc deutérée –ND se traduisant par un incrément de masse +1.

- Pour finir, la quantification en spectrométrie de masse reste à l'heure actuelle compliquée. Elle nécessite l'utilisation de standards externes enrichis en isotopes lourds afin de comparer, dans les mêmes conditions, les intensités relatives des pics.

En conclusion, la spectrométrie de masse apporte de nombreuses informations notamment en terme d'identification des modifications post-traductionnelles à l'échelle du résidu. En revanche, concernant la quantification et l'obtention d'informations structurales, cette technique révèle ses limites. C'est pour cela que la résonance magnétique nucléaire vient compléter et enrichir l'ensemble des informations obtenues par la voie biochimique et par la spectrométrie de masse.

### iii. La résonance magnétique nucléaire (RMN)

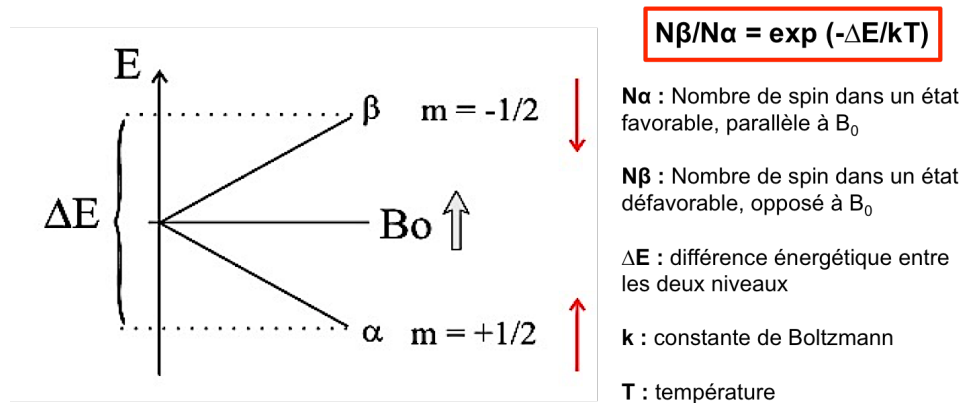
#### a. Le phénomène de résonance et les noyaux observables

La RMN repose sur la propriété qu'ont certains noyaux d'absorber une quantité d'énergie lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique et sous l'action d'une radiofréquence : c'est ce qu'on appelle la résonance. Tous les noyaux n'ont pas la capacité d'entrer en résonance. Ceci s'explique par la notion de *spin* noté  $I$ . Seuls les noyaux possédant un spin  $I \neq 0$  ont la capacité d'entrer en résonance. On distingue donc deux catégories (entre parenthèses est indiquée l'abondance naturelle du noyau considéré) :

- Les noyaux de spin  $I = 1/2$ . On peut citer par exemple le proton  $^1\text{H}$  (100%), le carbone  $^{13}\text{C}$  (1%), l'azote  $^{15}\text{N}$  (0,4%), le phosphore  $^{31}\text{P}$  (100%) ou encore le fluor  $^{19}\text{F}$  (100%). Seuls ce type de noyau sera abordé ici.
- Les noyaux possédant un spin  $I > 1/2$  (noyaux quadripolaires) tels que l'oxygène  $^{17}\text{O}$  (0,04%, spin 5/2), chlore  $^{35}\text{Cl}$  (76%, spin 3/2),  $^{14}\text{N}$  (99,4%, spin 1).

Soumis à un champ magnétique  $B_0$ , un noyau possédant un spin non nul pourra prendre  $2I+1$  orientations dans ce champ correspondant à un niveau

énergétique. On parle alors d'états énergétiques favorable noté  $\alpha$  (même sens que  $B_0$ ) ou défavorable noté  $\beta$  (sens opposé à  $B_0$ ). Par exemple, le proton  $^1\text{H}$  de spin  $I = \frac{1}{2}$  prendra deux orientations  $m = +\frac{1}{2}$  ou  $m = -\frac{1}{2}$  : il existe donc 2 niveaux énergétiques. L'équation de Boltzman quantifie le rapport des noyaux dans les deux états énergétiques (**figure 44**).



**Figure 44** : Equation et représentation schématique de la distribution de Boltzmann permettant de calculer le rapport entre le nombre de spins favorables et défavorables

Les transitions de l'état favorable vers l'état défavorable constituent le phénomène de résonance magnétique nucléaire. Ainsi, pour observer un signal RMN à proprement parler, il faut rompre l'équilibre entre les deux niveaux énergétique afin de peupler d'avantage le niveau défavorable de haute énergie : il faut donc apporter de l'énergie. Ceci est permis par l'application d'un deuxième champ magnétique  $B_1$  perpendiculaire à  $B_0$  et de radiofréquence (RF) adaptée au noyau observé. Pour que le noyau entre en résonance, il faut que RF soit égale à la fréquence de Larmor du noyau considéré d'où :  $\nu_1 = \nu_0 = \gamma B_0/2\pi$ .

Ainsi seuls les noyaux pouvant entrer en résonance donc possédant un spin  $I$  non nul seront observables. Or les protéines sont principalement constituées de  $^{14}\text{N}$  et  $^{12}\text{C}$  qui possèdent un spin  $I=0$  ce qui nécessite un enrichissement préalable avant toutes études structurales d'une protéine par RMN. De ce fait, l'ensemble des protéines Tau sauvages et mutantes produites par la voie recombinante au cours de ma thèse ont nécessité l'utilisation de milieux de culture enrichis en isotopes  $^{15}\text{N}$  et/ou  $^{13}\text{C}$  de manière à générer des protéines observables en RMN. On note tout de

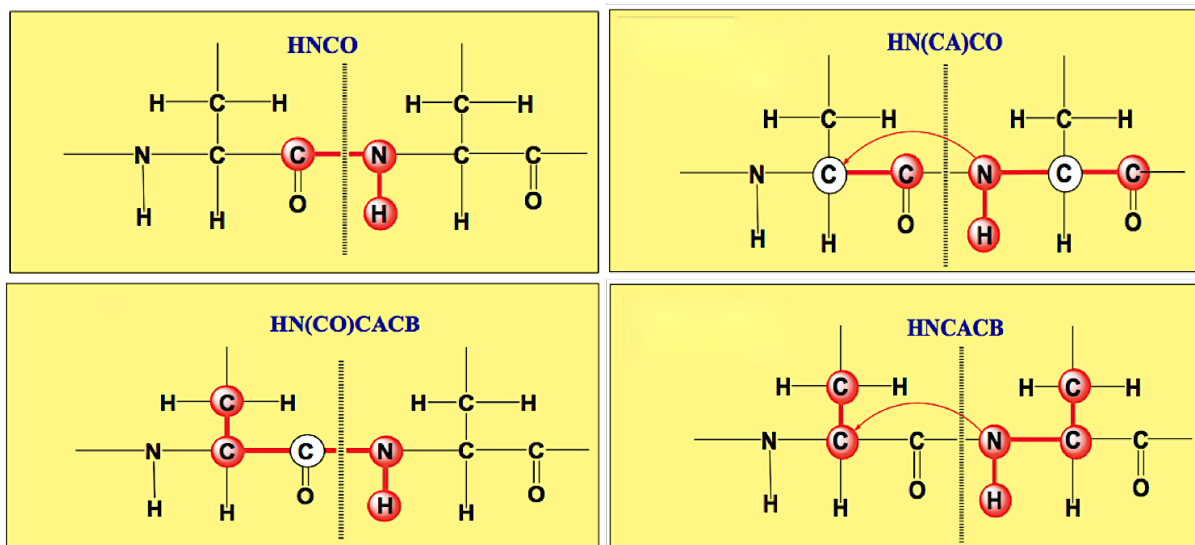
même que le proton  $^1\text{H}$  est le noyau le plus abondant et le plus sensible à l'état naturel qui présente des propriétés magnétiques permettant son observation en RMN sans étape d'enrichissement préalable.

Pour finir, la spectroscopie RMN est une technique particulièrement sensible à l'environnement chimique des noyaux. De ce fait, le déplacement chimique, noté  $\delta$  et exprimé en partie par million (ppm) d'un noyau donné, dépendra de plusieurs paramètres, notamment de la densité électronique (qui engendre un champ magnétique local) ainsi que des propriétés chimiques des noyaux voisins. Cette propriété de la RMN sera particulièrement utilisée dans l'étude des modifications post-traductionnelles.

### **b. Application à la détection des MPTs**

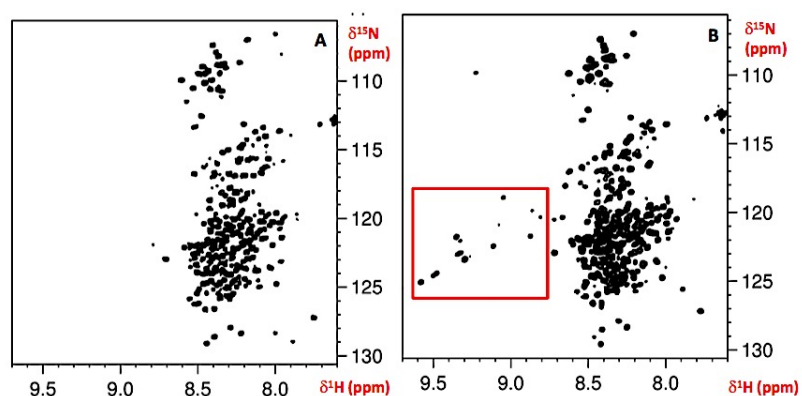
Pour l'étude des modifications post-traductionnelles, l'expérience RMN de base s'appelle HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*). Ce spectre à deux dimensions permet d'obtenir une cartographie de la protéine sur laquelle une résonance correspond à un proton amide relié directement à un azote  $^{15}\text{N}$ . Ainsi on peut dire qu'à chaque pic correspond un acide aminé sauf pour la proline qui ne possède pas de proton amide. Chaque fonction a un déplacement chimique précis dans des conditions de pH, salinité et température définies. Ce déplacement chimique est, comme nous l'avons vu, directement lié à l'environnement électronique de l'acide aminé. Ainsi, dans le cas de la protéine Tau, un spectre de référence sans modifications sera la base de toutes études.

Quelle que soit la modification post-traductionnelle considérée, celle-ci entrainera une perturbation de l'environnement électronique du résidu-cible et donc une modification (*shift*) du déplacement chimique observable sur l'HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . On note que des expériences complémentaires à trois dimensions ( $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ ) seront nécessaires pour identifier précisément le type de modifications et le résidu concerné. Pour mémoire, nous pouvons citer les expériences les plus utilisées : HNCACB, HN(CO)CACB, HNCO, HN(CA)CO (**figure 45**).



**Figure 45** : Représentation schématique des corrélations obtenues sur les spectres à trois dimensions. En blanc les noyaux de sélection de cohérence (conditionnement du transfert de l'aimantation), en rouge les noyaux observés.

Considérons la phosphorylation : elle peut être facilement contrôlée par RMN par l'acquisition d'un spectre HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (**figure 46**). En effet, l'ajout d'un phosphate va modifier la densité électronique locale : concrètement, le déplacement chimique de la fonction amide du résidu modifié est perturbé ainsi que celle des résidus au voisinage du résidu phosphorylé. Ceci se traduit par un *shift* de résonance observable par superposition des spectres de la protéine native et phosphorylée.



**Figure 46** : Spectres HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de la protéine Tau native (gauche) et phosphorylée par ERK2 (droite). On constate le *shift* de déplacement chimique des résidus phosphorylés.

Malgré la faible sensibilité et donc la nécessité d'échantillons concentrés, la quantification des modifications post-traductionnelles est possible. En effet, dans des conditions données, l'intégration du pic du résidu modifié comparée à l'intensité du même résidu non-modifié permet de déterminer le pourcentage de modification. Dans le cas d'une modification à 100%, le signal correspondant au résidu non modifié est absent du spectre. Cependant, il y aura toujours une incertitude sur cette disparition dans le spectre : le résidu est-il véritablement modifié à 100% ou y'a t-il recouvrement des signaux ?

## V. Objectifs et stratégie expérimentale

Comme nous avons pu le voir au cours de cette introduction la protéine Tau, acteur clé de l'homéostasie neuronale, est impliquée dans diverses pathologies neurodégénératives en cas de dysfonctionnement de celle-ci. A ce jour, deux grandes hypothèses s'opposent concernant le rôle des modifications post-traductionnelles dans l'agrégation pathologique de la protéine Tau : certains scientifiques s'accordent à dire que ces deux processus sont indépendants (Lai et al., 2016; Wischik et al., 1988), alors que d'autres suggèrent une interconnexion et soulignent le caractère indissociable de l'étude des modifications post-traductionnelles dans la compréhension du mécanisme de formation des PHFs, toujours inconnu à l'heure actuelle (Brion et al., 1985; Grundke-Iqbal et al., 1986). Nous avons pris le parti de suivre cette deuxième hypothèse et avons donc fixé les objectifs de ma thèse sur la base d'un lien entre dérégulation du processus de modification de la protéine Tau et agrégation de celle-ci.

Dans ce contexte, au cours de mes travaux de thèse, nous nous sommes concentrés sur l'étude *in vitro* de trois modifications post-traductionnelles de la protéine Tau et des conséquences de celles-ci sur le processus agrégatif : la phosphorylation, l'acétylation et l'O-GlcNAcylation. En effet, en dépit de nombreuses études révélant une corrélation positive entre phosphorylation et agrégation de Tau dans la maladie d'Alzheimer (Augustinack et al., 2002), le rôle joué par cette modification à l'échelle moléculaire reste à ce jour relativement obscur. C'est pourquoi la majeure partie de ma thèse s'est centrée sur l'étude du lien entre



phosphorylation et agrégation de la protéine Tau, le but étant d'étudier et d'établir un lien clair entre cette modification majoritaire de la protéine et le processus d'agrégation pathologique aboutissant à la formation des PHFs. Suite à cela, l'étude de l'acétylation et de l'O-GlcNAcylation de la protéine Tau ayant débutée avant mes travaux de thèse et les stratégies expérimentales étant mises en place, nous avons décidé d'introduire un degré de complexité supplémentaire et d'aborder la notion de dialogue entre modifications post-traductionnelles récemment décrites. Ainsi la deuxième partie de ma thèse a permis d'appréhender le dialogue entre phosphorylation/acétylation et phosphorylation/O-GlcNAcylation ainsi que les conséquences de cette double modification sur l'agrégation *in vitro* de la protéine Tau. Pour finir durant la troisième partie de ma thèse, grâce aux résultats obtenus par l'étude du profil de phosphorylation conduisant à l'agrégation de la protéine Tau et par le biais d'une collaboration démarrée avant le début de ma thèse avec l'équipe du Pr. Gal Bitan (UCLA, Los Angeles), j'ai eu l'occasion de tester le rôle du *lysine tweezer* (CLR01) dans l'inhibition de l'agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée.

Concernant la stratégie expérimentale, l'intégralité des expériences mises en œuvre ont été réalisées *in vitro*. Les protéines Tau sauvage ou mutantes ont été produites par voie recombinante. Les modifications post-traductionnelles ont été introduites par l'utilisation d'enzymes recombinantes, elles aussi produites au laboratoire telles que MEK/ERK2 (phosphorylation), CBP (acétylation), OGT (O-GlcNAcylation) ou par l'utilisation d'un extrait de cerveau de rat (phosphorylation). On note que l'approche par ligation chimique native a été utilisée dans le cas de l'O-GlcNAcylation de la protéine Tau. Quelle que soit la modification considérée, la RMN nous a permis de caractériser les échantillons et de quantifier le niveau de modification à l'échelle du résidu. Pour finir des expériences d'agrégation *in vitro* suivie par fluorescence de la thioflavine T et confirmées par observations en microscopie électronique en transmission ont permis d'établir le rôle joué par les diverses combinaisons de modifications dans le processus d'agrégation de la protéine Tau.



# Résultats



# **Partie 1 : Hyperphosphorylation et aggrégation de Tau**

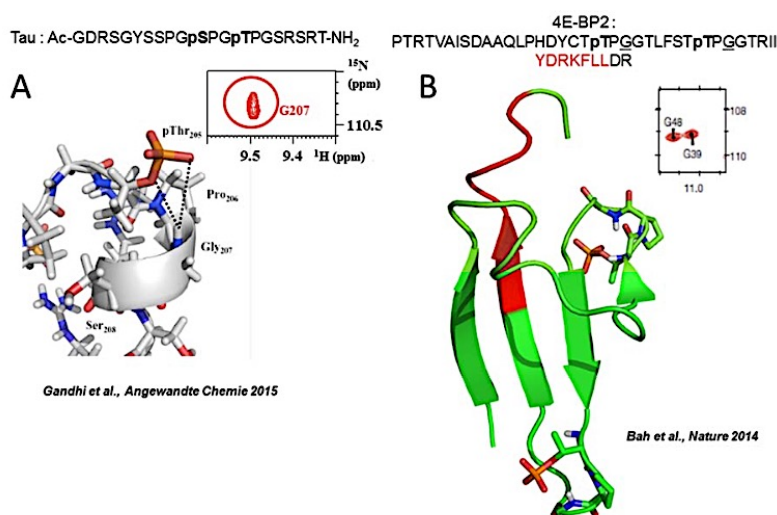


Le cerveau des patients atteints par la maladie d'Alzheimer est caractérisé au niveau moléculaire par la présence de deux lésions principales : les plaques amyloïdes extraneuronales et les PHFs intraneuronales. Alors que les premières résultent de l'accumulation de peptides A $\beta$ , Brion et collaborateurs démontrent que les PHFs sont principalement composés de protéine Tau (Brion et al., 1985). Dans le même temps, Grundke-Iqbal et collaborateurs mettent en évidence une phosphorylation anormalement élevée de la protéine Tau retrouvée dans ces structures fibrillaires et définissent pour la première fois la notion d'hyperphosphorylation pathologique (Grundke-Iqbal et al., 1986).

Du point de vue clinique, la détection *post-mortem* de la maladie d'Alzheimer reposait initialement sur la coloration argentique des structures amyloïdes retrouvées au niveau cérébral. Bien que traditionnellement utilisée, cette méthode n'était néanmoins pas spécifique de la protéine Tau hyperphosphorylée identifiée comme protéine-clef dans la maladie d'Alzheimer. De ce fait, une nouvelle méthode de détection fut proposée par Braak et collaborateurs : l'immuno-marquage *post-mortem* d'espèces Tau pathologiquement phosphorylées par l'utilisation d'anticorps spécifiques, notamment l'anticorps AT8 (Braak et al., 2006). Depuis de longues années, l'épitope de ce dernier est interprété comme la double phosphorylation de la Ser202/Thr205. Mais récemment, la structure cristalline de la partie variable de l'anticorps (Fab) avec différents peptides AT8 phosphorylés sur différentes positions a montré qu'un troisième site de phosphorylation sur la Ser208 augmentait d'un facteur 30 l'affinité de l'anticorps pour l'AT8 (Malia et al., 2016). De plus, ce site avait été identifié par Hanger et collaborateurs lors de l'analyse par spectrométrie de masse du profil de phosphorylation de la protéine Tau extraite de PHFs isolés de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer (Hanger et al., 2007). Sur la base de ces récentes découvertes, nous nous sommes donc interrogés sur les conséquences structurales et fonctionnelles de cette troisième phosphorylation.

Concernant l'aspect structural, l'étude conjointe par RMN et dynamique moléculaire d'un peptide de Tau [192-212] di-phosphorylé pSer202/pThr205 a démontré la présence d'un tournant centré sur la Gly207 (Gandhi et al., 2015). D'autres tournants induits par phosphorylation ont été décrits, notamment dans le cas de la protéine intrinsèquement désordonnée 4E-BP2 dans sa liaison au facteur de transcription eIF4-E (Bah et al., 2015). Dans les deux études, les auteurs

prouvent par RMN la présence/absence du tournant par l'observation du déplacement chimique anormal de la glycine au centre du motif local : 9,5 ppm pour le peptide de Tau di-phosphorylé et 11 ppm pour le facteur de transcription (**figure 47**). Dans ce dernier cas, la phosphorylation induit un repliement en feuillet- $\beta$  de la protéine 4E-BP2 ce qui entraîne la formation d'un tournant très stable, et se traduit donc par une plus grande perturbation du déplacement chimique de la glycine (**figure 47**). Sur la base de ces deux études nous pouvons nous interroger sur le rôle joué par la phosphorylation de la Ser208 dans l'établissement ou la destruction du motif induit par la double phosphorylation de l'épitope AT8 (pSer202/pThr205) de la protéine Tau.



**Figure 47** : **A**-Tournant induit par la double phosphorylation pSer202/pThr205 du peptide de Tau [192-212] induisant une variation du déplacement chimique du proton amide de la Gly207 à 9,5 ppm (Gandhi et al., 2015). **B**-Tournant induit par la double phosphorylation Thr37/Thr46 de 4E-BP2 induisant la formation stable de feuillet- $\beta$ . Cette stabilité se traduit par une variation de déplacement chimique plus important à 11 ppm des protons amides des résidus glycines impliqués dans le tournant, Gly39 et Gly48 (Bah et al., 2015).

Du point de vue de l'agrégation de la protéine Tau, à l'heure actuelle même si l'étude de Grundke-Iqbal prouvant le lien entre phosphorylation et agrégation a été citée de nombreuses fois (Alonso et al., 2001), aucune description du profil de phosphorylation permettant l'agrégation n'est publiée. Dans ce contexte, on peut donc logiquement imaginer un potentiel rôle du 3<sup>ème</sup> site de phosphorylation nouvellement



décrit. C'est pourquoi dans cette première partie nous avons tenté de répondre aux deux grandes questions soulevées par ces différentes études :

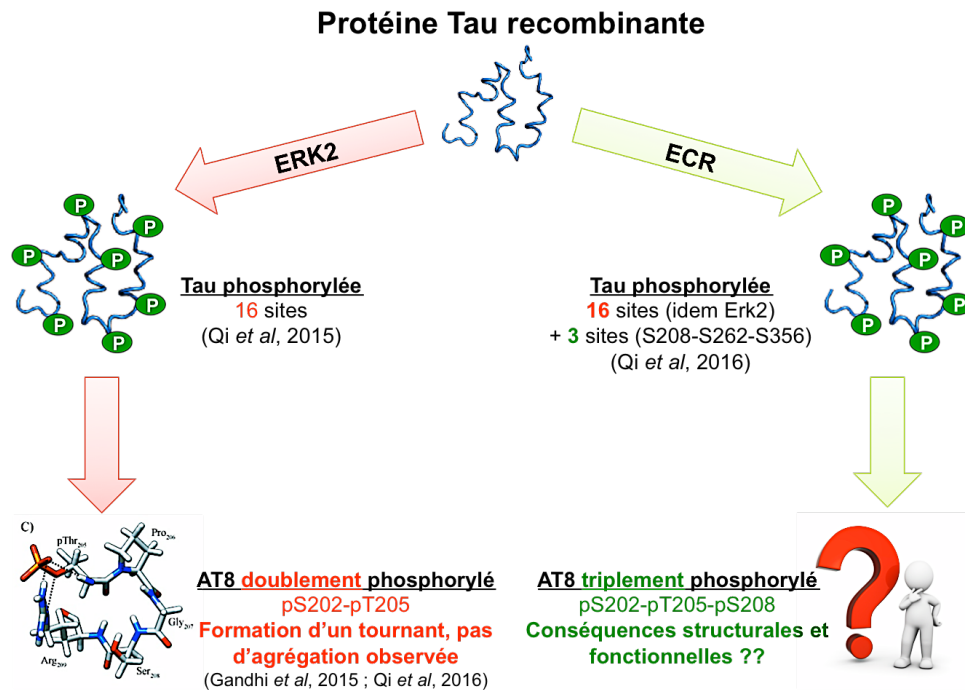
- Quel est le rôle joué par la phosphorylation de la Ser208 dans le processus agrégatif ? et par extension quel serait le profil de phosphorylation minimal capable de déclencher l'agrégation ?
- Quel mécanisme moléculaire lie cette phosphorylation à l'agrégation ? Le tournant initialement décrit sur le peptide diphosphorylé pS202/pT205 est-il impacté par la 3<sup>ème</sup> phosphorylation ?

## I. Profil de phosphorylation minimal déclenchant l'agrégation

Le but de cette première étude était de déterminer le profil minimal de phosphorylation capable de déclencher l'agrégation. Comme précédemment évoqué, aux vues de la littérature actuelle, nous nous sommes donc interrogés sur les conséquences structurales et fonctionnelles du troisième site de phosphorylation de l'épitope AT8, la pSer208. Pour se faire, nous avons eu recours à différentes stratégies :

- L'utilisation d'un modèle peptidique AT8 [192-211] porteur ou non des différentes combinaisons de phosphorylation : non phosphorylé (AT8-0P), doublement phosphorylé pSer202/pThr205 (AT8-2P) ou triplement phosphorylé pSer202/pThr205/pSer208 (AT8-3P). Ce modèle peptidique nous a permis d'étudier l'impacte structural du troisième site de phosphorylation de l'épitope AT8.
- L'utilisation d'un système de phosphorylation *in vitro* de Tau basée sur l'activité kinase ERK2. Celle-ci entraîne la phosphorylation de seize résidus Ser/Thr dont la Ser202 et la Thr205 (Qi et al., 2016). Par cette stratégie, on note que la Ser208 n'est pas phosphorylée (**figure 48**).
- L'utilisation d'extraits de cerveaux de rat (ECR) pour la phosphorylation *in vitro* de Tau. Le profil de phosphorylation généré est similaire à celui obtenu après incubation avec ERK2 mais présente néanmoins trois sites supplémentaires : Ser208, Ser262 et Ser356 (Qi et al., 2016). De

ce fait, la phosphorylation par l'ECR permet l'obtention d'une protéine Tau porteuse de l'épitope AT8 triplement phosphorylée (**figure 48**).



**Figure 48** : Stratégie de phosphorylation *in vitro* de la protéine Tau mise en place pour l'étude du rôle joué par la phosphorylation de la Ser208 dans le mécanisme pathologique de l'agrégation. ECR : extraits de cerveaux de rats.

Pour mémoire, l'AT8 doublement phosphorylé Ser202/Thr205 forme un tournant centré sur la Gly207 (Thr205-Pro206-Gly207-Ser208-Arg209) ce qui lui confère donc une structuration locale « fermée » (Gandhi et al., 2015). De plus, Qi et collaborateurs ont démontré que la phosphorylation de Tau par ERK2 ne permet pas l'agrégation de la protéine Tau (Qi et al., 2016). Or Grundke-Iqbal et collaborateurs montrent l'agrégation *in vitro* de la protéine Tau phosphorylée par l'ECR (Alonso et al., 2001). Par comparaison des profils de phosphorylation obtenus dans les deux cas, ces résultats suggèrent donc un rôle pro-agrégation des résidus pSer208, pSer262 et pSer356 (Alonso et al., 2001; Qi et al., 2016). Sachant que Schneider et collaborateurs ont prouvé le rôle inhibiteur de la pSer262 (Schneider et al., 1999) et que la Ser356 est très faiblement phosphorylée dans notre modèle (Qi et al., 2016), l'étau se resserre autour de la pSer208. Sur la base de ces études nous avons donc émis l'hypothèse suivante : la déstabilisation du tournant induit par la double phosphorylation de l'épitope AT8 (pSer202/pThr205) pourrait conduire à l'agrégation

et cette déstabilisation serait induite par le troisième site de phosphorylation de l'épitope AT8, la pSer208.

Lors de l'étude du tournant induit par la phosphorylation de la protéine 4E-BP2, Bah et collaborateurs avaient aussi démontré que la substitution de la glycine centrale par une valine déstabilisait ce tournant et permettait d'ouvrir le motif et d'exposer les résidus phosphorylés (Bah et al., 2015). Notre étude a donc commencé par l'introduction de cette mutation de la glycine centrale en valine (G207V) dans le modèle phospho-Tau afin d'étudier les conséquences fonctionnelles d'une telle mutation, notamment sur les propriétés d'agrégation de la protéine.

Les différents résultats qui vont suivre ont fait l'objet d'une publication ajoutée en annexe à la fin de cette première partie : « *Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation*, Despres et al., PNAS 2017 ». De ce fait, seuls les résultats principaux seront présentés.

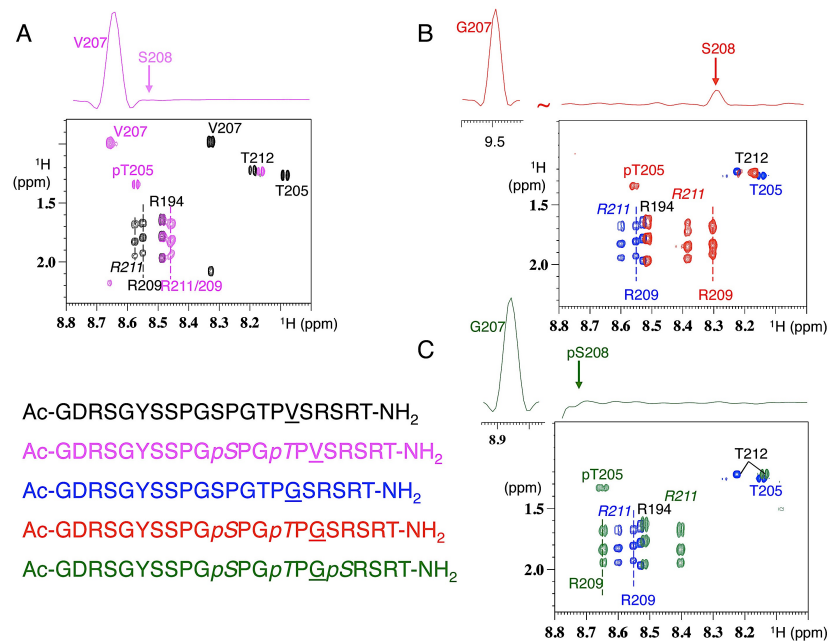
## **A. Mutation G207V, phosphorylation et agrégation de la protéine Tau**

### **i. La mutation G207V ouvre le tournant du motif AT8 di-phosphorylé**

Après phosphorylation de la Ser202 et de la Thr205, le groupement phosphate porté par la chaîne latérale de la pThr205 va former une liaison hydrogène avec le proton amide de la Gly207 ce qui se traduit au niveau du spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC par une variation du déplacement chimique du proton amide de cette glycine à 9,4 ppm (Qi et al., 2016). Au-delà de ces résidus, les Arg209 et Arg211 stabilisent cette liaison hydrogène, effet retrouvé dans le modèle eIF4-E/4E-BP2, base de notre étude (Bah et al., 2015). Comme précédemment évoqué, les auteurs ont montré que le remplacement de la glycine par une valine rendait impossible la formation du tournant et empêchait donc le repliement local de la protéine.

Par conséquent, nous nous sommes donc penché sur le rôle de cette mutation dans notre modèle Tau en démarrant par une étude comparative des peptides AT8 et AT8-G207V di-phosphorylés sur les résidus Ser202 et Thr205 :  $^{192}\text{GDRSGYSSPGSP[G/V]TPGSRRT}^{211}$ . La destruction du tournant dans le peptide AT8-G207V se caractérise par l'absence de contact NOE entre le méthyle de la chaîne latérale de la pThr205 et le proton amide de la Val207 ainsi que par l'absence

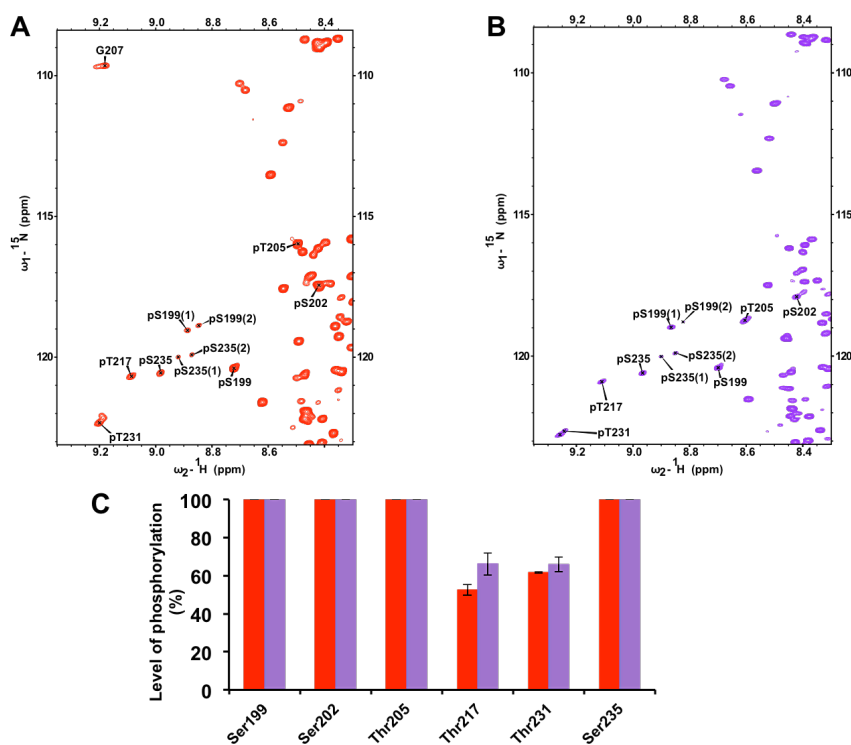
d'un pic NOE entre les protons amide de la Val207 et de la Ser208 (**figure 49-A**). De plus, la variation de déplacement chimique plus importante du proton amide la pThr205 dans le cas G207V indique que ce proton interagit (liaison hydrogène) de manière plus forte avec le groupement phosphate de la chaîne latérale, qui dans le cas non muté (G207) forme une liaison hydrogène avec l'Arg209 (**figure 49-A-B**).



**Figure 49** : Conséquences structurales de la mutation G207V et des différents sites de phosphorylation sur la structuration du peptide AT8. **A**-Superposition des spectres TOCSY 2D <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H des peptides **AT8-G207V natif (noir)** et **AT8-G207V-2P di-phosphorylé pSer202/pThr205 (magenta)**. **B**-Superposition des spectres 2D <sup>1</sup>H TOCSY des **peptides AT8 natif (bleu)** et **AT8-2P di-phosphorylé pSer202/pThr205 (rouge)**. **C**- Superposition des spectres 2D <sup>1</sup>H TOCSY des peptides **AT8 natif (bleu)** et **AT8-3P tri-phosphorylé pSer202/pThr205/pSer208 (vert)**. Le spectre 1D situé au dessus de chaque spectre TOCSY est une trace 1D extraite du spectre NOESY correspondant.

Afin de vérifier l'effet de cette mutation sur le tournant AT8 di-phosphorylé, nous avons décidé d'introduire cette mutation dans le fragment TauF8-C291A [192-324]. Ce fragment est une version allongée porteur de l'épitope AT8 du fragment fonctionnel TauF4 [208-324] déjà utilisé au laboratoire et ayant démontré ses propriétés pro-agrégation. La mutation C291A permet d'assurer la formation du pont disulfure intermoléculaire par le biais de l'unique Cys322. L'incubation de TauF8-C291A avec ERK2 permet d'obtenir le profil de phosphorylation suivant : pSer199-pSer202-pThr205-pThr217-pThr231-pSer235 (Qi et al., 2016). Par ce modèle, nous

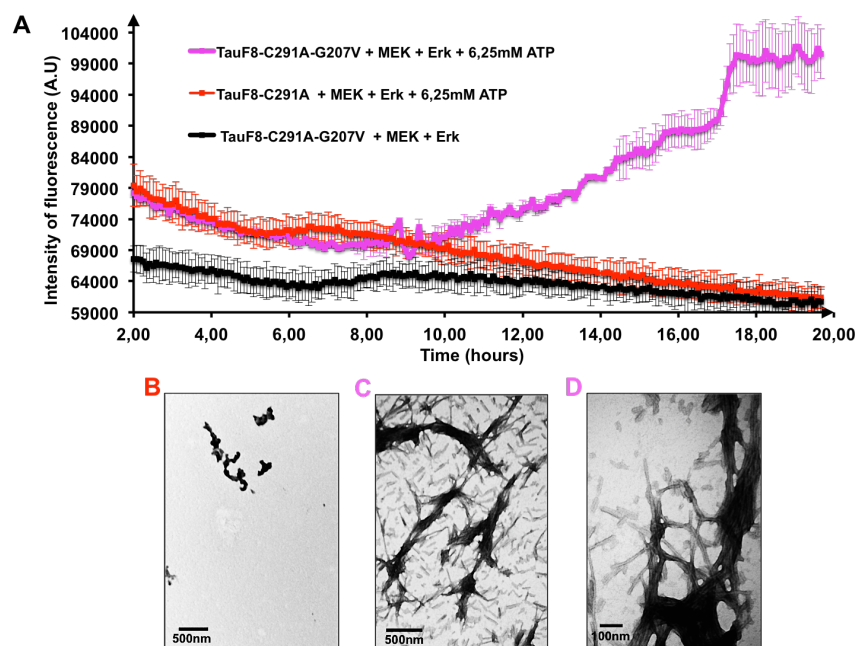
obtenons donc un épitope AT8 di-phosphorylé. L'attribution par RMN de cette protéine et la quantification du niveau de phosphorylation a permis de montrer que les résidus Ser202 et Thr205 étaient quantitativement modifiés et que le tournant était ainsi systématiquement formé par l'observation de la variation de déplacement chimique du proton amide de la Gly207 (**figure 50-A**). De la même manière, la mutation G207V du fragment F8-C291A ne gêne en aucun cas la phosphorylation par ERK2 et aboutit à un profil de phosphorylation tout à fait comparable, sans variation de déplacement chimique du proton amide de la Val207 comparable à celui de la Gly207 (**figures 50-B-C**). Tout comme pour le peptide AT8, on note la variation de déplacement chimique du proton amide de la pThr205 plus important dans le cas G207V ce qui apporte une indication supplémentaire que le tournant caractéristique de la forme AT8 di-phosphorylé est cassé par la mutation (**figures 49-A-B & 50-A-B**).



**Figure 50** : La mutation G207V ouvre le tournant AT8 di-phosphorylé pSer202/pThr205. **A**-Spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de **TauF8-C291A phosphorylé par ERK2**. **B**-Spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de **TauF8-C291A-G207V phosphorylé par ERK2**. On remarque la différence de déplacement chimique du proton amide de la pThr205, plus déblindé dans le cas TauF8-C291A-G207V phosphorylé par ERK2. **C**-Quantification relative du niveau de phosphorylation des fragments TauF8-C291A et TauF8-C291-G207V phosphorylés par ERK2.

## ii. L'ouverture du tournant par la mutation G207V combinée à la phosphorylation par ERK2 entraine l'agrégation

Afin de déterminer si la destruction du tournant AT8 par la mutation avait des conséquences fonctionnelles, notamment sur l'agrégation, nous avons décidé de faire agréger les deux fragments F8-C291A et F8-C291A-G207V phosphorylés par ERK2 en absence d'inducteur polyanioniques tels que l'héparine. Les deux fragments ont ainsi été incubés en présence de la kinase ERK2 activée, issue d'une même production afin d'obtenir des profils de phosphorylation similaires. Après 18h d'incubation, le mélange réactionnel TauF8-C291A-G207V présentait une quantité de fibres très importantes, visibles à l'œil nu au fond de l'ependorff : le mutant G207V agrège donc durant la phosphorylation. De manière à confirmer ces premiers résultats nous avons refait l'expérience en réalisant l'étape de phosphorylation en présence de ThioflavinT (ThT) de manière à pouvoir suivre l'agrégation par fluorescence (**figure 51-A**).



**Figure 51** : Agrégation du fragment TauF8-C291A-G207V durant l'étape de phosphorylation. **A**-Cinétique d'agrégation des fragments natifs et mutants durant l'étape de phosphorylation, suivie par émission de la thioflavine T à 490nm. **B-C-D**-Observations en MET des milieux réactionnels après 20h d'incubation. On note l'absence de fibre pour le fragments TauF8-C921A (**B**) en fin de phosphorylation et la présence en masse de fibres pour le mutants G207V (**C-D**) prouvant donc que l'agrégation a lieu durant la phosphorylation.

L'augmentation de l'émission de la ThT à 490nm n'est observable que dans le cas du mutant G207V en cours de phosphorylation après 10h d'incubation. Cette augmentation du signal est confirmée par les observations en MET qui révèlent la présence de fibres en grande quantité par opposition à la forme non-mutée du fragment qui ne donne pas de fibres (**figures 51-B-C-D**). La diminution du signal pour le fragment non muté et le contrôle négatif peut s'expliquer par la dégradation des enzymes au cours du temps qui entraîne donc une chute de l'émission initiale.

## **B. Conséquences structurales et fonctionnelles du troisième site de phosphorylation de l'épitope AT8, la pSer208**

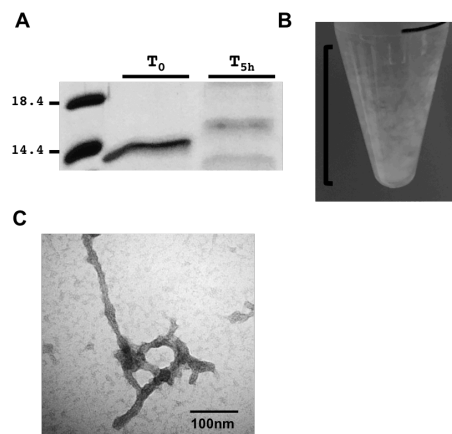
### **i. L'AT8 triplement phosphorylé ne forme plus le tournant autour de la Gly207**

Nous avons montré que la mutation G207V déstabilise le tournant de l'épitope AT8 di-phosphorylé et permet l'agrégation. Cette mutation n'ayant jamais été décrite dans le cadre de patients atteints d'Alzheimer, nous nous sommes logiquement demandés quelle(s) modification(s) post-traductionnelle(s) pouva(en)t jouer un rôle similaire à la mutation G207V. Le candidat idéal aux vues de la littérature était donc le site de phosphorylation Ser208, directement à proximité du motif et décrit récemment comme faisant partie de l'épitope AT8 (Malia et al., 2016). Afin de caractériser les changements structuraux induits par la triple phosphorylation, nous avons synthétisé en collaboration avec le Pr Yves Jacquot et le Dr. Cillian Byrne (UMR 7203, Université Pierre et Marie Curie, Paris) le peptide AT8 décrit précédemment mais ici porteur des trois sites de phosphorylation : Ser202, Thr205, Ser208. L'analyse de la structure de ce peptide par RMN a permis de mettre en évidence différents changements par comparaison avec la structure du peptide AT8 doublement phosphorylé. D'une part, cette phosphorylation de la Ser208 induit une variation du déplacement chimique du proton amide de la Gly207 de 9,4 ppm (pour le doublement phosphorylé) à 8,7 ppm (**figures 49-B-C**). De plus, l'absence de contact NOEs entre les protons amides des résidus Gly207 et Ser208 et entre le CH<sub>3</sub> de la chaîne latérale de la pThr205 avec le proton amide de la Gly207 renforce l'idée que le tournant initialement présent dans la forme diphosphorylée de l'épitope AT8 est ici déstabilisé par la phosphorylation de la Ser208 (**figure 49-C**). Ainsi nous

pouvons affirmer que la phosphorylation de cette Ser208 casse le tournant AT8 de la même manière que la mutation G207V. A la différence de cette dernière, la phosphorylation de la Ser208 est décrite comme un site de phosphorylation pathologique de la protéine Tau dans le cas de la maladie d'Alzheimer.

## ii. La phosphorylation de la Ser208 déclenche également l'agrégation

ERK2 ne présentant pas d'activité kinase pour la Ser208, nous nous sommes tournés vers l'activité kinase de l'extrait de cerveau de rat qui, en présence d'acide okadaïque, aboutit à un profil de phosphorylation similaire à celui obtenu avec ERK2 (Qi et al., 2016). Seuls 3 sites supplémentaires sont identifiés : la *p*Ser208, site d'intérêt principal dans notre étude, la *p*S262 décrite comme inhibitrice de l'agrégation (Schneider et al., 1999) et la *p*S356 elle aussi inhibitrice mais ici très faiblement phosphorylée. Nous avons donc muté la Ser262 en alanine dans le fragment F8-C291A et réalisé la réaction de phosphorylation par l'extrait de cerveau. Après 5h d'incubation, nous avons observé une perte quasi totale de la fraction soluble de TauF8-C291A (**figure 52-A**) et la formation d'un culot visible à l'œil nu composé de fibres et d'agrégats (**figure 52-B-C**).

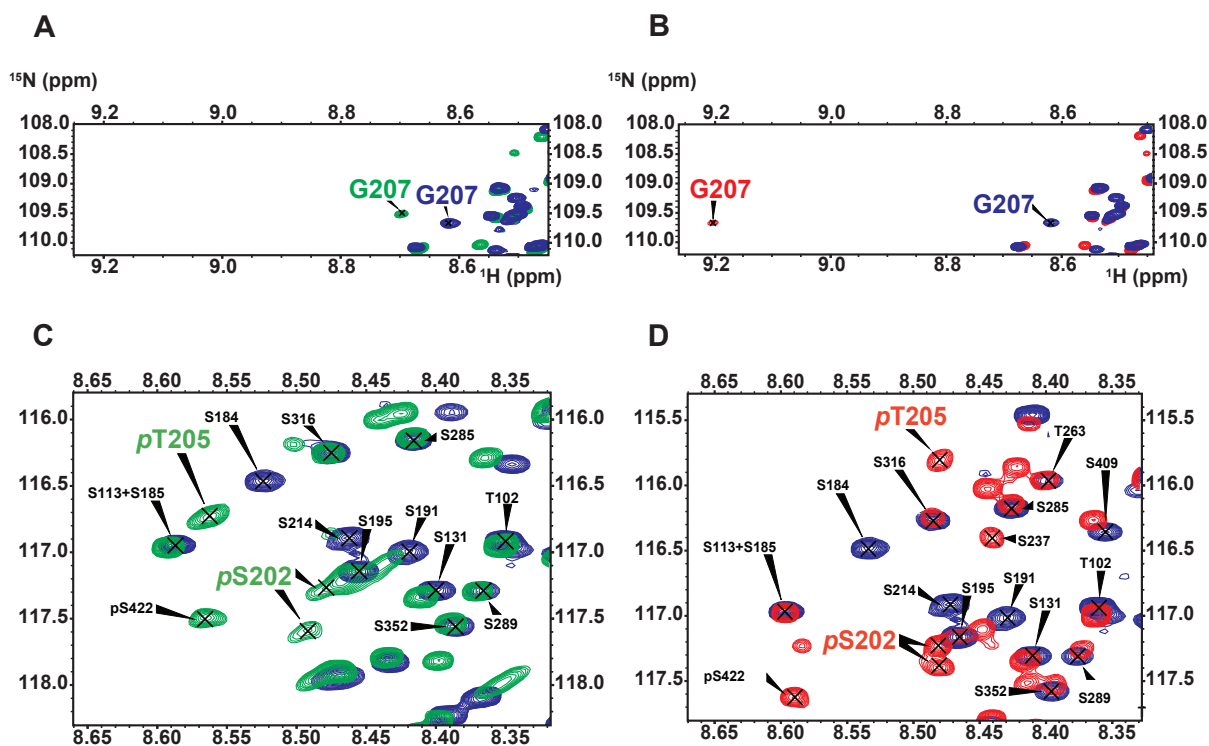


**Figure 52** : Aggrégation de TauF8-C291A-S262A durant l'étape de phosphorylation par l'extrait de cerveau de rat. **A**-Gel SDS-PAGE (15%) montrant la disparition de la fraction soluble de la protéine durant la phosphorylation. **B**-Culot observable à l'œil nu après 5h de réaction. **C**- Observations MET du culot observé après 5h de réaction. De nombreuses fibres et agrégats ont été observés.

Afin de ralentir ce processus d'agrégation, nous nous sommes redirigés vers le modèle Tau441 qui agrège plus lentement. La phosphorylation des formes



sauvage et mutée (S262A) n'entraîne pas une agrégation massive comme observée avec le fragment et permet donc d'analyser par RMN les profils de phosphorylation obtenus. Ceux-ci étant similaires à ceux déjà décrits (Qi et al., 2016) et présentant une bonne phosphorylation de la Ser208, nous nous sommes intéressés de plus près aux différentes caractéristiques de la présence/absence de tournant (**figure 53**).

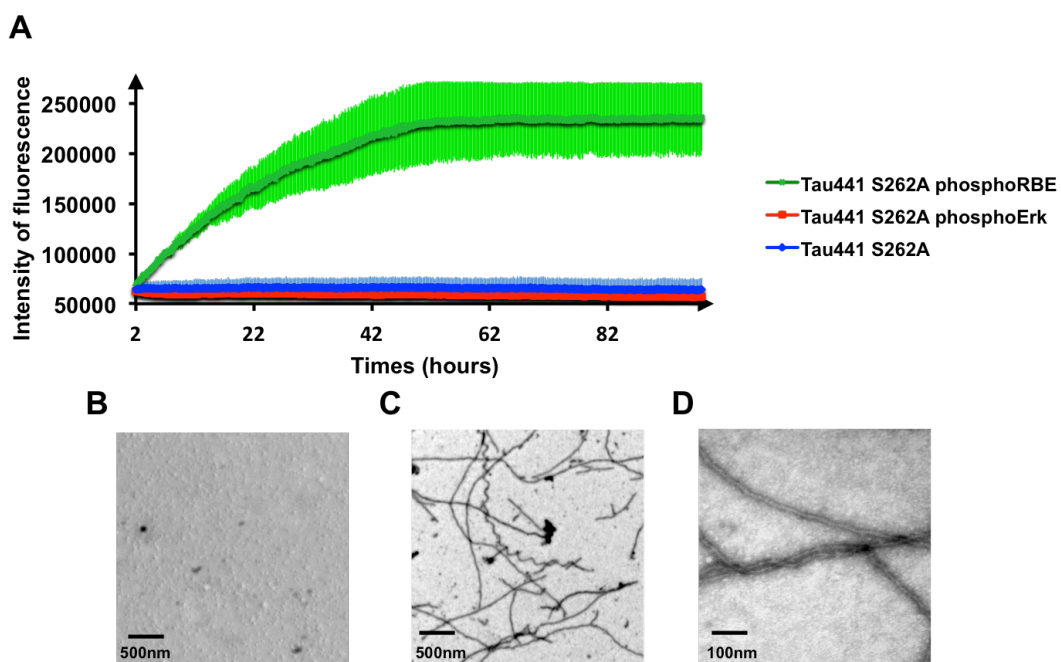


**Figure 53** : La phosphorylation de la Ser208 entraîne la destruction du tournant AT8 observable dans la forme diphosphorylée de l'épitope. Superposition des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de **Tau441-S262A (bleu)** ; **Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau (vert)** ; **Tau441-S262A phosphorylée par ERK2 (rouge)**. **A**-Spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de la région des glycines. La variation du déplacement chimique du proton amide de la Gly207 observable dans le cas de l'épitope doublement phosphorylé n'est plus observable lorsque la Ser208 est phosphorylée. **B**- Spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de la région des sérines/thréonines. On remarque la variation du déplacement chimique du proton amide de la pThr205 lorsque la Ser208 est phosphorylée, preuve supplémentaire que le tournant est détruit par la triple phosphorylation de l'épitope.

Tout d'abord, la variation de déplacement chimique du proton amide de la Gly207 observable après phosphorylation par ERK2 (pSer202/pThr205) est absente après phosphorylation par l'extrait de cerveau de rat. Sur la base d'expériences RMN 3D, nous avons identifié la Gly207 dans la région caractéristique des glycines (**figure 53-A**). De plus, la variation de déplacement chimique du proton amide de la pThr205 est plus importante lorsque Tau est phosphorylée par l'ECR que pour ERK2 ce qui implique encore une liaison hydrogène intra-résiduelle, comme observé dans le cas

du peptide AT8 tri-phosphorylé (**figure 53-B**). Sur la base de ces différentes observations, nous pouvons dire que lorsque Tau est phosphorylée par l'extrait de cerveau, induisant la triple phosphorylation de l'épitope AT8, le tournant observé dans le cadre d'une double phosphorylation est détruit.

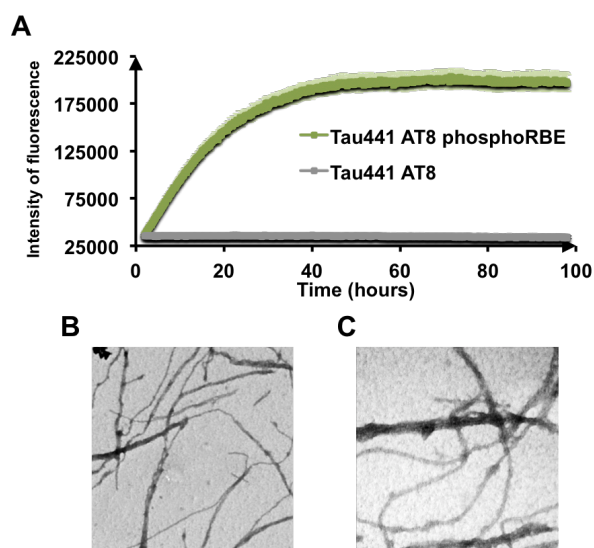
Par conséquent, nous nous sommes penchés sur les conséquences fonctionnelles de cette ouverture du motif AT8, notamment dans le processus d'agrégation de Tau. De la même façon que précédemment, des expériences d'agrégation en absence d'héparine ont été réalisées avec Tau441-S262A phosphorylée par ERK2 ou par l'ECR. Une augmentation de l'émission de ThT est observée uniquement dans le cas où Tau-S262A est phosphorylée par l'extrait de cerveau (**figure 54-A**). Ce signal est confirmé par observation MET et révèle la présence de fibres en grande quantité (**figures 54-B-C-D**). Nous pouvons donc conclure que la triple phosphorylation d'AT8 permet l'ouverture du tournant, remodelage structural nécessaire à l'agrégation. Mais cette triple phosphorylation est-elle à elle seule suffisante pour déclencher l'agrégation ?



**Figure 54** : La triple phosphorylation de l'épitope AT8 déclenche l'agrégation. **A**-Agrégation sans inducteur polyanionique des protéines Tau441-S262A phosphorylée par ERK2 ou par l'ECR suivie par fluorescence de la ThT. **B-C-D**- Observations en MET des échantillons après agrégation. On remarque l'absence de fibres pour **Tau441-S262A phosphorylée par ERK2 (B)** alors qu'une agrégation massive de **Tau441-S262 phosphorylée par l'ECR (C-D)** est observée. RBE = ECR, extrait de cerveau de rat.

### iii. La triple phosphorylation de l'épitope AT8 nécessaire et suffisante pour l'agrégation

Dans le but de savoir si la triple phosphorylation de l'épitope AT8 suffit à elle seule à déclencher l'agrégation, nous avons généré un mutant de Tau441 qui ne possède plus que les trois sites d'intérêt, les autres ayant été mutés en alanine : Tau441-AT8. De la même façon que précédemment, le mutant est phosphorylé par l'extrait de cerveau de rat et le profil de phosphorylation caractérisé avant les expériences d'agrégation. Après caractérisation, Tau441-AT8 phosphorylée est mise à agréger en absence d'inducteur. On constate après quelques heures une augmentation de l'émission de la ThT, augmentation confirmée par les observations en MET qui montrent la présence de fibres en grande quantité (**figure 55**). En revanche, soulignons ici la morphologie des fibres qui sont différentes de celles obtenues dans la version totalement phosphorylée de la protéine. En effet, les fibres obtenues ici sont longues mais à la différence des fibres précédemment observées, elles ne sont pas torsadées et présentent des contours irréguliers (**figure 55-B-C**). Nous pouvons donc dire que l'épitope AT8 triplement phosphorylé permet à lui seul de déclencher l'agrégation mais que la combinaison de différents sites de phosphorylation permet l'obtention de fibres de morphologies différentes.

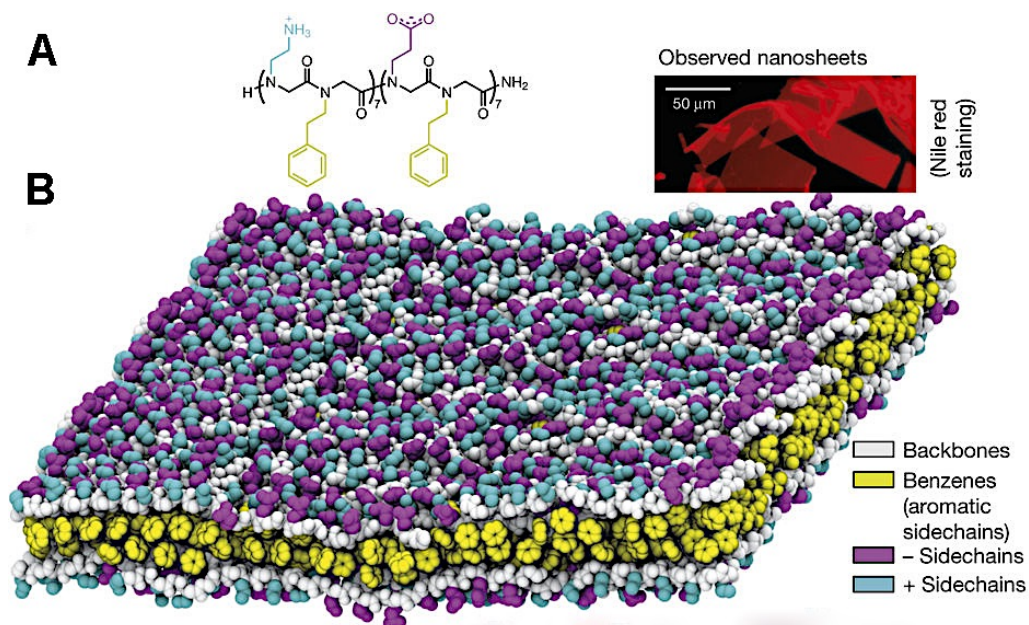


**Figure 55** : L'épitope AT8 triplement phosphorylé est nécessaire et suffisant pour déclencher l'agrégation. **A**-Agrégation sans inducteur polyanionique suivie par fluorescence de la ThT. **B-C**-Observations en MET de l'échantillon Tau441-AT8 phosphorylée par l'ECR après agrégation. RBE = ECR, extrait de cerveau de rat.

## II. Etude du mécanisme moléculaire de l'agrégation de Tau

Par comparaison des modèles Tau phosphorylés par ERK2 ou par l'extrait de cerveau de rat, nous avons établi le rôle essentiel de la triple phosphorylation de l'épitope AT8 dans le processus d'agrégation. En effet, la phosphorylation de la Ser208 entraîne la déstabilisation du tournant formé par la double phosphorylation. Ainsi, celle-ci provoque l'exposition des résidus phosphorylés et donc des charges négatives portées par les groupements phosphates d'une part et les charges positives des chaînes latérales des Arg209 et Arg211 impliquées dans ce tournant.

Récemment, Mannige et collaborateurs ont proposé un modèle de formation de *nanosheets* reposant sur l'assemblage de peptoïdes *via* des interactions électrostatiques (Mannige et al., 2015). Les peptoïdes étant porteurs d'un noyau aromatique et de chaînes latérales acides et basiques, l'assemblage se résume en la formation d'une bicouche composée d'un cœur hydrophobe et exposant les fonctions chargées vers l'extérieur. De ce fait, la formation des *nanosheets* par polymérisation des peptoïdes est uniquement réalisée de façon bilatérale, la stabilité de l'édifice étant assurée par des interactions électrostatiques intermoléculaires de surface entre les chaînes latérales de charges opposées des différents peptoïdes (**figure 56**).



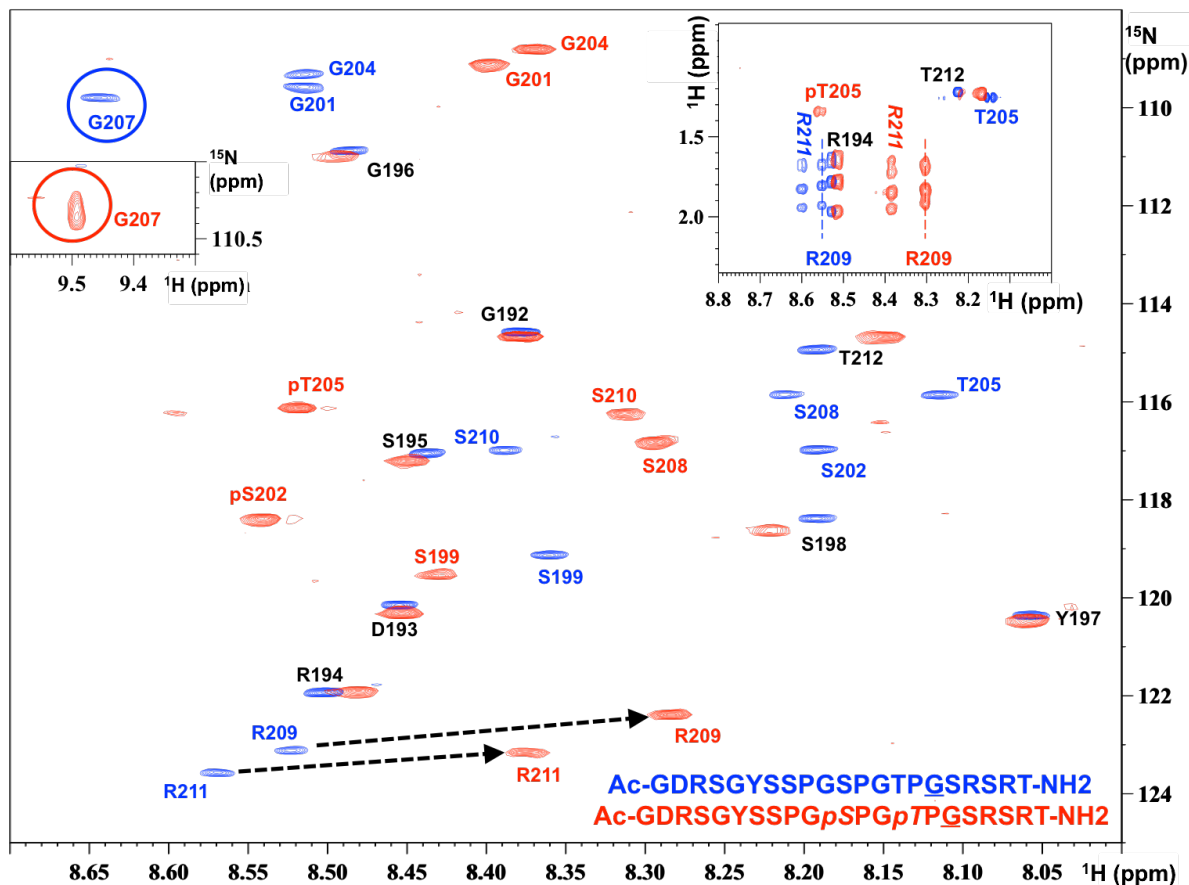
**Figure 56** : *Nanosheet* obtenue par dynamique moléculaire. **A**-Peptoïde amphiphile composé de 28 résidus. **B**-Bicouche obtenue par dynamique moléculaire montrant l'organisation des peptoïdes incorporés (Mannige et al., 2015)

Sur la base de ce modèle, nous avons formulé l'hypothèse suivante : l'ouverture du tournant provoque l'exposition des charges négatives qui vont pouvoir interagir avec d'autres charges positives, notamment les Arg209 et Arg211 d'une autre molécule de Tau phosphorylée. La polymérisation conduisant à l'agrégation reposerait donc sur des interactions électrostatiques intermoléculaires uniquement possibles dans le cadre de « l'ouverture » du tournant AT8. Dans un premier temps, nous avons tenté d'établir par RMN un lien entre le profil de phosphorylation et les arginines voisines de l'épitope d'intérêt. Dans un second temps, nous avons généré des mutants R209A/R211A afin de déterminer le degré d'implication de ces résidus dans le processus d'agrégation.

## **A. Caractérisation par RMN des Arg209 et Arg211**

### **i. Etude des Arg209 et Arg211 dans le modèle peptidique AT8 [192-212]**

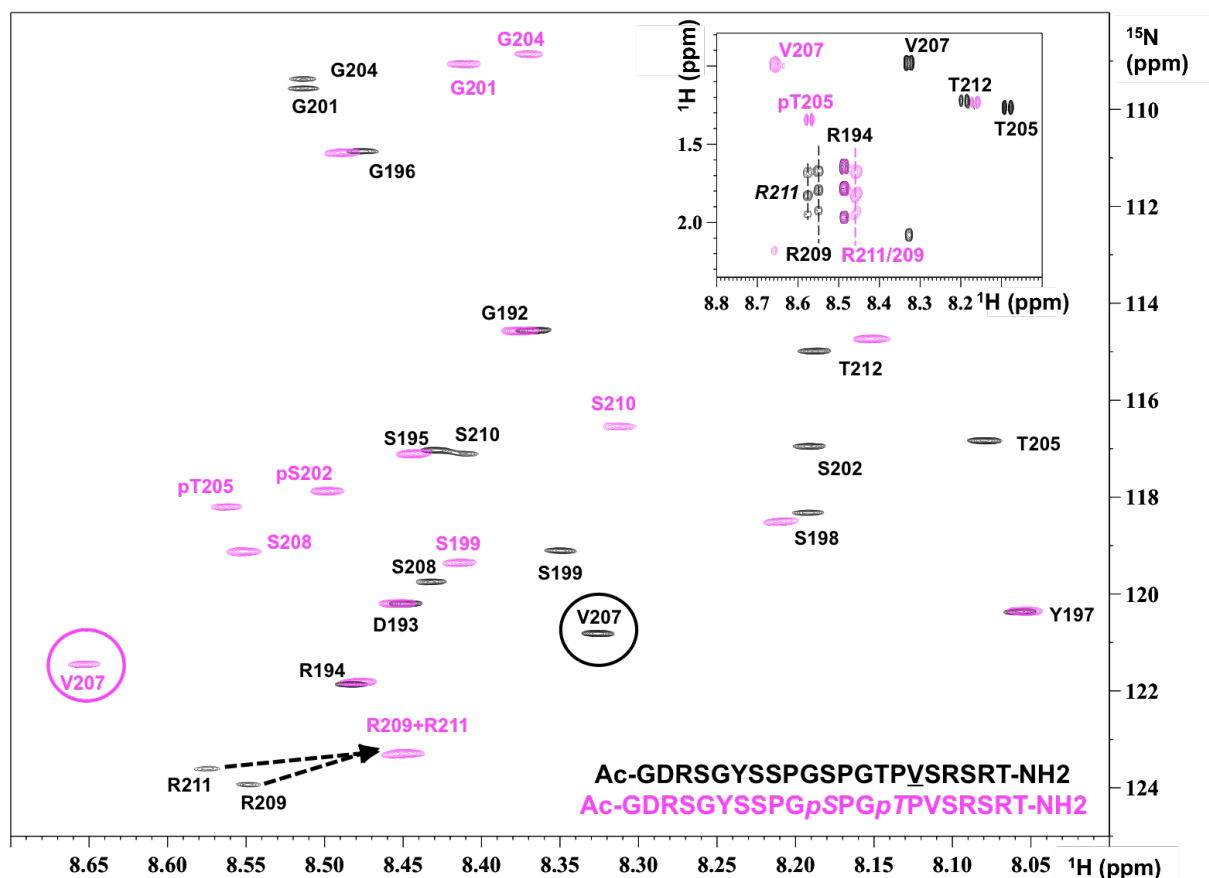
Pour des questions de simplicité d'analyse, nous avons dans un premier temps abordé la question des arginines dans le modèle peptidique AT8 [192-212] synthétisé par le Dr Cillian Byrne (UPMC université Paris 6, CNRS UMR 7203) dans le cadre de l'étude du profil de phosphorylation induisant l'agrégation. Durant celle-ci, nous avons observé une variation du déplacement chimique de 0,3 ppm du proton amide porté par l'Arg209 dans le cas du peptide AT8-2P par rapport au déplacement chimique du même résidu dans le peptide non-phosphorylé (**figure 57**). Ceci s'explique par la stabilisation du tournant autour de la Gly207 induit par la double phosphorylation. En effet, l'interaction entre le groupement phosphate porté par la chaîne latérale de la pThr205 et l'Arg209 stabilise ce tournant, ce qui se traduit par un changement de son environnement électronique et donc une perturbation de son déplacement chimique (Gandhi et al., 2015). Mais on peut aussi légitimement supposer que cette variation de déplacement chimique est simplement induite par la phosphorylation de la Thr205, voisine de l'Arg209.



**Figure 57** : Implication des résidus Arg209 et Arg211 dans la formation du tournant AT8 sur le peptide AT8-2P. Superposition des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC et 2D  $^1\text{H}$  TOCSY du peptide **AT8-0P non modifié (bleu)** et **doublement phosphorylé AT8-2P (rouge)**. On remarque constate la variation de déplacement chimique du proton amide de la Gly207 dans le cas doublement phosphorylé ce qui indique la formation du tournant. De plus, aussi bien sur l'HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  que sur le TOCSY (zoom), on observe une forte perturbation des déplacements chimiques des Arg209 et Arg211 en présence des résidus phosphorylés.

Pour rappel, l'introduction de la mutation G207V est incompatible avec la formation du tournant et permet donc la déstabilisation du motif observé dans le cas du peptide AT8-2P (Bah et al., 2015). L'analyse du peptide AT8-2P-G207V révèle une perturbation du déplacement chimique de 0,1 ppm du proton amide de l'Arg209, nettement inférieure à celle observée sur le peptide AT8-2P (**figure 58**). On peut donc dire que lorsque la formation du tournant est compromise par la mutation G207V, la phosphorylation de la Thr205 est ressentie par l'Arg209 mais n'entraîne pas une variation de déplacement chimique comparable au peptide non muté doublement phosphorylé (AT8-2P). Ainsi, l'analyse du peptide AT8-2P-G207V nous permet de découpler les variations de déplacement chimique du proton amide de l'Arg209 de la phosphorylation voisine (pThr205) et de prouver qu'au-delà de cette phosphorylation l'environnement électronique de l'Arg209 est modifié. Néanmoins,

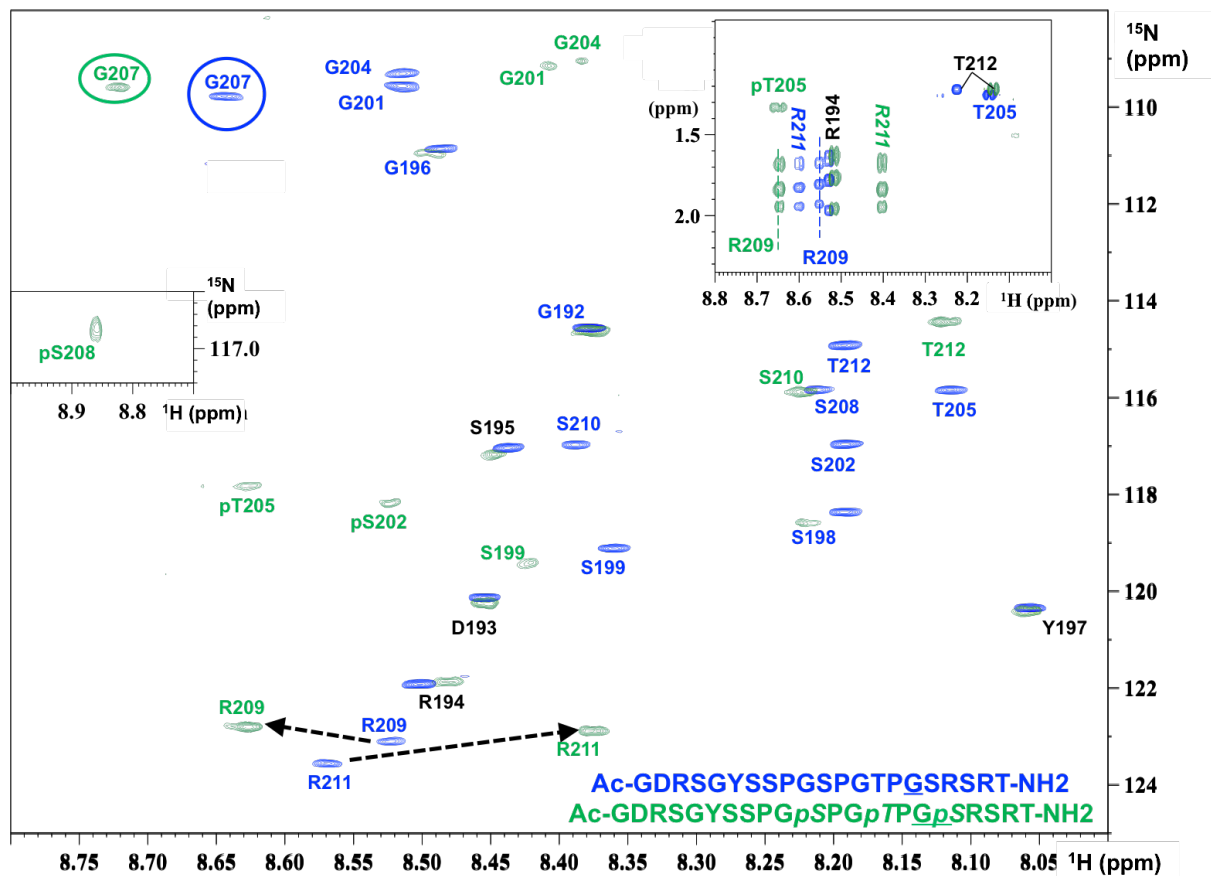
on note que la simple analyse des déplacements chimiques reste délicate dans ce contexte du fait de la proximité des sites de modifications et des sites mutés. D'autres expériences seront donc nécessaires pour prouver le lien entre les arginines et les résidus phosphorylés.



**Figure 58** : La phosphorylation des résidus Ser202 et Thr205 n'induit pas de variation de déplacement chimique des protons amides des Arg209 et Arg211 dans le modèle peptidique AT8-G207V incompatible avec le tournant. Superposition des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC et 2D  $^1\text{H}$  TOCSY du peptide **AT8-G207V non modifié (noir)** et **doublément phosphorylé, AT8-2P-G207V (violet)**.

De manière logique, l'étude s'est donc poursuivie par l'analyse du dernier peptide de la série, l'AT8-3P porteur de la pSer208 étant à l'origine de la déstabilisation du tournant et du déclenchement de l'agrégation. De la même manière, nos observations se sont concentrées sur l'analyse des déplacements chimiques des arginines voisines du motif. Par rapport au peptide natif, on constate une variation du déplacement chimique du proton amide de l'Arg209 de 0,1 ppm, probablement induit par le site de phosphorylation supplémentaire (**figure 59**). En revanche, comme dans le cas du peptide muté G207V, cette perturbation est nettement inférieure à celle observée dans le cas du peptide AT8-2P (**figure 57**)

caractérisé par le tournant. On peut donc affirmer que l'environnement électronique des résidus Arg209 et Arg211 du mutant G207V est comparable à celui du peptide AT8-3P, triplement phosphorylé. Ces premiers résultats confirment une nouvelle fois l'implication des résidus arginines dans l'établissement du tournant AT8 et suggèrent leur exposition potentielle par déstabilisation du tournant lorsque l'épitope AT8 est triplement phosphorylé, permettant ainsi l'interaction intermoléculaire avec d'autres molécules de Tau phosphorylées.



**Figure 59** : La triple phosphorylation du peptide AT8 induit une perturbation du déplacement chimique des protons amides des Arg209 et Arg211 globalement comparable au peptide AT8-G207V. Superposition des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC et 2D  $^1\text{H}$  TOCSY du peptide **AT8-0P non modifié (bleu)** et **triple phosphorylé AT8-3P (vert)**.

Les résultats obtenus sur ce modèle peptidique AT8 confirment la formation du tournant induit par la double phosphorylation pS202/pT205 et stabilisé par les arginines voisines démontré par Gandhi et collaborateurs. De plus, ils renforcent l'hypothèse selon laquelle la 3<sup>ème</sup> phosphorylation de la Ser208 entraîne la

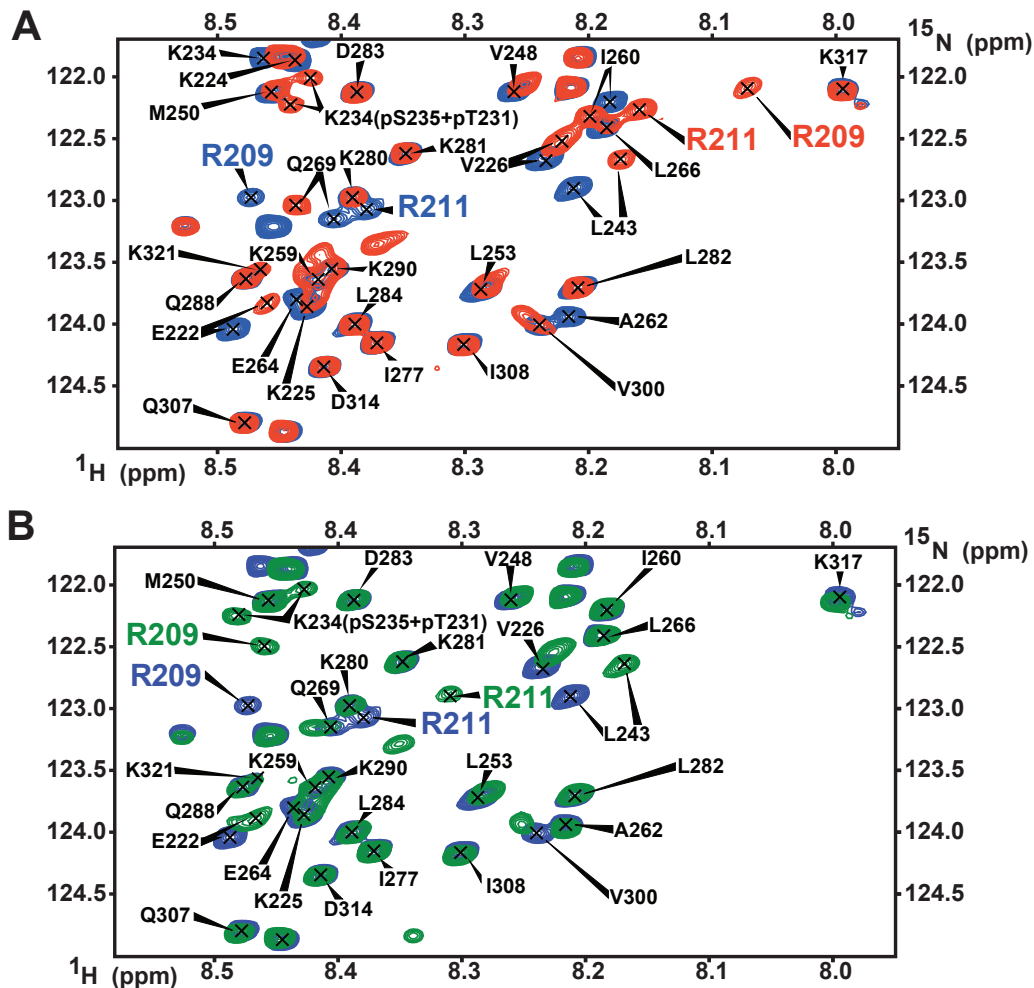


déstabilisation du tournant mais surtout l'exposition des résidus Arg209 et Arg211. Une nouvelle fois, ces premiers résultats basés sur l'observation des déplacements chimiques doivent être confirmés. Nous pourrions par exemple réaliser des expériences RMN de type NOESY qui permettrait de mettre en évidence ou non d'éventuels proximités spatiales (couplages dipolaires) entre les chaînes latérales des Arg209/Arg211 et les résidus phosphorylés.

## ii. Etude des Arg209 et Arg211 dans le modèle TauF8 [192-324]

Suite à l'obtention de ces premiers résultats dans le modèle peptidique, nous avons donc décidé de réaliser la même étude dans le contexte du fragment fonctionnel TauF8, phosphorylé par ERK2 ou par l'extrait de cerveau de rat. Pour mémoire, ces deux protocoles induisent respectivement la phosphorylation des résidus S202/T205 et S202/T205/S208 au niveau de l'épitope AT8. Par superposition des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de TauF8 phosphorylés avec le spectre de TauF8 natif, on constate des variations de déplacement chimique des protons amides des Arg209 et Arg211 similaires à celles observées dans le modèle peptidique (**figure 60**). En effet, dans le cas d'une double phosphorylation de l'épitope AT8, une variation de déplacement chimique de 0,3 ppm est observée pour les protons amides des résidus Arg209 et Arg211, ce qui implique une modification de l'environnement électronique (**figure 60-A**). A l'inverse, lorsque l'épitope est triplement phosphorylé, peu de perturbations sont observées (**figure 60-B**). En d'autres termes, dans le cas du modèle doublement phosphorylé, les résidus arginines ressentent la phosphorylation au voisinage (pSer202/pThr205), ce qui n'est pas le cas dans la situation AT8-3P. Par analogie avec le modèle peptidique, nous pouvons affirmer que la phosphorylation de TauF8 par ERK2 induit la formation du tournant qui est déstabilisé dans le modèle TauF8 phosphorylé par l'extrait de cerveau de rat. On note que l'acquisition du spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de TauF8 phosphorylé par l'extrait de cerveau de rat est réalisée après phosphorylation de l'échantillon. Or nous avons précédemment démontré une agrégation massive durant l'étape de modification de la protéine. De ce fait, la fraction caractérisée par RMN correspond au résidu non-agrégé post-phosphorylation. Contre toute attente, le profil de phosphorylation reste tout à fait normal : triple phosphorylation de l'épitope AT8 (pSer202/pThr205/pThr208), des résidus Thr217/231 et de la Ser235. On peut

supposer que cette fraction n'a pas agrégé en raison d'un temps d'incubation trop court : une étape de phosphorylation plus longue aurait probablement induit la perte totale de l'échantillon.



**Figure 60** : Superposition des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC du fragment fonctionnel **TauF8 natif (bleu)** et **TauF8 phosphorylée par ERK2 (rouge, A)** ou par **l'extrait de cerveau de rat (vert, B)**. **A-** On constate la perturbation de déplacement chimique des protons amides des Arg209 et Arg211 induite par la double phosphorylation de l'épitope AT8. **B-** La triple phosphorylation d'AT8 n'induit qu'une faible perturbation du déplacement chimique qui s'explique par la proximité séquentielle des arginines avec le groupement phosphate porté par la Ser208.

Pour finir nous avons tenté d'analyser les perturbations de déplacement chimique à l'échelle de la protéine Tau441. Toutefois sur l'HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , en raison de la faible dispersion des signaux en dimension  $^1\text{H}$ , beaucoup de résidus se retrouvent dans la région d'intérêt ce qui n'a pas permis l'identification claire des résidus Arg209 et Arg211.

Pour conclure, même si ces résultats préliminaires doivent encore être confirmés par d'autres types d'expériences, l'observation des variations de déplacement chimique des protons amides des Arg209 et Arg211 par RMN semble être un bon indicateur de l'état conformationnel de l'épitope AT8. La formation du tournant induit par la double phosphorylation de l'épitope AT8 (pSer202/pThr205) perturbe grandement le déplacement chimique des protons amides des Arg209 et Arg211 par rapport au contrôle non phosphorylé, ce qui n'est pas le cas lors de la triple phosphorylation, à l'origine de la déstabilisation du tournant AT8. Dans ce dernier cas, on peut donc supposer que les dites arginines n'interagissent plus avec les groupements phosphates à proximité et seront donc disponibles pour toute autre interaction intermoléculaire ce qui corrobore en partie notre hypothèse initiale.

## **B. Conséquence de la mutation des Arg209/211 en Ala209/211 sur l'agrégation de Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat**

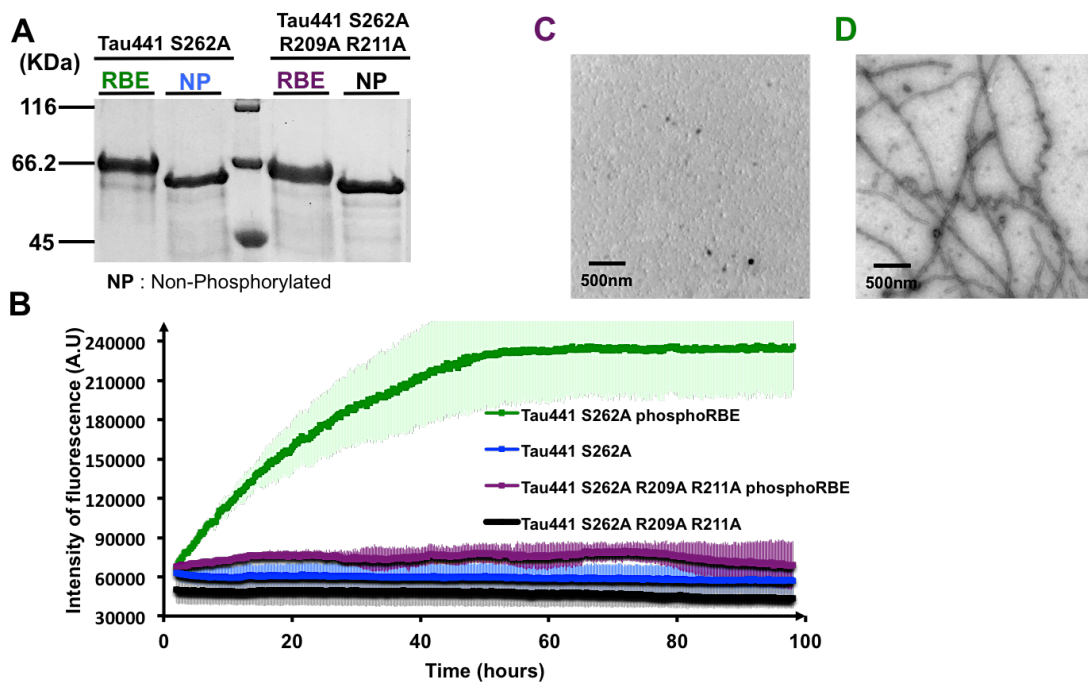
### **i. Agrégation du fragment TauF8-S262A**

Lors de la détermination du profil de phosphorylation déclenchant l'agrégation de la protéine Tau, nous avons démontré que le fragment TauF8-S262A agrège durant l'étape de phosphorylation par l'extrait de cerveau de rat. En effet, après 5h d'incubation à 37°C l'agrégation était visible à l'œil nu (**figure 52**). Ainsi, dans l'étude du rôle des arginines, le premier test simple et rapide était de phosphoryler le mutant TauF8-S262A-R209A-R211A (F8-2RA). De manière surprenante, après 5h ou une nuit de phosphorylation, aucune agrégation n'a été observée. En raison de l'impossibilité de suivi de l'agrégation du fragment TauF8-S262A et donc de comparaison avec le mutant F8-2RA, nous nous sommes donc rapidement tournés vers le modèle complet Tau441-S262A.

### **ii. Agrégation de Tau441-S262A**

Nous avons donc généré le mutant Tau441-S262A-R209A-R211A (Tau441-2RA) phosphorylé par l'extrait de cerveau et comparé à Tau441-S262A qui avait précédemment démontré sa forte tendance à agréger. Les deux protéines ont été

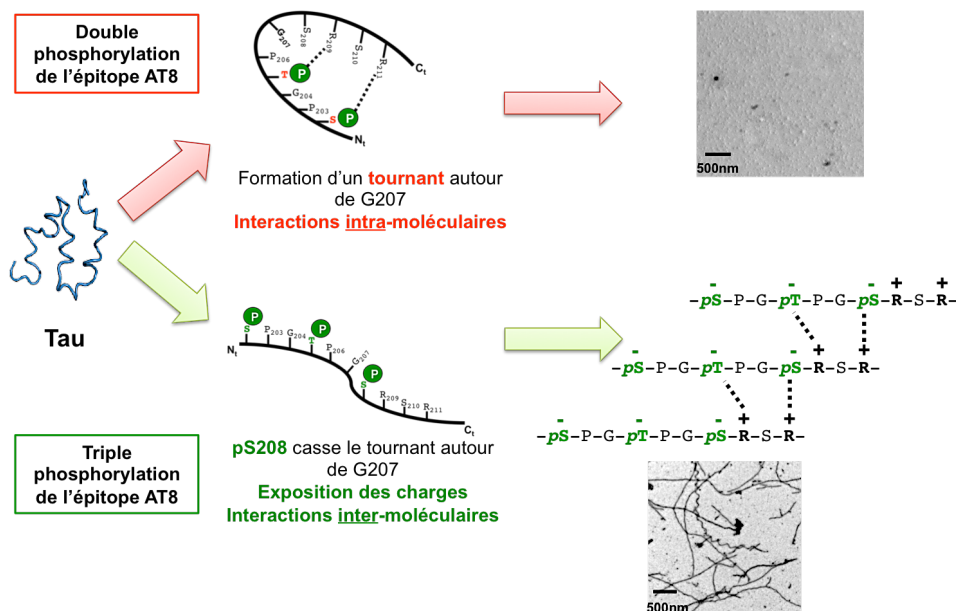
phosphorylées par le même extrait de cerveau de rat et déposées sur gel SDS-PAGE : dans les deux cas un retard de migration induit par la phosphorylation est observé ce qui semble indiquer que la mutation 2RA n'entrave pas la phosphorylation (**figure 61-A**). Avant agrégation, le profil de phosphorylation a été vérifié par RMN et nous avons donc confirmé l'hypothèse formulée par observation du profil de migration sur gel d'électrophorèse. Comme pour les autres expériences, le test d'agrégation sans héparine a été suivi par fluorescence de la ThT et confirmé par observations en MET (**figure 61-B-C-D**). Seule la protéine Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau a agrégé et formé des fibres. Concernant le mutant Tau441-2RA, aucun signal n'a été détecté et aucune fibre n'est observée en MET. Ceci démontre donc l'importance capitale de ces deux résidus Arg209 et Arg211 dans le processus d'agrégation.



**Figure 61** : Implication des arginines 209 et 211 dans l'agrégation de Tau. **A**-Gel SDS-PAGE (10%) sur lequel on distingue le retard de migration dans le cas de la protéine phosphorylée. **B**-Agrégation sans inducteurs polyanionique suivie par fluorescence de la ThT. **C-D**-Observations en MET des échantillons après agrégation. On constate l'absence totale de fibre pour le **mutant 2RA phosphorylé par l'ECR** (C) alors que de nombreuses fibres sont observées après agrégation de la protéine **Tau441-S262A phosphorylée par l'ECR** (D). RBE = ECR, extrait de cerveau de rat.

### III. Conclusions, discussions et perspectives

En conclusion de cette 1<sup>ère</sup> partie, nos résultats confirment le rôle majeur joué par l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans le processus d'agrégation. De plus, nous décrivons ici, pour la première fois, le profil minimal de phosphorylation conduisant à l'agrégation. Celui-ci se résume à l'épitope AT8 triplement phosphorylé Ser202/Thr205/Ser208. En effet, la double phosphorylation de ce dernier entraîne la formation d'un tournant autour de la Gly207 qui joue donc un rôle protecteur de l'agrégation. Ce tournant est stabilisé par des interactions électrostatiques intra-moléculaires et par des liaisons hydrogène entre les groupements phosphates portés par les chaînes latérales des résidus pSer202 et pThr205 et les chaînes latérales des résidus Arg209 et Arg211. Le troisième site de phosphorylation, la pSer208, vient déstabiliser ce tournant permettant l'exposition des charges positives et négatives et déclenchant ainsi l'agrégation. De plus, par RMN et mutagenèse dirigée nous avons démontré l'importance capitale des résidus Arg209 et Arg211 dans le processus d'agrégation. Tout ceci nous conduit à proposer un processus d'agrégation de la protéine Tau en 2 étapes successives : la déstabilisation du tournant protecteur par la triple phosphorylation de l'AT8 entraîne le démarrage de la polymérisation sur la base d'interactions électrostatiques inter-moléculaires (**figure 62**).



**Figure 62** : Représentation schématique du potentiel mécanisme initiateur de l'agrégation de Tau phosphorylée.

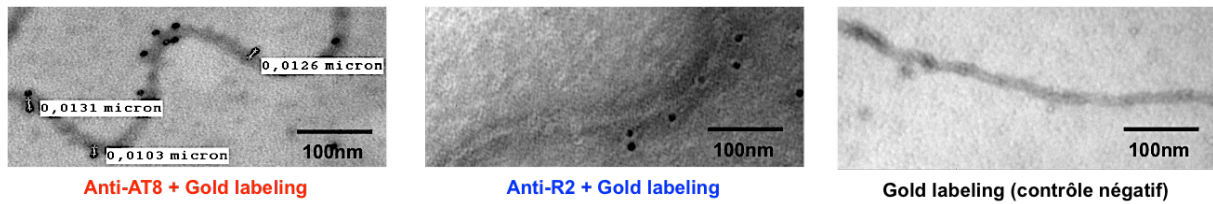
Concernant la détection et la progression de la maladie d'Alzheimer comme l'a définie le médecin allemand Heiko Braak, l'épitope AT8 est retrouvé chez les patients atteints de la maladie mais aussi au stade du développement embryonnaire alors que les fœtus ne sont pas atteints (Braak et al., 2006). Pour rappel, Malia et collaborateurs démontrent par co-cristallisation de l'anticorps AT8 (Fab) avec différents phospho-peptides AT8 une affinité de l'anticorps pour le peptide tri-phosphorylé (pSer202/pThr205/pSer208) supérieure au di-phosphorylé (pSer202/pThr205) (Malia et al., 2016). Sur la base de ces deux études, nous pouvons donc supposer que l'épitope AT8 reconnu au stade embryonnaire serait en fait l'AT8 doublement phosphorylé formant le tournant protecteur de l'agrégation, alors que dans le cas de patients Alzheimer, l'épitope détecté serait la version triplement phosphorylée conduisant à l'agrégation. Ceci remet en cause la spécificité de reconnaissance de l'anticorps actuellement utilisé dans le diagnostic *post-mortem* de la maladie. Afin de pallier cela, il serait envisageable de générer un nouvel anticorps spécifiquement dirigé contre la forme triplement phosphorylée de l'épitope AT8 et de le tester dans le cas fœtal et/ou malade. Si cette hypothèse s'avère juste, l'anticorps spécifique nouvellement produit ne devrait cibler que protéine Tau isolée de patients atteints par la maladie d'Alzheimer.

Ce profil de phosphorylation permettant le déclenchement de l'agrégation *in vitro* mérite d'être discuté et replacé dans un contexte d'évolution de la maladie *in vivo*. En effet, nous avons déterminé le profil minimal de phosphorylation conduisant à l'agrégation massive de la protéine : pSer202/pThr205/pSer208 sans la phosphorylation de la Ser262 déterminée comme inhibitrice de l'agrégation (Schneider et al., 1999). Si l'on se réfère à la description de la maladie suivant l'évolution du profil de phosphorylation (Augustinack et al., 2002), les stades précoces sont caractérisés par la phosphorylation, entre autre, de la Ser262 et la faible modification de l'épitope AT8. A ce stade, peu de fibres sont observées ce qui indique donc une agrégation faible de la protéine. Ces observations corrént parfaitement avec le profil de phosphorylation déterminé *in vitro*. En revanche, dans les stades sévères caractérisés par une dégénérescence neurofibrillaire accrue, la situation s'inverse : l'épitope AT8 se retrouve phosphorylé alors que la Ser262 ne l'est plus ce qui une nouvelle fois s'accorde avec le modèle *in vitro*. Pour finir, si l'on considère les stades intermédiaires, caractérisés notamment par la phosphorylation

de la Ser214 par PKA, le problème se complique. En effet, la phosphorylation de ce résidu est décrite comme inhibitrice de l'agrégation (Schneider et al., 1999) ce qui corrobore notre modèle. Sur la base de l'hypothèse d'une agrégation initiée par des interactions électrostatiques, on peut tout à fait imaginer qu'un 4<sup>ème</sup> site de phosphorylation en 214 vienne perturber ce mécanisme en interagissant localement avec les chaînes latérales des arginines au voisinage. Ceci étant dit, les patients atteints de la maladie à ces stades intermédiaires présentent tout de même des fibres intraneuronales en quantité non négligeable. On peut donc affirmer que le profil de phosphorylation déterminé *in vitro* permet, en considérant l'AT8 comme triplement phosphorylé, d'expliquer les cas extrêmes de la maladie mais soulève la question du rôle joué par les autres sites de phosphorylation notamment dans les stades intermédiaires.

Une partie de la réponse à cette question peut être apportée par les différentes observations en MET des fibres obtenues par l'agrégation *in vitro* des protéines Tau441-S262A et Tau441-AT8 phosphorylées par l'extrait de cerveau de rat. En effet, dans le premier cas, les fibres sont bien contrastées, les bords bien définis et on observe de nombreux *twists* (**figure 54-C**). En revanche, les fibres observées suite à l'agrégation de Tau441-AT8 ne sont pas si bien définies (**figure 55-B-C**), moins bien contrastée et ne présentent pas de *twists*. Ces observations permettent donc d'affirmer qu'en dépit du fait que l'épitope AT8 soit le moteur de l'agrégation, les autres sites de phosphorylation jouent clairement un rôle dans la morphologie des fibres obtenues.

Ceci nous amène à la morphologie des fibres obtenues *in vitro* par l'agrégation de Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat. A première vue, celles-ci semblent similaires aux PHFs isolées de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer : immunomarquage AT8-positif, implication du domaine de liaisons aux microtubules, notamment R2 et R3, dans le cœur des fibres entouré par le *fuzzy coat* (Crowther et al., 1989; Goedert et al., 1992). Néanmoins l'utilisation d'un anticorps dirigé anti-R2 lors des expériences d'immunomarquage de nos fibres *in vitro* a permis de mettre en évidence une réponse positive plus faible qu'avec l'anti-AT8 (**figure 63**). Ceci suggère donc une exposition « transitoire » du domaine R2 à la surface des fibres.



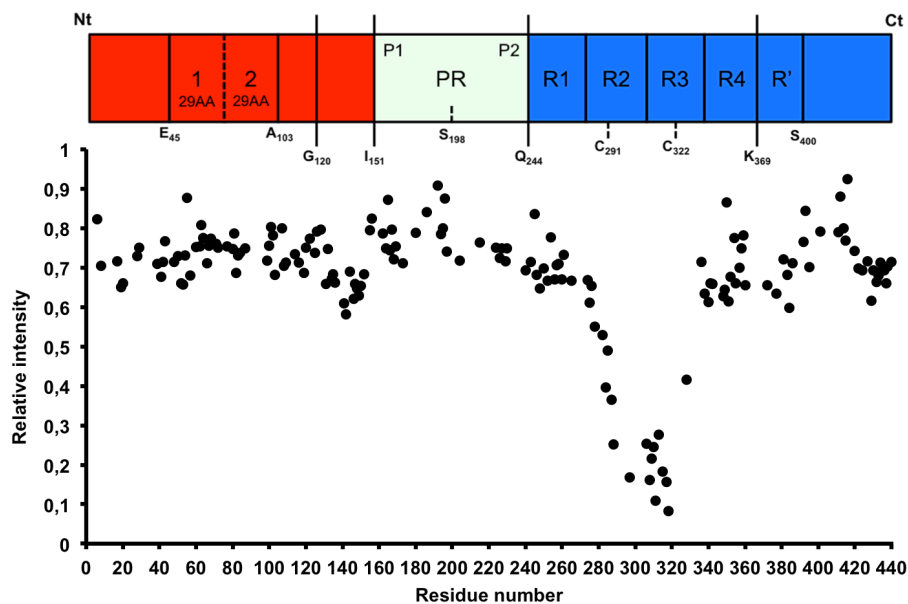
**Figure 63** : Observations en MET de fibres de Tau obtenues après agrégation de Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat et immuno-marquées par l'utilisation d'anticorps **anti-AT8** et **anti-R2**.

De plus, sur la base du modèle d'agrégation *in vitro* Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat, nous avons tenté d'identifier les régions de la protéine impliquées dans le cœur des fibres. Ces expériences ont été précédemment réalisées au laboratoire dans le modèle d'agrégation Tau/héparine (Sillen et al., 2005). Pour ce faire, nous avons enregistré un spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC juste après solubilisation de la protéine phosphorylée, incubé le tube à 37°C durant 7 jours et enregistré un nouveau spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. Nous avons ensuite sélectionné 200 résidus bien résolus et identifiés (pas de superpositions de signaux) permettant de balayer l'intégralité du spectre et déterminé le rapport des intensités avant/après agrégation. En effet, l'intensité du signal RMN est dépendante de la relaxation transversale  $T_2$  qui diminue avec la taille apparente de la molécule. Cette relaxation est liée, entre autres, aux interactions moléculaires et à la taille de la macromolécule : plus il y a d'interactions moléculaires, plus la relaxation  $T_2$  est rapide donc plus le signal est élargi et par conséquent d'intensité faible. Considérons le cas d'une protéine Tau monomérique : peu d'interactions moléculaires entre acides aminés donc un  $T_2$  long ce qui se traduit sur le spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC par des raies fines et intenses. En revanche, lors de l'agrégation de la protéine, les interactions moléculaires conduisent à une taille apparente plus grande des résidus impliqués. Ceux-ci présenteront donc un  $T_2$  raccourci et par conséquent un élargissement voire une disparition des corrélations sur le spectre HSQC.

L'analyse des données révèle une forte diminution d'intensité des résonances correspondantes au proton amide des résidus des domaines R2 et R3 de Tau. Ces résultats suggèrent donc l'implication de ceux-ci dans le cœur des fibres. En revanche, l'épitope AT8 ainsi que les résidus voisins ne semblent pas impliqués dans le cœur des fibres puisqu'aucune variation d'intensité significative n'y est détectée.



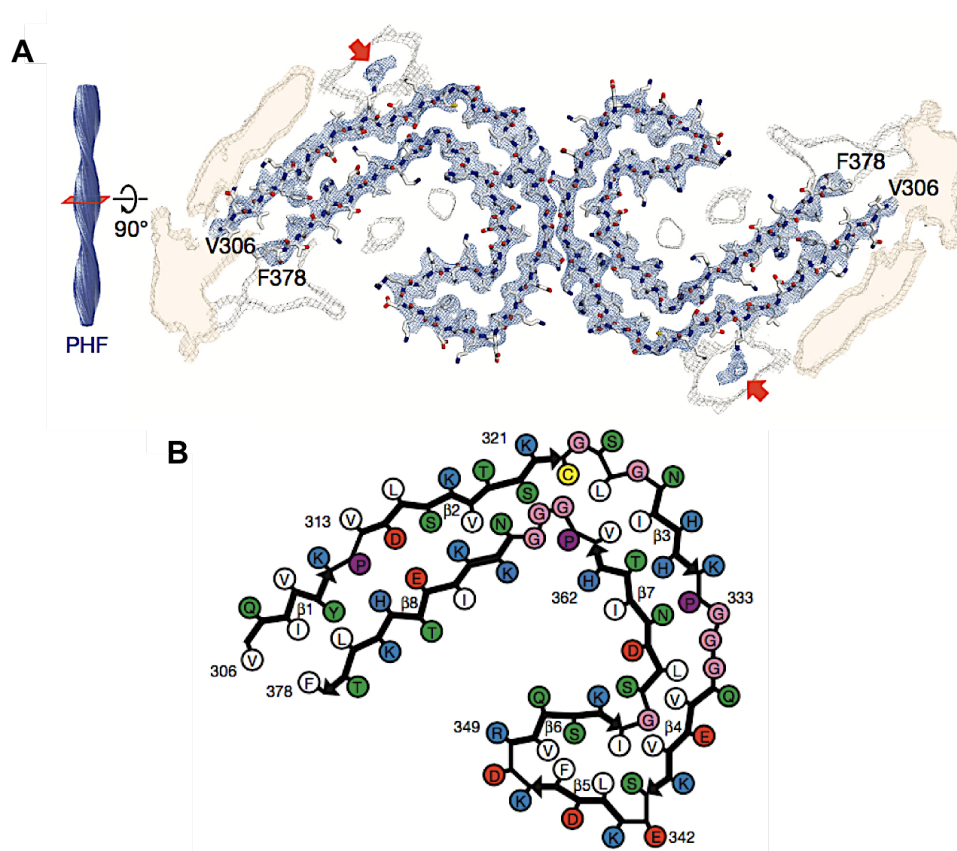
(**figure 64**). Ces résultats obtenus par RMN corroborent ceux obtenus par immuno-marquage à l'exception du domaine R2 qui est identifié comme impliqué dans le cœur des fibres alors que nous observons une réponse positive par l'immuno-marquage des fibres avec l'anticorps anti-R2 (**figure 63**). Néanmoins il faut souligner que ce marquage reste faible et rend donc ce résultat discutable : peut-on véritablement parler de réponse positive ? Est-ce une interaction non-spécifique ? On note que Dan et collaborateurs ont montré une diminution d'affinité de l'anticorps anti-R2 pour le domaine R2 suite à la désamidation de l'Asn279 ce qui pourrait éventuellement expliquer notre faible marquage.



**Figure 64** : Intensités relatives des résonances sur le spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC correspondantes aux 200 résidus, avant et après agrégation. *Relative intensity* =  $I(\text{après agrégation})/I(\text{avant agrégation})$ .

Mais récemment, l'analyse par cryo-microscopie électronique (cryo-ME) de PHFs isolés de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer a permis d'établir pour la première fois, la structure de ceux-ci avec une résolution égale à 3,4Å (Fitzpatrick et al., 2017). Comme attendu, les auteurs montrent que les PHFs sont formés par l'assemblage de deux protofilaments et caractérisés par la présence de deux régions distinctes : le *core* et le *fuzzy-coat* respectivement résistant et sensible à la pronase (Crowther, 1991). La grande nouveauté réside dans

l'identification des régions impliquées dans la formation du *core*. En effet, les auteurs démontrent que chaque protofilament est en fait porteur d'une région adoptant une conformation en forme de « C » qui entre dans la constitution du *core* des fibres. Celle-ci est caractérisée par la succession de huit brins- $\beta$  dont trois sont organisés en hélice  $\beta$  et s'étend des résidus Val306 à Phe378 qui correspondent aux domaines R3 et R4 de la protéine Tau. Ainsi le cœur des PHFs est en fait principalement composé des domaines R3 et R4 (**figure 65**).



**Figure 65** : Structure des PHFs isolés de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer résolue à 3,4 Å par cryo-ME. **A**-Coupe transversale de la structure des PHFs. **B**-Représentation schématique de la région du protofilament impliquée dans la formation du *core* des PHFs. Les flèches noires en gras représentent les brins- $\beta$  (Figure adaptée de (Fitzpatrick et al., 2017)).

L'utilisation du modèle d'agrégation *in vitro* Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat et l'analyse RMN de l'agrégation de celui-ci nous avait permis d'identifier les domaines R2 et R3 comme impliquées dans le cœur des fibres (**figure 64**). Or la structure par cryo-ME de PHFs isolés de cerveaux de patients

permet d'identifier les domaines R3 et R4. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette différence structurale. Tout d'abord la formation des PHFs *in vitro* repose uniquement sur l'incorporation de l'isoforme Tau2N4R hyperphosphorylée alors qu'au niveau cérébral sont retrouvées les six isoformes hyperphosphorylées de la protéine Tau (Goedert et al., 1992). De ce fait, il n'est pas à exclure que les PHFs extraits de cerveaux soient formés à partir de différentes isoformes, cette inhomogénéité étant responsable de la différence de structure observable par comparaison avec les PHFs obtenus *in vitro*. De plus, du point de vue cinétique, les fibres formées par l'agrégation *in vitro* de la protéine Tau441-S262 hyperphosphorylée par l'extrait de cerveau sont observées après cinq jours d'incubation à 37°C. Or la formation des PHFs *in vivo* observée chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer est un processus pouvant prendre plusieurs années. De ce fait, une cinétique trop rapide induirait la formation de fibres que nous pourrions qualifier d'immatures par opposition aux fibres dites matures observées dans la maladie. Pour finir, notre modèle d'agrégation *in vitro* repose uniquement sur l'hyperphosphorylation de la protéine mais il n'est pas à exclure que d'autres modifications post-traductionnelles jouent un rôle dans l'agrégation pathologique de Tau et seraient donc responsables d'une structure fibrillaire différente.

Quoiqu'il en soit, l'ensemble de nos résultats obtenus *in vitro* confirment le rôle essentiel de l'hyperphosphorylation dans le déclenchement de l'agrégation de la protéine Tau et propose l'épitope AT8 triplement phosphorylé comme moteur de l'agrégation. Ceci pose donc la question des kinases impliquées dans la phosphorylation pathologique mais surtout du potentiel candidat visant la Ser208. En effet, même si Tau est la cible de nombreuses kinases telles que GSK3 $\beta$ , MARK, PKA, CDK5, MAPK... peu d'entre elles ont prouvé leur potentielle implication dans la phosphorylation de la Ser208. La caséine kinase I a été proposée comme catalyseur de cette réaction de phosphorylation de l'épitope AT8 à la base du processus agrégatif (Hanger et al., 2009). On note que cette Ser208 a aussi été identifiée au laboratoire comme un site d'O-GlcNAcylation secondaire, ce qui relance la notion de dialogue et compétitions entre les modifications post-traductionnelles. En effet, quel que soit l'état de phosphorylation de la protéine, on peut imaginer que l'O-GlcNAcylation de la Ser208 induirait une inhibition de l'agrégation. Dans ces conditions, le déclenchement du processus pathologique serait donc induit par une

baisse d'O-GlcNAcylation de ce résidu, permettant l'action de la CK I et donc la phosphorylation de la Ser208. Du point de vue mécanistique, il serait ainsi envisageable d'étudier les conséquences de l'O-GlcNAcylation de la Ser208 sur la formation du tournant induit par la phosphorylation des deux résidus voisins, décrit selon notre hypothèse, comme protecteur.

Pour conclure, même si nous avons démontré que le moteur de l'agrégation se révèle être la triple phosphorylation de l'épitope AT8, nous ne pouvons pas exclure le rôle joué par d'autres modifications post-traductionnelles, notamment l'acétylation et l'O-GlcNAcylation dans le processus agrégatif. Sur la base des différentes voies de phosphorylation *in vitro* de Tau (extrait de cerveau ou kinases recombinantes), nous avons donc tenté de combiner phosphorylation/acétylation ainsi que phosphorylation/O-GlcNAcylation. La protéine Tau étant difficilement O-GlcNAcyllée par la voie enzymatique recombinante (OGT), nous avons opté pour une stratégie permettant de l'introduire de manière spécifique et quantitative.

Cette première partie a fait l'objet d'une publication dans *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* : Despres *et al*, *Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation* , PNAS, 2017 Aug 22 ; 114(34) : 9080-9085 (article retrouvé en annexe)

## **Partie 2 : Dialogue entre MPTs de la protéine Tau**



Même si la phosphorylation de la protéine Tau reste la modification post-traductionnelle la plus abondante, le rôle joué par les autres modifications, notamment l'acétylation et l'O-GlcNAcylation, n'est pas à exclure dans le processus pathologique. Alors que la première cible une vingtaine de lysines sur les 44 portées par l'isoforme 2N4R de la protéine, la Ser400 reste le site majeur d'O-GlcNAcylation sur les 85 Ser/Thr potentiellement glycosylables (Morris et al., 2015). Quoiqu'il en soit, les études portant sur l'implication de ces deux modifications post-traductionnelles dans le processus neurodégénératif lié à Tau restent relativement récentes.

Dans la maladie d'Alzheimer, l'acétylation de la protéine Tau est présente à tous les stades de la pathologie : il existe une corrélation positive entre le niveau d'acétylation et le degré de sévérité de la maladie (Min et al., 2010). Plusieurs études ont permis d'identifier par spectrométrie de masse et RMN une vingtaine de sites d'acétylation de la protéine, principalement localisés dans le domaine de liaison aux microtubules et induisant des perturbations de ses fonctions biologiques (Kamah et al., 2014; Min et al., 2010). Par exemple, Min et collaborateurs démontrent une accumulation de la protéine Tau acétylée par inhibition de sa dégradation, notamment des formes phosphorylées de la protéine (Min et al., 2010). De plus, il s'avère que l'acétylation des Lys280 et Lys281 inhibe la capacité de polymérisation des microtubules (Cohen et al., 2011; Trzeciakiewicz et al., 2017). Cette double acétylation induit une augmentation de la capacité d'agrégation de la protéine dans le modèle *in vitro* induit par l'héparine (Trzeciakiewicz et al., 2017). Mais l'implication de l'acétylation dans l'agrégation de la protéine Tau reste un sujet controversé. Par l'utilisation du modèle d'agrégation induit par l'héparine, certaines études lui attribuent un rôle promoteur de l'agrégation (Cohen et al., 2011) contrairement à d'autres qui proposent l'acétylation comme modification inhibitrice de l'agrégation (Cook et al., 2014b; Kamah et al., 2014). Même si à ce jour, le lien entre acétylation et pathologie n'est pas clairement établi, l'étude menée par Irwin et collaborateurs met en évidence par immuno-marquage la double modification de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer : acétylation et phosphorylation (Irwin et al., 2012). Sur la base du modèle d'agrégation développé dans la première partie du manuscrit, nous nous sommes donc penchés sur la question de l'interconnexion de ces deux modifications post-traductionnelles et de leurs conséquences sur l'agrégation.

Concernant l'O-GlcNAcylation, il existe à ce jour peu de données sur les conséquences fonctionnelles de cette modification. L'étude de l'O-GlcNAcylation *in vivo* de la protéine Tau a permis de mettre en évidence un unique site de modification : la Ser400 (Morris et al., 2015). En revanche, l'analyse par RMN de peptide de Tau modifiés *in vitro* par l'OGT a mis en évidence deux autres sites d'O-GlcNAcylation, la Ser208 et la Ser238, minoritaires par rapport à la Ser400 (Smet-Nocca et al., 2011). On remarque que ces sites se retrouvent au cœur de trois épitopes pathologiques : l'AT8, l'AT180 et le PHF1. En dépit du fait que l'O-GlcNAcylation de la Ser208 apparaisse comme un site minoritaire dans les conditions où il a été identifié, il ne doit pas pour autant être négligé. En effet, dans le contexte de l'agrégation déclenchée par la triple phosphorylation de l'épitope AT8, il pourrait tout à fait jouer un rôle inhibiteur, protecteur de l'agrégation. Nous nous sommes donc intéressés à ces deux sites d'O-GlcNAcylation et aux conséquences sur l'agrégation. Du fait de la complexité d'O-GlcNAcylation *in vitro* de Tau, nous avons opté pour une stratégie permettant d'introduire de manière qualitative et quantitative la modification souhaitée : l'EPL (*Expressed Protein Ligation*)

De manière générale, dans cette deuxième partie, nous avons tenté d'éclaircir la notion récente de dialogue entre modifications post-traductionnelles et les conséquences de celui-ci sur le processus d'agrégation de la protéine Tau. En raison du temps nécessaire à l'étude du lien entre phosphorylation et agrégation, les résultats présentés ici ne sont que préliminaires et les études seront poursuivies par la suite.

## I. Phosphorylation et acétylation

A ce jour, très peu d'études suggèrent une interconnexion entre phosphorylation et acétylation de la protéine Tau. En effet, même si ces deux modifications post-traductionnelles ont été recensées sur la protéine Tau isolée de cerveaux patients atteints par la maladie d'Alzheimer (Irwin et al., 2012), il apparaît difficile d'imaginer un dialogue phosphorylation/acétylation pour deux raisons : les résidus et les domaines ciblés sont différents. En effet, alors que la phosphorylation cible les Ser/Thr/Tyr du domaine riche en proline et de la partie C-terminale de la protéine, les lysines acétylées sont quasi-exclusivement retrouvées au sein du domaine de liaison aux microtubules (Morris et al., 2015). Néanmoins, on constate



que les 85 sites potentiels de phosphorylation ajoutés aux 44 lysines cibles de l'acétylation représentent 30% de la séquence en acides aminés de l'isoforme 2N4R ce qui en font donc les deux modifications post-traductionnelles les plus représentées. Récemment par l'utilisation d'un modèle de drosophiles transgéniques surexprimant la protéine Tau humaine K280Q (pseudo-acétylation) ou K280R (pseudo-désacétylation), Gorsky et collaborateurs montrent un lien entre phosphorylation et acétylation. Il semble que l'acétylation de la pseudo-acétylation de la Lys280 (K280Q) augmente la phosphorylation de la Ser262 par rapport au contrôle non acétylé. En revanche, la pseudo-désacétylation (K280R) entraîne une augmentation de la phosphorylation de l'épitope AT100 (pThr212/pSer214) (Gorsky et al., 2016). De plus, l'hypothèse formulée par Min et collaborateurs suggère l'acétylation comme modification antérieure à la phosphorylation conduisant à un défaut d'ubiquitination et à une accumulation de la protéine qui est par la suite phosphorylée (Min et al., 2010). Ces deux études suggèrent donc une interconnexion potentielle entre ces deux modifications majeures de la protéine Tau mais soulèvent aussi de nombreuses questions : quel lien existe-t-il entre phosphorylation, acétylation et agrégation ? Dans quelles mesures l'acétylation influence la phosphorylation de la protéine ? L'acétylation est-elle bien une modification antérieure à la phosphorylation ? Sinon la phosphorylation préalable de la protéine peut-elle influencer sur l'acétylation ?

Sur la base de ces interrogations, de nombreuses hypothèses peuvent être formulées, tant sur l'accumulation de la protéine Tau que sur l'inhibition de son activité MAP (*Microtubule Associated Protein*) ou sur son agrégation impliquées dans le processus neurodégénératif. Celles-ci seront discutées suite aux résultats préliminaires obtenus et présentés dans cette partie. Nous avons donc démarré l'étude du lien entre phosphorylation et acétylation par l'utilisation du fragment fonctionnel TauF8 [192-324] pour deux raisons :

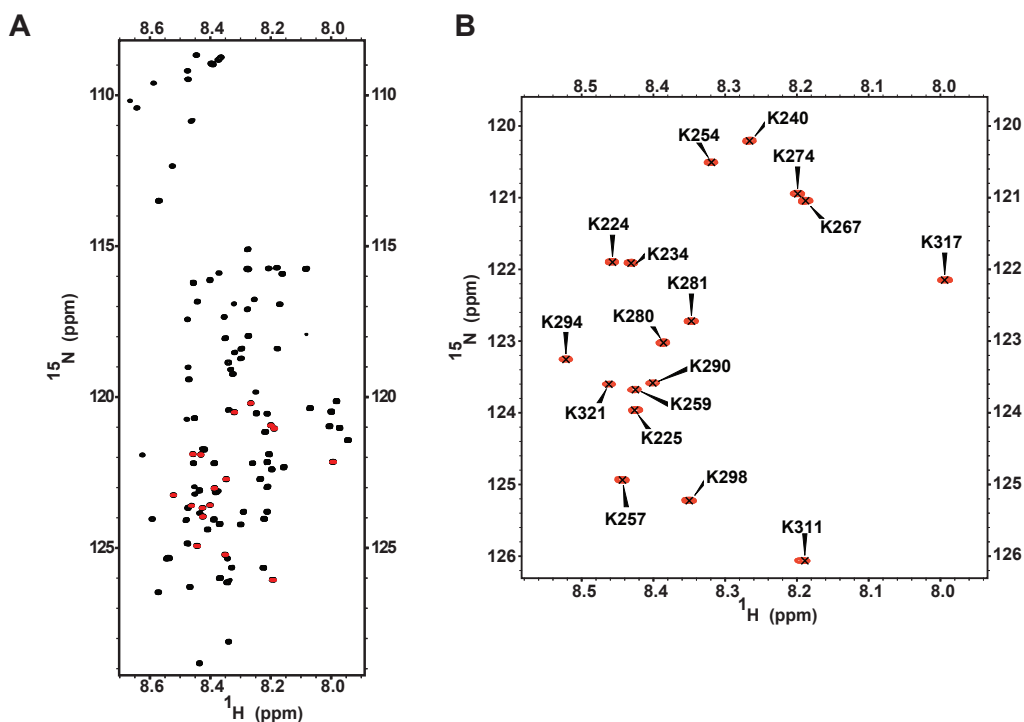
- L'utilisation d'un fragment simplifie l'analyse RMN et nous n'avons aucune idée des conséquences de la combinaison des modifications post-traductionnelles sur l'allure générale du spectre.
- Du fait des difficultés d'obtention des extraits de cerveaux de rats et donc de l'utilisation du modèle d'agrégation Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait, nous avons opté dans un premier temps

pour ce fragment phosphorylé par ERK2 qui avait démontré des propriétés d'agrégation à haute concentration (120 à 150µM).

## A. Stratégie d'étude

### i. Les différents marquages isotopiques du fragment TauF8

L'acétylation ciblant spécifiquement les résidus lysines de la protéine, nous avons décidé de marquer sélectivement  $^{15}\text{N}_2$  le fragment TauF8 sur les résidus lysines. Concrètement, cela permet l'obtention d'un spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC largement simplifié puisque seuls les résidus lysines seront détectés (**figure 66-A**) : on parle donc de « sous-spectre » de la protéine (17 lysines pour le fragment F8, 44 pour la Tau2N4R). Concernant l'attribution, celle-ci avait été réalisée au laboratoire par le Dr. Amina Kamah dans le cadre de l'étude du profil d'acétylation de la protéine Tau (Kamah et al., 2014). Nous avons néanmoins reconfirmé l'attribution par l'enregistrement d'expériences en trois dimensions type HNCOCACB et HNCACB sur un échantillon uniformément marqué  $^{13}\text{C}$  et doublement marqué sélectivement sur les lysines  $^{15}\text{N}_2/^{13}\text{C}$  (**figure 66-B**).



**Figure 66** : Intérêt du marquage spécifique des lysines du fragment TauF8 [192-324]. **A**- Superposition des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de TauF8 uniformément marqué  $^{15}\text{N}$  (noir) et sélectivement marqué sur les lysines  $^{15}\text{N}_2$  (rouge). **B**-Attribution des lysines du fragment TauF8 sur le spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC.

Dans le cadre de notre étude, le problème de ce type de marquage sélectif est la disparition des sites de phosphorylation (Ser/Thr) et donc l'impossibilité de vérifier de manière précise la phosphorylation. De ce fait, nous avons donc travaillé en parallèle sur une protéine uniformément marquée  $^{15}\text{N}$  notée afin de vérifier le profil de phosphorylation obtenu après incubation avec ERK2. L'attribution du fragment fonctionnel TauF8 avait été réalisée au début de ma thèse dans le cadre de l'étude du lien entre phosphorylation et agrégation.

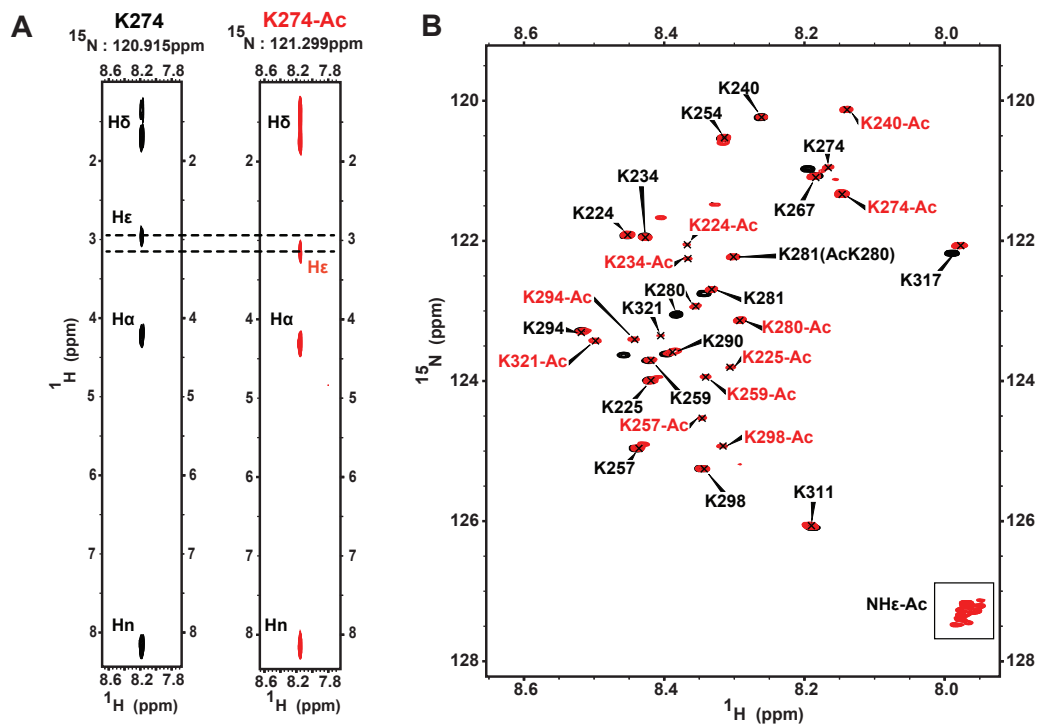
## ii. Introduction *in vitro* des MPTs par la voie recombinante

Les fragments TauF8 uniformément marqués  $^{15}\text{N}$  ou sélectivement sur les lysines  $^{15}\text{N}_2$  sont ensuite phosphorylés et acétylés *in vitro*, respectivement par ERK2 et par le fragment [1202-1848] de la protéine CBP porteur de l'activité acétyltransférase. Afin de pouvoir comparer l'intégralité des données, les lots de protéines et d'enzymes utilisées proviennent des mêmes cultures et les réactions sont lancées en parallèle. De façon à étudier l'impact de la phosphorylation sur l'acétylation et réciproquement, deux voies de modifications sont mises en place :

- **Phosphorylation par ERK2 puis acétylation par CBP** : les échantillons doublement modifiés générés permettent d'étudier les conséquences de la phosphorylation sur l'acétylation du fragment TauF8.
- **Acétylation par CBP puis phosphorylation par ERK2** : les échantillons doublement modifiés générés permettent d'étudier les conséquences de l'acétylation sur la phosphorylation du fragment TauF8.

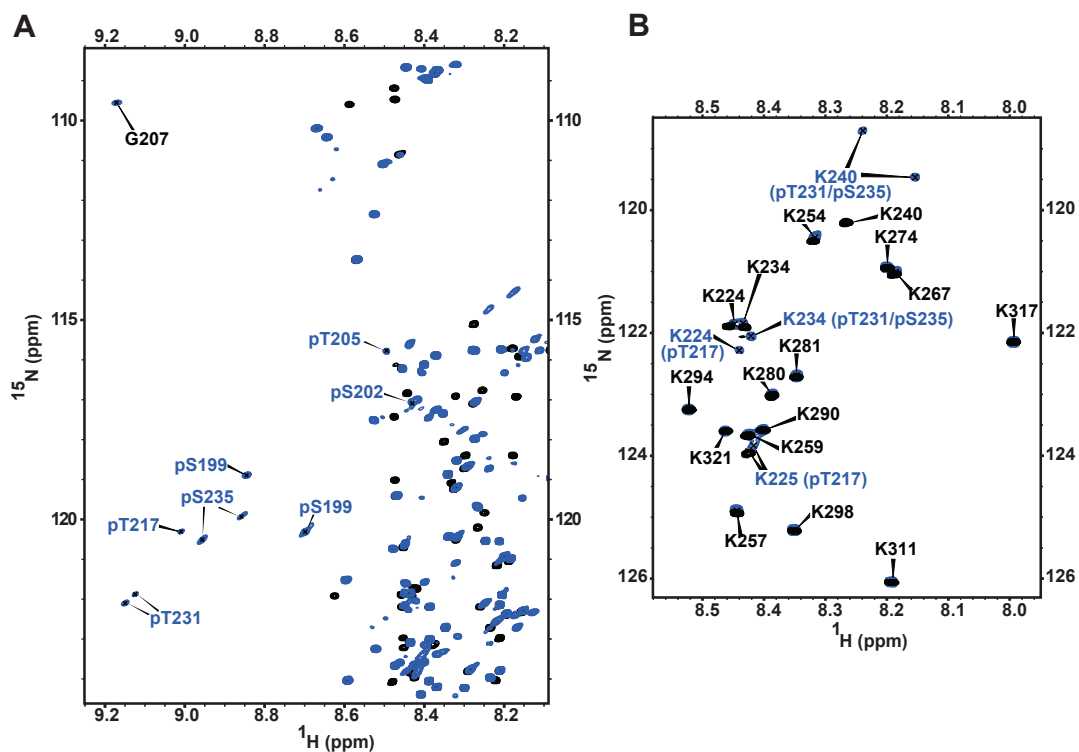
Une étape de purification chromatographique en phase inverse sur colonne C8 fait suite à chaque étape de modification afin d'éliminer les sous-produits de réactions tels que l'ADP, l'excès d'ATP, l'Acétyl-CoA ainsi que les fragments de dégradation. Les échantillons sont ensuite analysés par RMN afin de déterminer le taux d'acétylation et de phosphorylation respectivement grâce au marquage sélectif des résidus lysines et à l'enrichissement uniforme en  $^{15}\text{N}$ .

Concernant l'acétylation, nous nous sommes basés sur la caractérisation du profil d'acétylation par CBP de Tau2N4R publiée par le Dr. Amina Kamah (Kamah et al., 2014) pour attribuer le fragment TauF8 acétylée (**figure 67**). A la différence de la phosphorylation, l'acétylation des lysines n'entraîne pas de perturbations significatives du déplacement chimique des protons amides des résidus ciblés. Afin de confirmer l'acétylation de notre échantillon contrôle, nous avons enregistré des expériences en trois dimensions  $^1\text{H}^{15}\text{N}$  HSQC-TOCSY permettant d'identifier les protons portés par la chaîne latérale des lysines et donc de valider l'acétylation d'un résidu. En effet, il s'avère que le déplacement chimique du  $\text{H}\epsilon$  de la chaîne latérale est sensible à l'acétylation : celle-ci entraîne une variation du déplacement chimique du  $\text{H}\epsilon$  de 2,95 ppm à 3,10 ppm (**figure 67-A**). Ainsi, grâce à ce type d'expérience nous avons confirmé l'acétylation des lysines et ainsi déterminer le niveau de modification de chaque résidu sur le spectre  $^1\text{H}^{15}\text{N}$  HSQC par le rapport des intensités  $R=I(\text{Lys-Acétylée})/[I(\text{Lys-non-Acétylée})+I(\text{Lys-Acétylée})]$ .



**Figure 67** : Attribution du fragment TauF8 acétylée par CBP. **A**-Strips correspondant aux résidus K274 natif (noir) ou acétylé (rouge) extraites du  $^1\text{H}^{15}\text{N}$  HSQC-TOCSY. L'acétylation de la lysine 274 se traduit par un shift du déplacement chimique de 0,2 ppm du  $\text{H}\epsilon$  porté par la chaîne latérale de la lysine. **B**-Superposition des spectres  $^1\text{H}^{15}\text{N}$  HSQC de TauF8 sélectivement marqué sur les lysines  $^{15}\text{N}_2$  natif (noir) ou acétylé (rouge). La détermination du niveau d'acétylation par résidu est permise par l'établissement du rapport des intensités  $R=I(\text{Lys-Ac})/[I(\text{Lys-Ac})+I(\text{Lys-nonAc})]$ .

Concernant la version phosphorylée par ERK2 du fragment TauF8 spécifiquement marqué sur les résidus lysines  $^{15}\text{N}_2$ , une ré-attribution de la protéine a été nécessaire. En effet, certaines lysines (Lys224, Lys225, Lys234, Lys240) étant à proximité de sites de phosphorylation (Ser199, Ser202, Thr205, Thr217, Thr231, Ser235), une variation de déplacement chimique du proton amide de ces résidus est observable après phosphorylation (**figure 68**), ce qui est donc une preuve du bon déroulement de la phosphorylation. Cependant, la quantification du taux de phosphorylation nécessite un échantillon uniformément marqué  $^{15}\text{N}$  et celle-ci est déterminée, tout comme l'acétylation par la relation  $R=I(\text{Ser/Thr-P})/[I(\text{Ser/Thr-P})+I(\text{Ser/Thr-non-P})]$ .

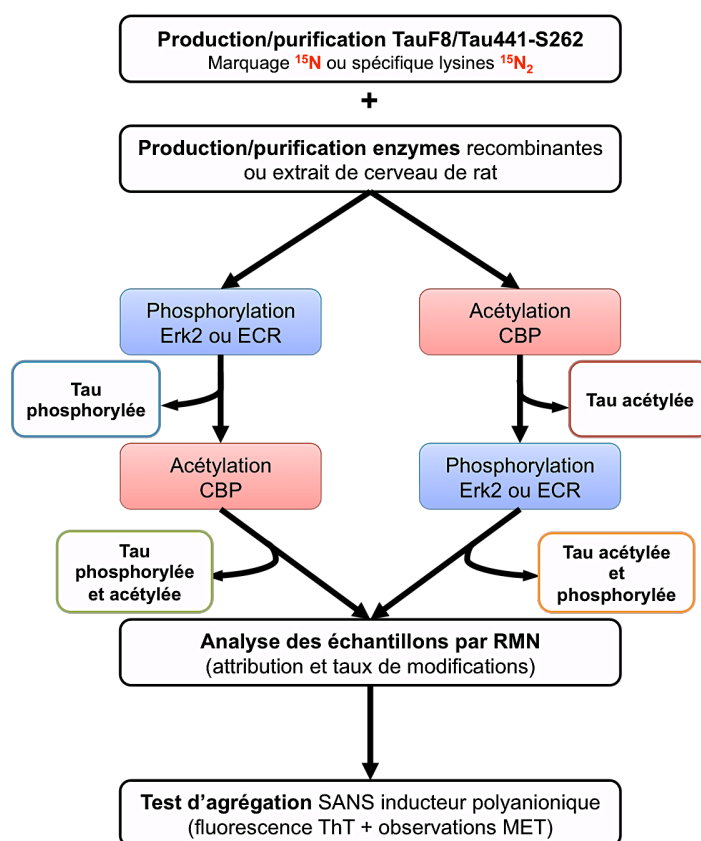


**Figure 68** : Attribution du fragment TauF8 phosphorylé par ERK2. **A**-Superposition d'une partie des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de TauF8 uniformément enrichi  $^{15}\text{N}$  **natif (noir)** et **phosphorylé par ERK2 (bleu)**. On constate la variation de déplacement chimique des protons amides des résidus phosphorylés ainsi que celui de la Gly207 caractéristique de la double phosphorylation pS202/pT205. De plus, le dédoublement des résonances pThr231 et pSer235 suggère une phosphorylation incomplète de ces résidus. **B**-Superposition des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de TauF8 sélectivement marqué sur les lysines  $^{15}\text{N}_2$  **natif (noir)** ou **phosphorylé par ERK2 (bleu)**. On constate la variation de déplacement chimique des protons amides des lysines à proximité des sites de phosphorylation.

### iii. Bilan : stratégie d'étude globale mise en place

Pour finir, suite à l'introduction des différentes modifications post-traductionnelles par l'utilisation d'enzymes recombinantes et à l'analyse du profil d'acétylation et/ou phosphorylation par RMN, les échantillons sont mis à agréger durant 4 jours à 37°C sans inducteur polyanionique. La cinétique d'agrégation est alors suivie par fluorescence de la thioflavine T à 490nm et la présence de fibres confirmée par observations en MET.

La stratégie globale mise en place pour l'étude du dialogue entre phosphorylation et acétylation est résumée dans le schéma ci-dessous (**figure 69**). D'ores et déjà, on note que celle-ci sera appliquée dans la suite de l'étude au modèle Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat et acétylée par CBP.

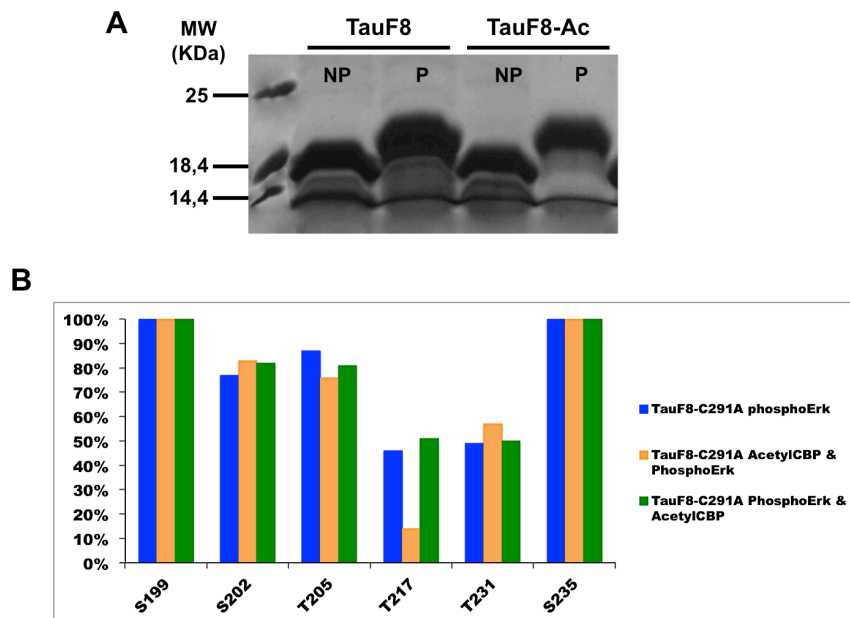


**Figure 69** : Stratégie mise en place pour caractériser le lien entre phosphorylation, acétylation et agrégation. ECR : extrait de cerveau de rat ; CBP : *CREB-binding protein*.

## B. Séquence des réactions et conséquences sur l'agrégation

### i. Analyse du profil de phosphorylation en fonction de la séquence des réactions

L'analyse du profil de phosphorylation nécessite l'utilisation du fragment TauF8 uniformément enrichi  $^{15}\text{N}$ . Ainsi, celui-ci a été soumis aux différentes séquences réactionnelles : phosphorylation seule, phosphorylation puis acétylation et surtout acétylation puis phosphorylation. On note que la réaction d'acétylation est réalisée en parallèle sur un échantillon spécifiquement marqué sur les lysines ce qui permet de contrôler indirectement le niveau d'acétylation de l'échantillon  $^{15}\text{N}$  qui subira la phosphorylation.



**Figure 70** : Quantification du niveau de phosphorylation des différents échantillons TauF8 marqués  $^{15}\text{N}$ . **A**-SDS-PAGE (12%) de TauF8 et TauF8 acétylé par CBP (TauF8-Ac) avant et après phosphorylation par ERK2. On constate un retard de migration après phosphorylation des deux échantillons (NP : non-phosphorylé, P : phosphorylé). **B**-Détermination du niveau de phosphorylation des différents sites cibles de ERK2. Peu de variations sont observées. Seule la phosphorylation de la Thr217 semble impactée par l'acétylation préalable de l'échantillon.

L'analyse par électrophorèse SDS-PAGE des différents échantillons générés met en évidence un retard de migration pour chaque échantillon synonyme de phosphorylation : à première vue, l'échantillon préalablement acétylé semble phosphorylé (**figure 70-A**). Par RMN, les niveaux de phosphorylation de chaque

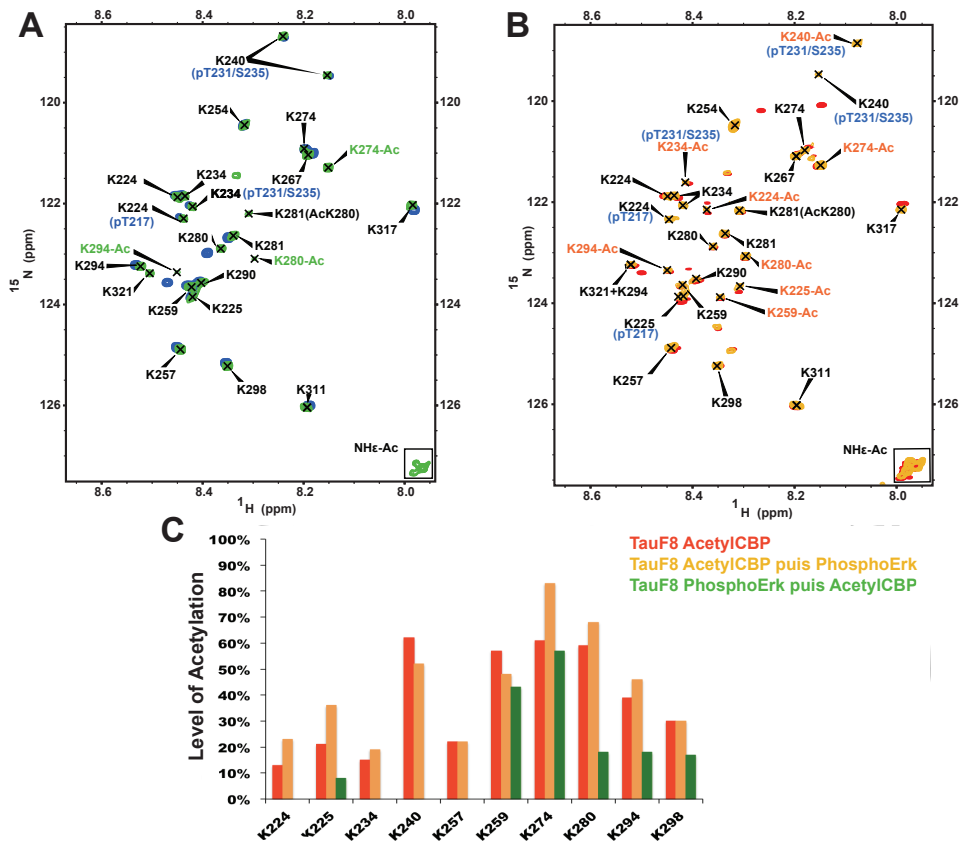
échantillon ont été déterminés selon la relation présentée précédemment, basée sur l'utilisation des valeurs d'intensité des résonances des protons amides correspondants aux formes phosphorylées ou non du résidu considéré obtenues à partir du  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. Peu de variations sont observées entre les différents échantillons. Seule la phosphorylation de la Thr217 semble impactée par l'acétylation préalable de l'échantillon (**figure 70-B**). Cette diminution reste assez difficile à expliquer car l'hypothèse selon laquelle l'acétylation des lysines voisines, Lys224 et Lys225, diminuerait la phosphorylation n'est pas vérifiée dans le cas des résidus pThr231 et pSer235.

A la vue de ces résultats, on peut affirmer que globalement l'acétylation ne perturbe pas la phosphorylation du fragment TauF8. Dans le contexte de l'agrégation basé sur la phosphorylation, on peut donc supposer que les propriétés d'agrégation du fragment TauF8 phosphorylé ne seront pas impactées sauf si l'acétylation a aussi un effet intrinsèque sur l'agrégation, en plus de la phosphorylation.

## ii. Analyse du profil d'acétylation en fonction de la séquence des réactions

Concernant l'analyse du profil d'acétylation, le fragment TauF8 spécifiquement marqué sur les lysines  $^{15}\text{N}_2$  a été utilisé. De façon identique à la phosphorylation, celui-ci a été soumis aux différentes séquences réactionnelles : acétylation seule, acétylation puis phosphorylation et inversement, cette dernière séquence de réaction permettant d'établir les conséquences de la phosphorylation sur l'acétylation. Même si une variation de déplacement chimique du proton amide est observé pour les lysines à proximité des sites de phosphorylation, on souligne que le profil de phosphorylation est vérifié en parallèle sur le fragment TauF8 uniformément marqué  $^{15}\text{N}$ . Les différents échantillons ont une nouvelle fois été analysés par RMN et le niveau d'acétylation déterminé à partir du  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC suivant la formule précédemment exposée. D'emblée, par comparaison des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC des échantillons acétylé, acétylé puis phosphorylé, et phosphorylé puis acétylé, on constate une disparition de certaines lysines acétylées lorsque l'échantillon est préalablement phosphorylé (**figure 71**).



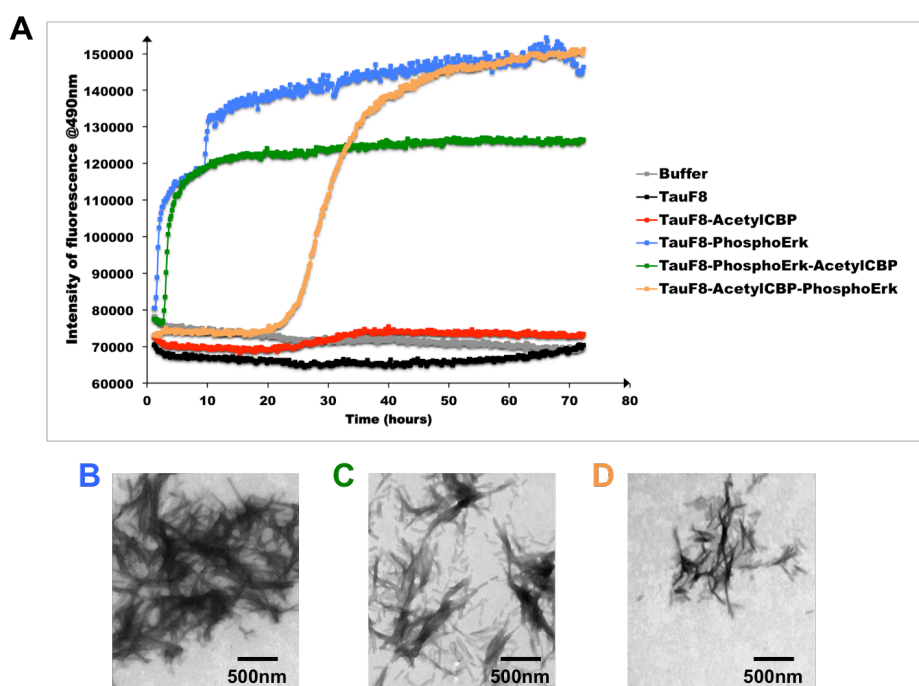


**Figure 71** : La phosphorylation préalable du fragment TauF8 entraîne une diminution de l'acétylation. **A-B**-Superposition des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC du fragment TauF8 spécifiquement marqué sur les lysines  $^{15}\text{N}_2$  **phosphorylé** et **phosphorylé puis acétylé** et des spectres HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  du fragment TauF8 spécifiquement marqué sur les lysines  $^{15}\text{N}_2$  **acétylé** et **acétylé puis phosphorylé**. **C**-Niveau d'acétylation des différentes lysines cibles de CBP.

Ceci est confirmé par quantification des niveaux d'acétylation de chaque échantillon : la phosphorylation préalable induit une diminution d'acétylation globale. Seules les Lys259 et Lys274 semblent moins impactées (**figure 71-C**). Plus précisément, on constate une absence quasi totale d'acétylation des résidus Lys224/Lys225/Lys234 et Lys240 qui peut s'expliquer par la présence des sites de phosphorylation aux alentours ( $p\text{Thr}231$ - $p\text{Ser}235$ ) qui empêchent le fragment de la CBP d'agir. En revanche, comme il n'y a pas de sites de phosphorylation dans leur voisinage, la diminution d'acétylation des Lys257, Lys280, Lys294 et Lys298 peut s'expliquer par un effet longue distance de la phosphorylation sur l'acétylation.

### iii. Agrégation des différents échantillons générés

Afin d'établir un lien entre profil de modifications et agrégation, la capacité d'agrégation des différents échantillons générés a été testée (**figure 72**). On note que le test d'agrégation a été mené pour une concentration protéique égale à 120 $\mu$ M, sans inducteur polyanionique et dans les conditions de tampon, pH et température similaires à celles utilisées dans le modèle d'agrégation Tau phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat.



**Figure 72 :** A-Agrégation sans inducteur polyanionique de TauF8 phosphorylé et/ou acétylé suivie par fluorescence de la ThT. B-C-D- Observations en MET confirmant la présence de fibres après agrégation des échantillons phosphorylés, quelque soit le niveau d'acétylation.

On constate une agrégation massive de TauF8 uniquement phosphorylé. En revanche, l'acétylation seule ne déclenche pas l'agrégation. Concernant les échantillons doublement modifiés, quelle que soit la séquence des réactions de modifications, les échantillons agrègent, dans des proportions moins importantes que TauF8 phosphorylé mais de façon générale on peut affirmer que les échantillons phosphorylés agrègent quel que soit le niveau d'acétylation. Si l'on se réfère à l'analyse par RMN du niveau de modification, les échantillons phosphorylés et acétylés ou acétylés puis phosphorylés présentent des niveaux de phosphorylation

similaires. En revanche, du point de vue de l'acétylation, la phosphorylation préalable de l'échantillon induit une diminution drastique du niveau d'acétylation. Or on constate que l'échantillon acétylé puis phosphorylé agrège plus tardivement que son homologue inversement modifié. Ceci suggère donc un rôle inhibiteur de l'acétylation, qui n'est pas observé dans le cas où la phosphorylation précède l'acétylation puisque le niveau global d'acétylation est diminué.

### **C. Conclusions, discussions et perspectives**

Par l'utilisation du modèle TauF8 phosphorylé par ERK2 et/ou acétylé par un fragment de la protéine CBP porteur de l'activité acétyl-transférase, nous avons démontré l'existence d'un dialogue entre phosphorylation et acétylation. En effet, alors que l'acétylation ne semble pas perturber la phosphorylation de la protéine, la réciproque n'est pas vraie : la phosphorylation préalable de la protéine perturbe très largement le profil d'acétylation. Si l'on replace ces observations dans le contexte de la maladie dans lequel le degré de sévérité est directement corrélé au taux d'acétylation accrue (Irwin et al., 2012; Min et al., 2010) et au profil de phosphorylation (Augustinack et al., 2002), nos résultats suggèrent donc que l'acétylation soit antérieure à la phosphorylation. Cette hypothèse avait déjà été posée par Min et collaborateurs qui proposent comme l'étape précurseur de la maladie l'accumulation de la protéine Tau par l'inhibition de l'ubiquitination induite par l'acétylation (Min et al., 2010).

Plus précisément, si l'on considère l'agrégation pathologique de la protéine Tau, nous avons montré précédemment que celle-ci repose en grande partie sur la triple phosphorylation de l'épitope AT8. Ici nous montrons que, ni la séquence réactionnelle, ni le niveau d'acétylation ne perturbent la phosphorylation. En revanche, du point de vue fonctionnel, l'acétylation préalable de notre modèle phosphorylé ralentit l'agrégation et suggère donc un potentiel rôle inhibiteur de l'acétylation, démontré auparavant par l'utilisation du modèle d'agrégation induit par l'héparine (Cohen et al., 2011; Kamah et al., 2014). Deux hypothèses peuvent être formulées concernant le ralentissement de l'agrégation observé dans notre modèle :

- Von Bergen et collaborateurs ont montré que l'agrégation reposait, entre autre, sur deux hexapeptides, les PHF6 [<sup>306</sup>VQIVYK<sup>311</sup>] et

PHF6\* [<sup>275</sup>VQIINK<sup>280</sup>] capables d'agréger spontanément par interactions anti-parallèles (von Bergen et al., 2000). Or dans notre modèle doublement modifié, on constate que la Lys280 est acétylé à 70% lorsque l'échantillon est acétylé avant d'être phosphorylé contre 20% dans le cas inverse. Cette acétylation pourrait donc perturber l'interaction entre les hexapeptides et donc par conséquent ralentir l'agrégation. L'agrégation observée en fluorescence et confirmée en MET correspondrait donc à la fraction non acétylée sur la Lys280 de l'échantillon.

- Cook et collaborateurs ont démontré l'implication du dialogue acétylation/phosphorylation dans la modification des motifs KXGS (X = I ou C). En effet, ils montrent que ces motifs sont retrouvés hypoacétylés et hyperphosphorylés chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer et proposent l'acétylation des motifs KXGS comme protecteur de l'agrégation (Cook et al., 2014b). Or dans notre modèle, la Lys259 est significativement acétylée par CBP et que la séquence réactionnelle n'induit pas de perturbation significative de cette modification. Mais l'acétylation de cette lysine serait à corrélérer avec la phosphorylation de la Ser262 décrite comme inhibitrice de l'agrégation (Schneider et al., 1999) dans le modèle Tau441 phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat.

Cette seconde hypothèse soulève la question du rôle joué par le dialogue entre phosphorylation et acétylation dans la modulation de l'activité MAP de la protéine Tau. En effet, les motifs KXGS étant essentiels pour l'interaction et la stabilisation des microtubules (Cook et al., 2014b), il serait intéressant de tester la capacité de polymérisation et stabilisation des microtubules de nos modèles doublement modifiés et d'étendre l'ensemble de cette étude au modèle Tau2N4R phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat et acétylée par CBP. Ces expériences sont en cours et nous envisageons de tester l'activité acétyl-transférase de l'extrait de cerveau de rat en favorisant l'acétylation de la protéine Tau par inhibition des désacétylases.

## II. Phosphorylation et O-GlcNAcylation

Alors que la phosphorylation reste la modification post-traductionnelle de la protéine Tau la plus répandue et la plus étudiée ciblant potentiellement 85 sites, l'O-GlcNAcylation de celle-ci n'a été identifiée que très récemment et retrouvée majoritairement sur la Ser400 (Morris et al., 2015). Or il s'avère que ce résidu est aussi retrouvé phosphorylé au niveau de l'épitope PHF-1 caractéristique de la maladie d'Alzheimer (Augustinack et al., 2002), ce qui illustre la notion de compétition entre ces deux modifications. Toujours au niveau de l'épitope PHF-1 Smet-Nocca et collaborateurs ont montré que l'O-GlcNAcylation de la Ser400 entraîne une diminution de la phosphorylation des résidus Ser396 et Ser404 et inversement (Smet-Nocca et al., 2011). Au cours de cette étude, les auteurs ont aussi prouvé l'existence d'un site d'O-GlcNAcylation minoritaire, la Ser208, ce qui nous amène à transposer l'étude réalisée sur le PHF-1 à l'épitope AT8 nouvellement redéfini comme la triple phosphorylation Ser202/Thr205/Ser208. Du point de vue fonctionnel, très peu d'études abordent le rôle de l'O-GlcNAcylation dans l'agrégation pathologique de la protéine Tau contrairement à la phosphorylation qui se pose en moteur de l'agrégation. Ainsi, nous avons tenté d'étudier les conséquences du dialogue O-GlcNAcylation/phosphorylation des épitopes PHF-1 et AT8 sur l'agrégation de la protéine Tau.

Du point de vue expérimental, l'O-GlcNAcylation *in vitro* de la protéine Tau étant laborieuse, nous avons opté pour une stratégie permettant d'introduire spécifiquement et quantitativement les modifications post-traductionnelles : l'EPL (*Expressed Protein Ligation*). Ainsi, grâce à la collaboration avec l'équipe du Pr. Christian Hackenberger (FMP-Berlin, Allemagne) et aux différents séjours passés au sein de son laboratoire, nous avons pu générer différents peptides et protéines Tau spécifiquement modifiés par phosphorylation et/ou O-GlcNAcylation, au niveau des deux épitopes d'intérêt. Dans cette partie seront présentés la stratégie globale mise en place ainsi que les différents résultats obtenus.

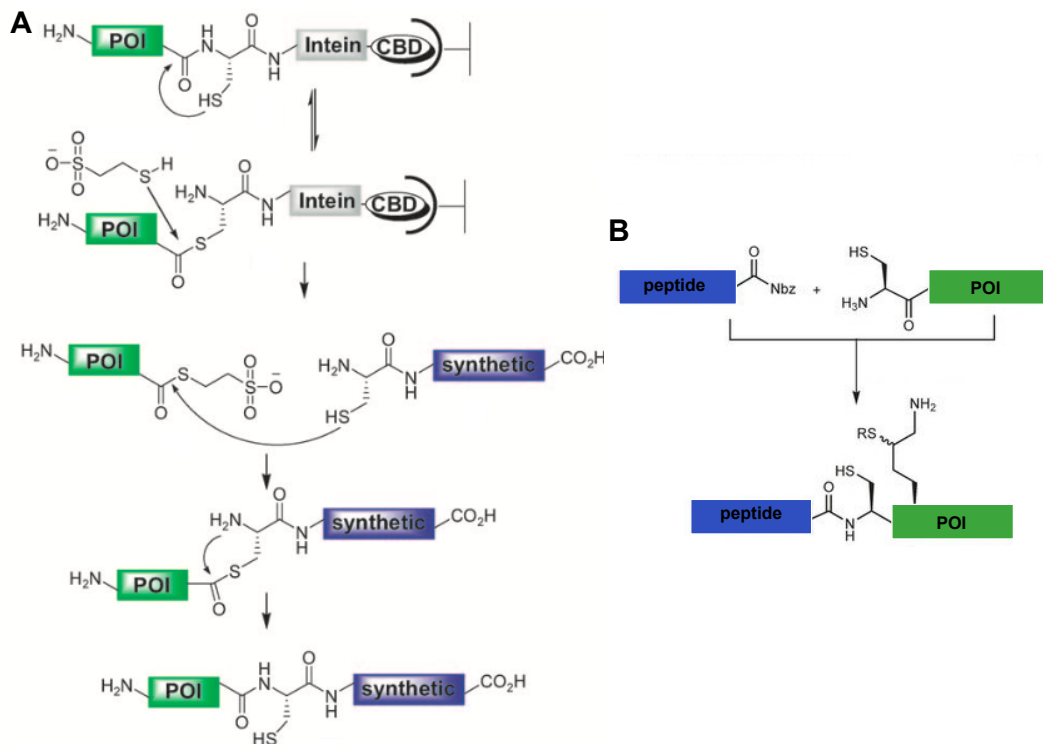
## A. Stratégie de l'EPL : *Expressed Protein Ligation*

### i. Généralités

Décrite pour la première fois à la fin des années 1990, l'EPL (*Expressed Protein Ligation*) est une méthode de production de protéines semisynthétiques impliquant l'addition chimiosélective d'un peptide sur une protéine produite par voie recombinante. Dans notre cas, le peptide synthétisé correspond à l'épitope pathologique (AT8 ou PHF-1), porteur des différentes combinaisons de modifications post-traductionnelles, qui sera lié au reste de la protéine Tau produite par la voie recombinante. Dans le cas de l'épitope PHF-1, l'étape de ligation entre les deux partenaires est permise par la réaction d'une fonction thioester en C-terminale de la protéine avec la cystéine N-terminale du peptide synthétisé : on parle de ligation C-terminale, la partie synthétique étant greffée en C-terminale de la protéine (**figure 73-A**) (Muir et al., 1998). De ce fait, quelle que soit la séquence, le peptide de synthèse doit impérativement être porteur d'une cystéine en position N-terminale. Concernant la fonction thioester située en position C-terminale de la partie recombinante, celle-ci est générée grâce au « réarrangement intéine » : l'addition d'un groupement thiol (acide 2-mercaptoethanesulfonique) entraîne une réaction de transestérification avec l'intéine et génère donc un  $\alpha$ -thioester réactif en N-terminale de la protéine recombinante (**figure 73-A**).

Concernant l'épitope AT8, une autre stratégie de ligation a été mise en place. En effet, par opposition à la ligation C-terminale mise en place pour la synthèse d'une protéine Tau porteuse de l'épitope PHF-1, une stratégie de ligation N-terminale a été utilisée pour générer un fragment TauF8 porteur de l'épitope AT8. Dans ce cas, le peptide de synthèse est lié en N-terminale de la partie protéique recombinante (**figure 73-B**). Celle-ci est alors porteuse de la cystéine qui réagira avec le groupement fonctionnel Dbz (acide 3,4 diaminobenzoïque) porté par la partie C-terminale du peptide. Nous pouvons donc résumer les deux stratégies mises en place de la manière suivante :

- **Epitope PHF1** : protéine recombinante-thioester + Cys-peptide
- **Epitope AT8** : peptide-Dbz + Cys-protéine recombinante



**Figure 73** : Représentation schématique des deux stratégies de l'EPL mises en place pour étudier le lien entre phosphorylation et O-GlcNAcylation. **A**-Stratégie de ligation C-terminale utilisée pour la synthèse de la protéine Tau porteuse de l'épitope PHF-1 modifié (Hackenberger and Schwarzer, 2008). **B**-Stratégie de ligation N-terminale utilisée pour générer le fragment TauF8 porteur de l'épitope AT8 modifié (figure adaptée de (Bondalapati et al., 2016)). POI : *protein of interest*, partie protéique recombinante.

## ii. Synthèse des peptides en phase solide

De manière générale, la synthèse peptidique en phase solide consiste en la synthèse d'un peptide du Ct vers le Nt, la partie C-terminale étant liée à une résine solide. Durant mes différents séjours à Berlin au sein du groupe du Pr. Christian Hackenberger (financement PHC Procopé/DAAD, 2015-2016), j'ai eu l'occasion de réaliser plusieurs synthèses peptidiques, avec l'aide du Dr Oliver Reimann et Kristina Siebertz, étudiante en thèse.

La stratégie suivie est celle décrite en 1986 par Bruce Merrifield et peut être résumée en 4 étapes. La stratégie de synthèse choisie est la stratégie Fmoc :

- 1) La partie Ct du premier acide aminé (Ct du peptide à synthétiser, nommé acide aminé *n*) est reliée à la résine *via* un groupement réactif acido-labile (Rink Amide AM Resin 100-200 mesh, 0,73mmol/g, NOVABIOCHEM). Ainsi, par l'utilisation de

groupements protecteurs orthogonaux, la liaison entre le groupement réactif de la résine et l'acide aminé  $n$  est clivée dans des conditions acides tandis que la partie N-terminale est protégée par le groupement Fmoc, labile en milieu basique.

- 2) La protection Fmoc en Nt de l'acide aminé  $n$  est retirée par traitement basique (20% pipéridine dans DMF, 30 minutes, température ambiante)
- 3) La partie Ct de l'acide aminé suivant ( $n-1$ ) est activée (HOBt/HBTU, 10 équivalents dans DMF). De plus l'ajout de DIPEA (20 équivalents) permet d'activer la fonction amine (acide aminé  $n$ ) par élimination du groupement Fmoc) : substitution nucléophile de la fonction acide activée par la fonction amine de l'acide aminé en bout de chaîne greffé sur la résine et création de la liaison amide entre le Nt de l'AA $n$  et le Ct de AA $n-1$ . Après formation de la liaison peptidique, une étape d'acétylation des sites réactifs libres de la résine est nécessaire : c'est l'étape de *capping* (anhydride acétique 10%, DIPEA 10%, DMF). Suite à cela, les réactions de déprotection du Nt (2), activation du Ct et couplage (3) sont répétées jusqu'à l'obtention du peptide souhaité.
- 4) L'étape finale consiste en un clivage acide (TFA/TIS/DTT/thioanisol 95:2:2:1) du lien entre le peptide synthétisé et la résine libérant une fonction amide C-terminale. Ce clivage acide permet aussi la coupure simultanée des groupements protecteurs des chaînes latérales (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH). En effet, ces protections orthogonales (stables dans les conditions de déprotection du groupement Fmoc) ne sont pas stables en conditions acides. Dans le **tableau 6** sont résumés les principaux groupements protecteurs des chaînes latérales.



Chaines latérales	Groupe protecteur
Hydroxyles –OH	<i>tert</i> -butylether
Thiols –SH	Trityle
Amines –NH <sub>2</sub>	<i>tert</i> -butoxycarbonyle (Boc)
Acides –COOH	<i>tert</i> -butylester

**Tableau 6** : Principales protections orthogonales stables dans les conditions de déprotection du groupement Fmoc. On précise que la déprotection finale du peptide est permise par traitement acide.

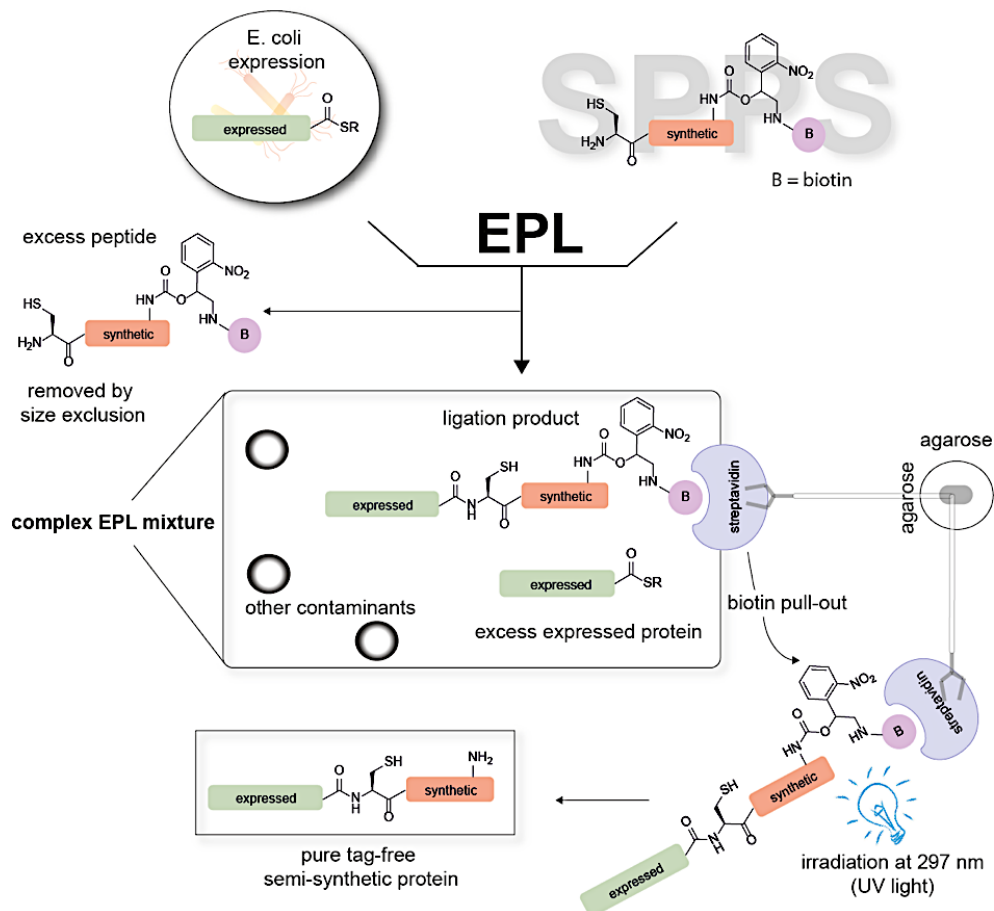
Cette synthèse en phase solide peut être réalisée manuellement ou automatisée par l'utilisation du système *Activo-P11 automated peptide synthesizer*, *Activotec*.

## B. Modifications de deux épitopes pathologiques : AT8 & PHF-1

### i. L'épitope PHF-1

#### a. Stratégie

Lors de mon déplacement en Allemagne au sein du groupe du Pr. Christian Hackenberger (FMP-Berlin), j'ai réalisé avec l'aide du Dr. Oliver Reimann l'ensemble des réactions de synthèses peptidiques et de ligations chimiques permettant d'aboutir à la synthèse d'une protéine Tau(1-441) porteuse de modifications post-traductionnelles spécifiques en C-terminal : une protéine triplement phosphorylée en positions 396-400-404 et une protéine O-GlcNAcylée en position 400. La stratégie globale de l'EPL mise en place reste celle décrite précédemment : l'expression de la protéine recombinante Tau tronquée en Ct, Tau[1-389], qui est liée au peptide synthétisé correspondant à la partie manquante de la protéine recombinante et porteur des différentes modifications post-traductionnelles (**figure 74**). On note néanmoins quelques modifications apportées afin d'optimiser les étapes de purification de la protéine recombinante et du produit de ligation.

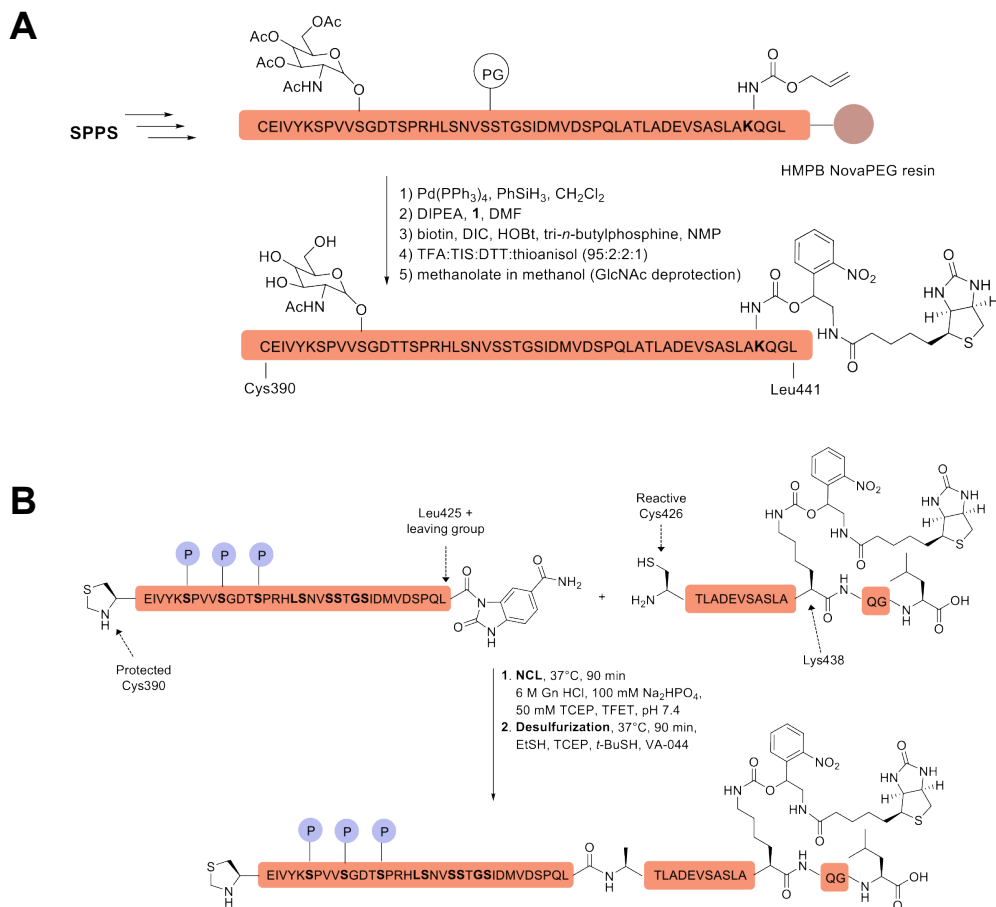


**Figure 74 :** Représentation schématique de la stratégie globale de l'EPL utilisée pour la synthèse du protéine Tau 441 porteuse de modifications post-traductionnelles spécifiques dans la région Ct : phosphorylations en 396-400-404 d'une part et O-GlcNAcylation 400-phosphorylation 404 d'autre part. Au niveau de la protéine exprimée dans *E. coli*, SR représente l'étiquette intérie-GST liée au support. SPPS : synthèse peptidique en phase solide.

Tout d'abord, concernant la partie protéique recombinante, en raison des problèmes de rendement de purification, l'étiquette CBD (*Chitin Binding Domain*) de la construction Tau[1-389]-Intéine-CBD a été remplacée par une étiquette GST (*Glutathione S-Transferase*).

Concernant la synthèse peptidique, comme précédemment évoqué, la ligation entre le peptide et la protéine Tau[1-389]-Intéine-GST nécessite la présence d'une cystéine en position 390 (partie Nt du peptide). Ainsi la synthèse du peptide Cys<sub>390</sub>-Leu<sub>441</sub> se fait, en théorie, de manière linéaire par réactions successives de déprotection/couplage. On peut parler de stratégie en « une étape » car aucune précaution particulière n'est prise durant la production du peptide. La synthèse des peptides natif et O-GlcNAcylyé sur la Ser400, [390-441]-gS400, a été réalisée selon ce protocole, décrit précédemment (**figure 75-A**). En revanche, la synthèse du

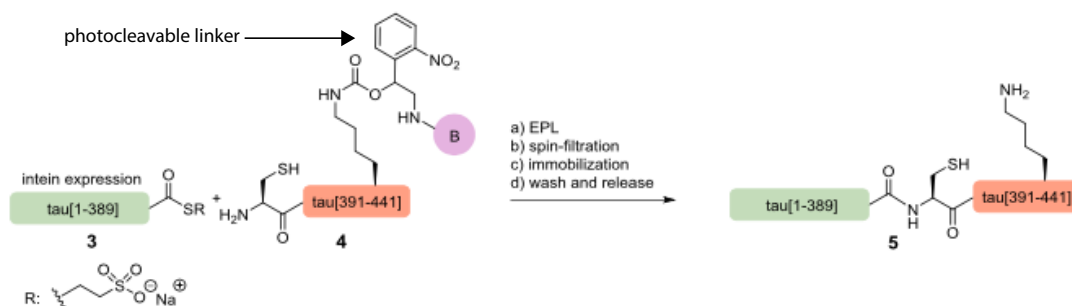
peptide triplement phosphorylé ne peut se faire par la voie classique utilisée pour produire son homologue glycosylé. En effet, les rendements étant trop faible (inférieurs à 5%) deux peptides sont préalablement synthétisés et sont liés par ligation chimique native (**figure 75-B**) (Reimann et al., 2015a, 2017). Suite à cela, le peptide complet sera lié à Tau[1-389]-Intéine-GST de la même manière que le peptide O-GlcNAcylé en position 400 (conditions et tampons identiques).



**Figure 75 : A-Synthèse linéaire du peptide O-GlcNAcylé sur la sérine 400.** Les étapes 1 et 2 permettent l'ajout du «*linker*» photoclivable porteur de la biotine pour la purification ultérieure. L'étape 3 permet la déprotection de la Cys390. L'étape 4 permet la libération du peptide synthétisé du support et pour finir la déprotection de la Ser400 O-GlcNAc est réalisée au cours de l'étape 5. **B-Synthèse du peptide triplement phosphorylé sur les positions Ser396/Ser400/Ser404.** On synthétise d'abord le peptide [390-425]-pS396-pS400-pS404 qui est lié à un second peptide [426-441] par ligation chimique native. La cystéine générée en position 426 est ensuite désulfurisée en alanine. On note que cette réaction n'affecte pas la Cys390 nécessaire à la ligation car cette dernière est protégée.

Pour finir, quel que soit le peptide considéré, celui-ci est porteur d'un *linker* photoclivable couplé à une biotine qui est l'élément central du produit de ligation

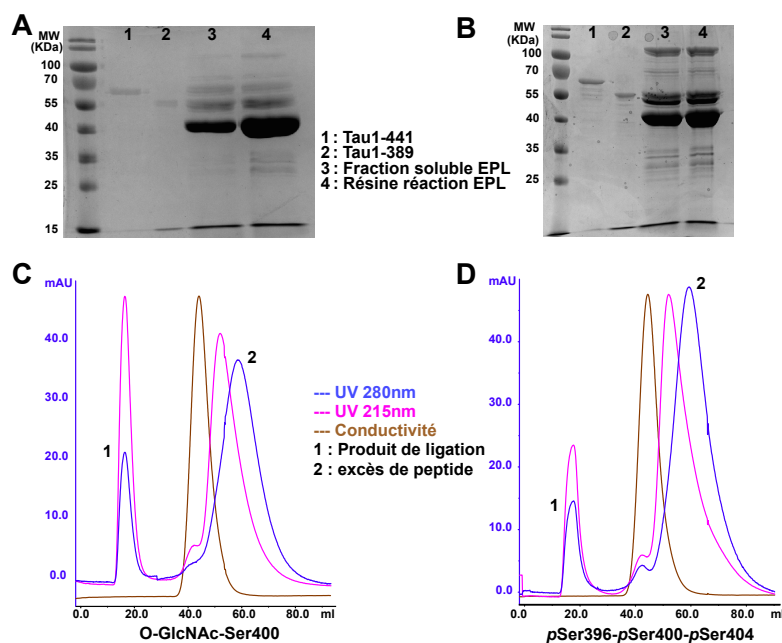
entre la protéine et le peptide (triplement phosphorylé ou O-GlcNAcylé). En effet, suite à la réaction de ligation, l'excès de peptide est tout d'abord éliminé du milieu par gel filtration (MWCO=10 kDa) et le produit de réaction purifié sur colonne de streptavidine grâce à la biotine portée par le linker. L'interaction biotine-streptavidine étant la liaison non covalente présentant la plus haute affinité (10–15 M), l'élution est impossible sans ce linker photoclivable. Par irradiation de la colonne à 297nm (LOT Hg (Xe) arc lamp), le produit de ligation est élué et récupéré dans la fraction soluble (**figure 76**).



**Figure 76** : Résumé de la stratégie de l'EPL et importance du *linker* photoclivable dans l'étape de purification du produit de ligation (Reimann et al., 2015b).

## b. Résultats et problèmes rencontrés

Suite à la ligation entre le peptide (Ser396-Ser400-Ser404 ou Ser400-O-GlcNAc) et la protéine Tau[1-389]-Intéine-GST, le produit de réaction est purifié sur colonne de streptavidine et élué par irradiation UV (Reimann et al., 2015b). Avant tout test d'activité, le produit de ligation est dessalé (tampon 50 mM bicarbonate d'ammonium) et lyophilisé. On note que l'étape de dessalage nous permet d'ajouter une étape de purification supplémentaire puisqu'on constate que l'excès de peptide est éliminé lors de cette étape (**figure 77**).

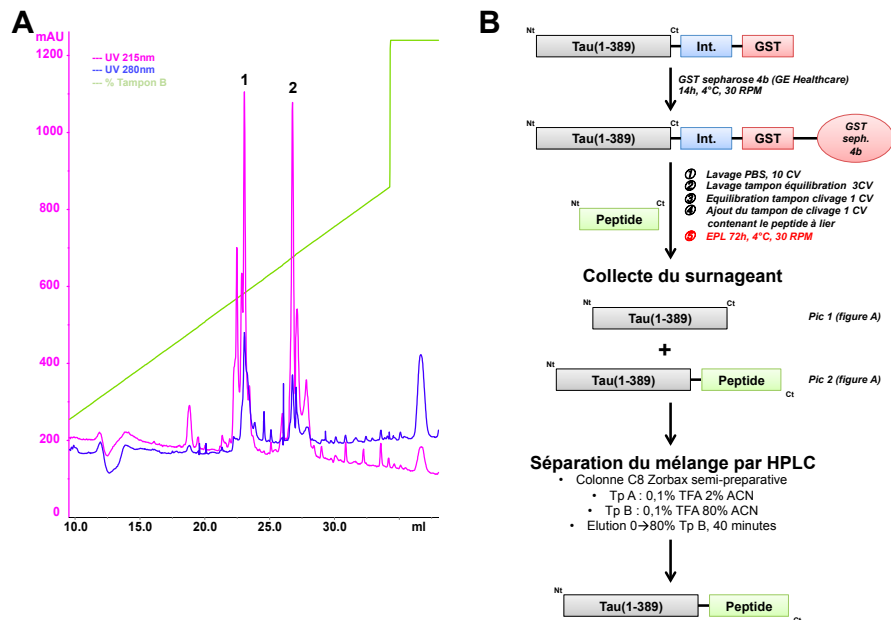


**Figure 77** : Dessalage des produits de ligation. **A**-Gel final après réaction de ligation entre Tau[1-389] et peptide 390-441 O-GlcNAc 400. **B**-Gel final après réaction de ligation entre Tau[1-389] et peptide [390-441] triplement phosphorylé. **C**-Dessalage de la protéine O-GlcNAcylée. **D**-Dessalage de la protéine triplement phosphorylée.

Concernant la protéine O-GlcNAcylée sur la sérine 400, on constate sur le gel (**figure 77-A**) que le produit de ligation est bien présent mais que les quantités produites ne sont pas très importantes, ce qui est confirmé par le chromatogramme de dessalage (**figure 77-C**). L'intégration du pic UV à 280nm correspondant à la fraction protéique exclue du gel, nous permet d'estimer à 0,4 mg la quantité de protéine produite. En revanche, concernant la protéine triplement phosphorylée, le produit de réaction n'est pas identifié sur le gel (**figure 77-B**), ce qui implique une quantité inférieure à celle obtenue pour la protéine O-GlcNAcylée. Ceci se confirme par intégration du pic de dessalage du chromatogramme correspondant (**figure 77-D**) qui nous indique une quantité produite d'environ 0,1 mg. Ces très faibles rendements sont donc problématiques pour les analyses RMN et tests d'agrégation initialement prévus. L'analyse structurale par RMN dans un temps raisonnable étant impossible et les tests d'activité étant consommateurs en matériel, nous nous sommes penchés sur le développement d'une nouvelle stratégie simplifiée permettant d'optimiser les rendements de ligation. Afin de tenter d'expliquer ces faibles rendements, des expériences d'interactions entre Tau[1-389] et les peptides O-GlcNAc et triplement phosphorylés ont été réalisées par RMN. En effet, l'hypothèse selon laquelle le peptide interagirait avec une autre région de Tau n'est

pas à exclure car après dessalage, une grande quantité de peptide a été retrouvé dans la fraction protéique malgré une différence de poids moléculaire de plus de 30kDa. Aucune interaction n'a été mise en évidence ce qui suggère donc que des pertes de matériel durant chaque étape de purification se traduisent à la fin par des rendements très faibles.

Afin d'éviter les pertes de matériels durant les différentes étapes de purification/dessalage du produit de ligation, nous avons réalisé un test simple qui nous a permis de réfléchir sur une stratégie simplifiée. En effet, par HPLC en phase inverse sur colonne C8 Zorbax semi-préparative, nous avons réussi à séparer la protéine Tau[1-441] de la protéine Tau[1-389] (**figure 78-A**), ce qui suggère qu'en injectant directement le mélange réactionnel (surnageant de réaction après ligation), nous pouvons séparer la protéine complète, le produit de ligation ainsi que les sous-produits toujours présents dans le milieu (protéine tronquée, peptides). Ainsi l'étape de purification sur colonne de streptavidine et l'éluion par irradiation UV ne sont plus nécessaires ainsi que l'étape de dessalage avant lyophilisation, les fractions étant directement congelées et lyophilisées après purification sur C8 (**figure 78-B**).



**Figure 78** : Nouvelle stratégie EPL en une étape de purification par HPLC en phase inverse. **A**-Séparation sur C8 Zorbax d'un mélange Tau[1-389]/Tau[1-441]. **B**-Schéma global de la nouvelle stratégie EPL.

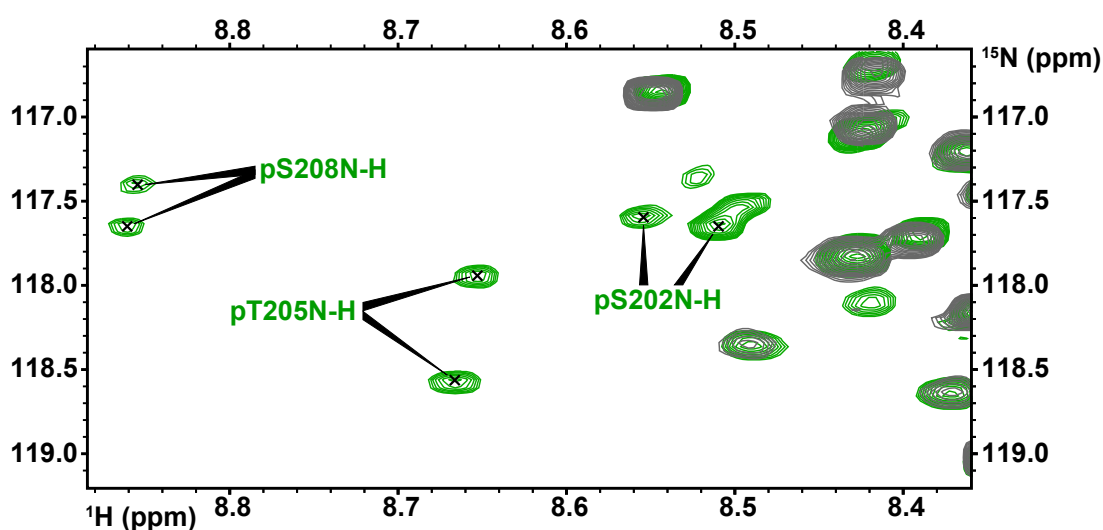
## ii. L'épitope AT8

### a. Stratégie

Toujours dans le cadre de la collaboration avec le groupe du Pr Christian Hackenberger (FMP-Berlin, Allemagne) et suite à l'étude menée sur le profil de phosphorylation minimal déclenchant l'agrégation, nous avons envisagé d'appliquer la stratégie de l'EPL à l'épitope AT8 dans le but de :

- Générer une protéine Tau quantitativement phosphorylée
- Comprendre le rôle potentiel du site minoritaire d'O-GlcNAcylation de la Ser208.

En effet, la phosphorylation par l'extrait de cerveau de rat de Tau441-AT8, dont la plupart des phospho-sites sont mutés en alanine (seuls les résidus Ser202/Thr205/Ser208 sont conservés) ne permet pas une phosphorylation homogène de l'échantillon, chaque site n'étant pas phosphorylé à 100%. Ceci se traduit sur le spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC par un dédoublement des résonances correspondants aux résidus phosphorylés (**figure 79**).



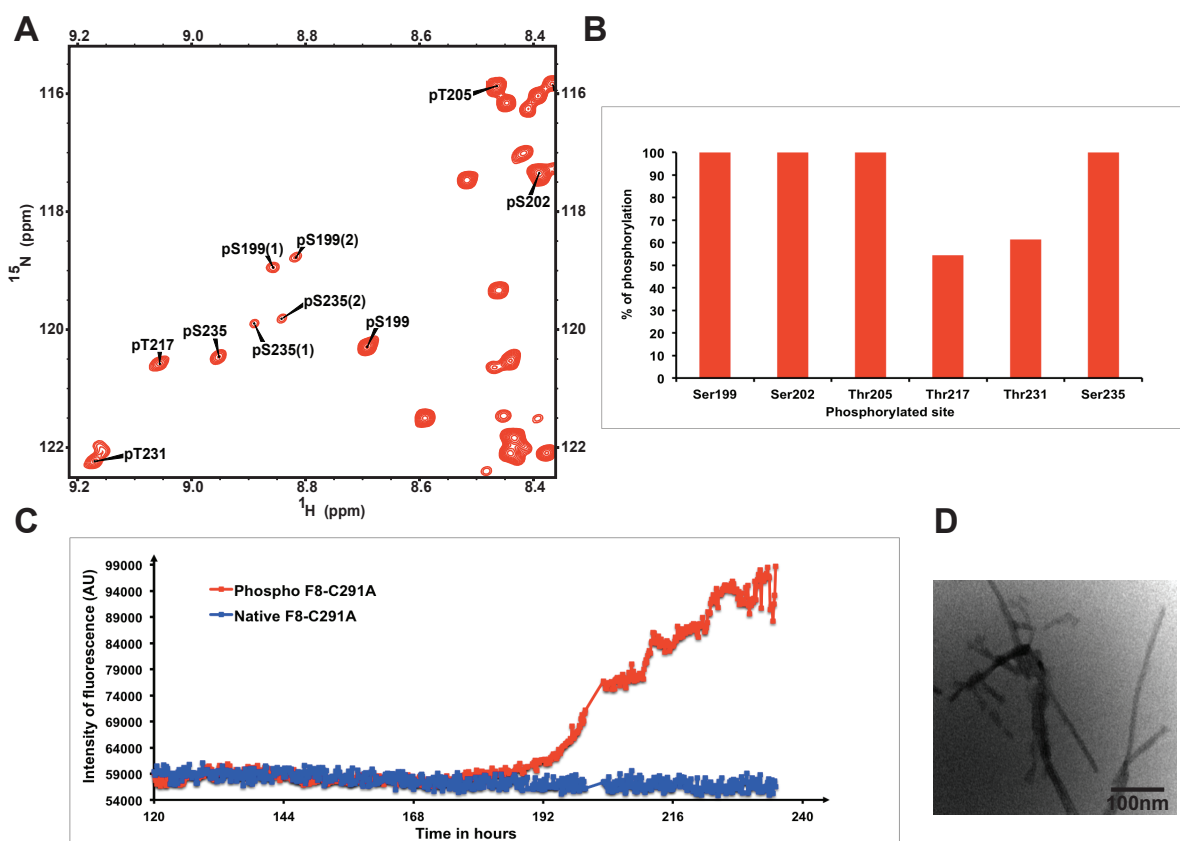
**Figure 79** : Phosphorylation incomplète de Tau441-AT8 par l'extrait de cerveau de rat. Superposition des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de Tau441-AT8 native (gris) et phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat (vert). On constate le dédoublement des résonances correspondant aux résidus phosphorylés, ce qui reflète l'inhomogénéité de phosphorylation.

Afin de pallier cette inhomogénéité de phosphorylation nous avons envisagé la synthèse d'un peptide AT8 triplement phosphorylé *pSer202/pThr205/pSer208* suivie de deux étapes de ligation. Mais en raison des difficultés et des faibles rendements obtenus lors de l'étude de la triple phosphorylation du PHF-1, nous avons reconsidéré la stratégie et avons décidé de commencer l'étude à l'échelle du fragment fonctionnel TauF8 [192-324] ce qui permet de réduire la réaction de ligation à une seule étape.

La stratégie envisagée consiste donc en une synthèse peptidique en phase solide d'un peptide [192-227] qui sera lié au reste de TauF8 [228-324] produit par la voie recombinante. Pour mémoire, à la différence de la stratégie utilisée dans l'étude de l'épitope PHF-1, la ligation a lieu ici en position N-terminale de la partie protéique recombinante. La cystéine nécessaire à l'étape de ligation est obtenue après clivage du *his-tag* du produit de purification [228-324] par la protéase TEV (Hackenberger and Schwarzer, 2008). En théorie, le peptide synthétisé ainsi que la séquence protéique étant plus courts, les rendements devraient être augmentés. En collaboration avec Kristina Siebertz, étudiante en thèse, et lors de mon déplacement au sein du laboratoire du Pr. Christian Hackenberger, j'ai eu l'occasion de synthétiser l'ensemble des peptides nécessaires à l'étude : [192-227] non modifié, [192-227]-*pSer202-pThr205*, [192-227]-*pSer202-pThr205-pSer208*. Comme attendue, la synthèse de ce dernier s'est soldée par des rendements très faibles, probablement induits par le caractère critique des étapes de liaison avec les acides aminés phosphorylés mais aussi par la potentielle agrégation du peptide triplement phosphorylé en fin de synthèse.

De ce fait, afin de s'affranchir des risques d'agrégation du peptide AT8 triplement phosphorylé, nous avons envisagé en parallèle une stratégie utilisant le modèle TauF8 phosphorylé par ERK2 bien maîtrisé au laboratoire et qui avait démontré ses propriétés d'agrégation à haute concentration (120-150  $\mu\text{M}$ ) (**figure 80**). Pour mémoire, l'activité kinase ERK2 entraîne la phosphorylation de six résidus sur le fragment TauF8 Ser199/Ser202/Thr205/Thr217/Thr231/Ser235 (**figure 80-A**), la double phosphorylation de l'épitope AT8 étant complète (**figure 80-B**).





**Figure 80** : Phosphorylation du fragment fonctionnel TauF8 par ERK2. **A**-Spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC permettant de visualiser les différents sites de phosphorylation. **B**-Quantification du niveau de phosphorylation pour chaque site identifié sur le  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. **C**-Cinétique d'agrégation de **TauF8 natif (bleu)** ou **phosphorylée (rouge) par ERK2** à 120  $\mu\text{M}$  suivie par fluorescence de la ThT. On constate une agrégation de l'échantillon phosphorylé après 5 jours d'incubation à 37°C. **D**-Observations en MET permettant de valider la présence de fibres après agrégation de TauF8 phosphorylé.

Afin d'obtenir un fragment TauF8 uniquement porteur de l'épitope AT8 triplement phosphorylé, nous avons envisagé de générer un peptide AT8 mono-phosphorylé sur la Ser208 qui, dans un deuxième temps, subirait l'activité kinase ERK2. De ce fait, les peptides [192-227] synthétisés doivent être porteurs des mutations S199A et T217A et la partie recombinante mutée T231A et S235A afin d'éviter la phosphorylation de ces sites lors de l'étape d'incubation avec la kinase. Sous réserve d'une activité ERK2 non-altérée par la phosphorylation de la Ser208, cette stratégie s'avère être plus simple, notamment dans la phase de synthèse peptidique car les rendements de synthèse des peptides mono-phosphorylés sont généralement bons et surtout aucun risque d'agrégation n'est à prévoir. De la même façon, il est facile d'introduire au cours de la synthèse du peptide AT8 une Ser208 O-GlcNAcylée. Suite à l'étape de phosphorylation par ERK2, cela permettrait d'obtenir l'épitope AT8 doublement phosphorylé pSer202/pThr205 et glycosylé gS208,

toujours sous réserve du bon fonctionnement de ERK2 en présence de la glycosylation au voisinage des sites cibles. En collaboration avec le post-doctorant du groupe du Pr Christian Hackenberger, le Dr Wenyi Li, nous avons entrepris la synthèse de ce peptide O-GlcNAcylé sur la Ser208.

Quel que soit le peptide synthétisé et donc le produit de ligation final phosphorylé et/ou O-GlcNAcylé sur différentes positions, des tests d'agrégation confirmés par observations en MET seront réalisés. L'intégralité de la stratégie est résumée dans le **tableau 7**.

Séquence AT8	Séquence peptidique (SPS)	Séquence protéique (Recombinante)	Résultats agrégation/MET
AT8	<sup>196</sup> GYS <u>A</u> <sup>199</sup> PGSPGTPGSRSRTP SLP <u>A</u> <sup>217</sup> PPTREPKKVA <sup>227</sup>	V <sup>228</sup> VRA <sup>231</sup> PPKA <sup>235</sup> PSSAK [...]SKIGS <sup>262</sup> [...]SKA <sup>291</sup> GS [...]SKC <sup>322</sup> GS <sup>324</sup>	Pas d'agrégation
AT8-2P	<sup>196</sup> GYS <u>A</u> <sup>199</sup> PGpSPGpTPGSRSR TPSLP <u>A</u> <sup>217</sup> PPTREPKKVA <sup>227</sup>		Pas d'agrégation
AT8-pS208	<sup>196</sup> GYS <u>A</u> <sup>199</sup> PGSPGTPGpSRSRTP PSLP <u>A</u> <sup>217</sup> PPTREPKKVA <sup>227</sup>		Pas d'agrégation
AT8-3P	<sup>196</sup> GYS <u>A</u> <sup>199</sup> PGpSPGpTPGpSRS RTPSLP <u>A</u> <sup>217</sup> PPTREPKKVA <sup>227</sup>		Agrégation
AT8-gS208	<sup>196</sup> GYS <u>A</u> <sup>199</sup> PGSPGTPGgSRSRTP PSLP <u>A</u> <sup>217</sup> PPTREPKKVA <sup>227</sup>		???
AT8-2P/gS208	<sup>196</sup> GYS <u>A</u> <sup>199</sup> PGpSPGpTPGgSRS RTPSLP <u>A</u> <sup>217</sup> PPTREPKKVA <sup>227</sup>		???

**Tableau 7** : Résumé de la stratégie globale de l'EPL mise en place pour l'étude des conséquences fonctionnelles de la **phosphorylation** et/ou **glycosylation** de l'épitope AT8. On note que les peptides synthétisés possèdent en Ct une fonction thioester nécessaire à l'étape de ligation avec la cystéine Nt de la partie recombinante. AT8-2P = AT8-pSer202/pThr205 ; AT8-3P = AT8-pSer202/pThr205/pSer208. Les acides aminés soulignés représentent les sites mutés afin d'éviter leur phosphorylation par ERK2. On note que les résultats agrégation/MET sont des résultats potentiels en se basant sur l'étude du profil de phosphorylation déclencheur de l'agrégation.

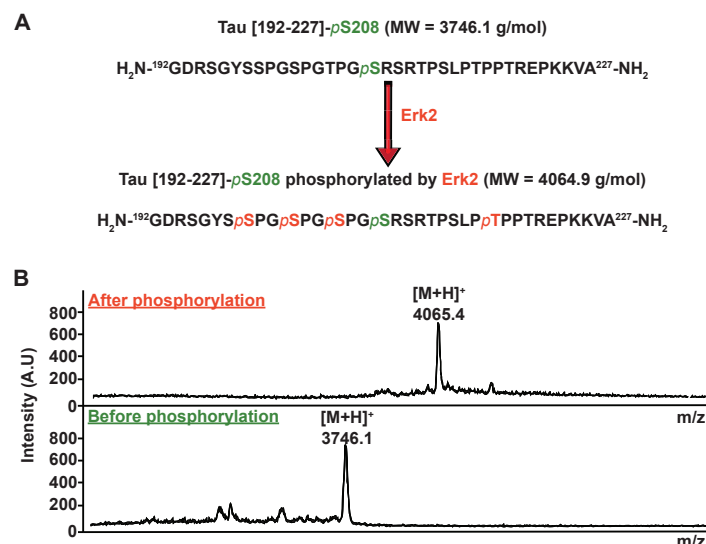
## b. Résultats préliminaires

Cette partie du projet « Tau-EPL » ayant été démarrée que très récemment, à ce jour nous n'avons généré que des résultats préliminaires qui n'en restent pas moins encourageants pour la suite de l'étude.

En effet, comme attendu, la synthèse du peptide triplement phosphorylé pSer202/pThr205/pSer208 s'est avérée problématique en termes de rendements, inférieurs au mg de peptide. Nous nous sommes donc rapidement tournés vers la seconde stratégie « hybride » combinant synthèse d'un peptide mono-phosphorylé sur la Ser208 et activité kinase ERK2. Concernant la ligation entre le peptide synthétique et la partie protéique recombinante, deux possibilités se sont alors présentées :

- Ligation du peptide et de la partie recombinante suivie par l'étape de phosphorylation du produit de ligation TauF8 par ERK2.
- Phosphorylation du peptide par ERK2 suivie de l'étape de ligation avec la partie protéique recombinante.

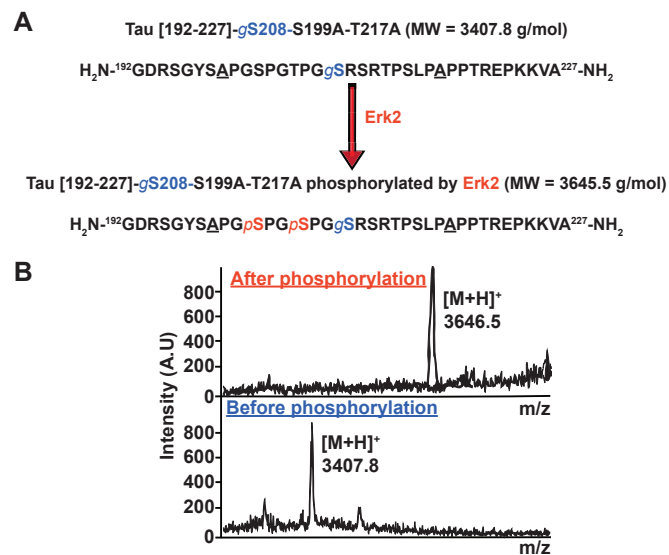
Nous avons opté pour la phosphorylation préalable du peptide suivie de l'étape de ligation afin d'éviter le risque de phosphorylation aspécifique. En effet, plus la séquence est longue, plus ce risque est augmenté. De plus, la phosphorylation du peptide est facilement contrôlable par spectrométrie de masse MALDI-TOF. De ce fait, nous avons tout d'abord généré un peptide précurseur Tau[192-227]-pSer208 non muté sur les sites cibles de ERK2 afin de vérifier l'efficacité de l'activité kinase ERK2 en présence du site phosphorylé (**figure 81-A**).



**Figure 81** : Phosphorylation du peptide Tau[192-227]-pS208 par ERK2. **A**-Séquence peptidique et sites cibles de ERK2. **B**-Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF du peptide [192-227] après phosphorylation par Erk2. On constate que les quatres sites potentiels sont phosphorylés à 100%.

L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF du peptide après incubation avec ERK2 a permis de mettre en évidence la phosphorylation quantitative de ce peptide (**figure 81-B**) : tous les sites sont phosphorylés à 100% ( $\Delta m = 254 + 63 = 319$  Da ;  $319/4 \approx 80$  Da correspondant à l'ajout de quatre groupements phosphate (80 Da)). On en conclut donc que la phosphorylation de la Ser208 ne perturbe pas l'activité kinase. De ce fait, cette stratégie hybride pourra être appliquée à la phosphorylation du peptide [192-227]-pSer208-S199A-T217A qui, après phosphorylation par ERK2, sera quantitativement triplement phosphorylé sur l'épitope AT8. Celui-ci sera ensuite lié à la partie protéique recombinante et, en théorie, nous obtiendrons un fragment TauF8 fonctionnel, triplement phosphorylé au niveau de l'épitope AT8.

De la même manière, nous avons phosphorylé le peptide [192-227]-gS208, afin de vérifier que la O-GlcNAcylation de la Ser208 ne perturbait pas l'activité kinase ERK2. Suite aux résultats obtenus sur le peptide mono-phosphorylé, nous avons directement testé la stratégie sur le peptide [192-227]-gSer208-S199A-T217A (**figure 82-A**).



**Figure 82** : Phosphorylation du peptide Tau[192-227]-gS208-S199A-T217A par Erk2. **A**- Séquence peptidique et sites cibles de Erk2. **B**-Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF du peptide [192-227] après phosphorylation par ERK2. On constate la présence de trois sites de phosphorylation.

L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF révèle l'addition de trois groupements phosphates sur notre peptide glycosylé (**figure 82-B**) ( $\Delta m = 3645,5 - 3406,8 = 238,7$  Da et  $238,7/80 = 2,98$  correspondant à l'ajout de trois groupements phosphates). Ajouté à la phosphorylation des résidus Ser202 et Thr205, il y a donc un site de phosphorylation aspécifique. A ce jour, des analyses MS/MS sont menées pour identifier ce site supplémentaire. Deux hypothèses peuvent être formulées : soit la phosphorylation d'un résidu Ser/Thr (pThr212 ?) ou même Tyr du peptide, soit la phosphorylation du résidu O-GlcNAc. On peut donc affirmer ici que l'activité kinase de ERK2 semble perturbée par la glycosylation de la Ser208 puisqu'un site de phosphorylation supplémentaire est observée.

### **C. Conclusions, discussions et perspectives**

En conclusion sur la stratégie de l'EPL mise en place pour l'étude du lien entre phosphorylation et O-GlcNAcylation des épitopes AT8 et PHF-1, nous avons dû faire face aux problèmes de rendements des synthèses des peptides triplement phosphorylés et proposer des stratégies alternatives afin d'aboutir aux différents produits de ligation finaux :

- Une stratégie « hybride » de modification de l'épitope AT8, combinant synthèse peptidique et utilisation de kinases recombinantes.
- Une stratégie de ligation simplifiée pour la production d'une protéine Tau porteuse de l'épitope PHF-1 constitutivement modifiée par phosphorylation et/ou O-GlcNAcylation.

En raison des faibles quantités de produits obtenues, aucune étude d'agrégation n'a été menée sur les produits de ligation. A ce jour, l'ensemble de nos efforts se sont concentrés sur l'étude de l'épitope AT8, notamment sur la stratégie de production du peptide AT8 triplement phosphorylé afin d'obtenir le produit de ligation souhaité. De plus, nous envisageons la réalisation d'expériences de FRET afin de comprendre les changements structuraux induits par cette triple phosphorylation. En effet, Gandhi et collaborateurs ont décrit le tournant de l'épitope AT8 induit par la double phosphorylation pSer202/pThr205 (Gandhi et al., 2015). Ainsi, en théorie, par l'utilisation de sondes compatibles greffées respectivement aux extrémités N- et C-terminales des peptides, nous devrions obtenir un signal FRET dans le cas d'une

double phosphorylation de l'AT8, signal qui serait perdu dans le cas d'une triple phosphorylation si l'hypothèse de la déstabilisation du tournant par la phosphorylation de la Ser208 s'avère vraie. Nous avons donc sélectionné le couple de sondes tryptophane/ Alexa Fluor® 350 NHS Ester (Succinimidyl Ester) et commencé à synthétiser les différents peptides porteurs des différentes combinaisons de phosphorylation (pS202/pT205 ou pS202/pT205/pS208) sur la base de la séquence suivante :



Quoiqu'il en soit, ces projets annexes menés en collaboration avec le groupe du Pr. Christian Hackenberger et mes différents séjours dans son laboratoire m'ont permis d'appréhender la synthèse peptidique ainsi que les différentes approches de ligation chimique native, leurs avantages mais aussi leurs limites et difficultés. De plus, les travaux de synthèse menés sur la glycosylation de l'épitope PHF-1 ont donné lieu à une publication (retrouvée en annexe) : « *Semi-synthesis of a tag-free O-GlcNAcylated tau protein by sequential chemoselective ligation* » (Schwagerus et al., 2016)

**Partie 3 : Inhibition de l'agrégation  
par le *lysine tweezer* CLR01**





Les pathologies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Pick... sont caractérisées par la présence de protéines agrégées retrouvées au niveau cérébral. On peut par exemple citer l' $\alpha$ -synucléine et la protéine Tau, respectivement retrouvées dans la maladie de Parkinson et d'Alzheimer. Du point de vue structural, ces différentes protéines sont caractérisées par l'absence de structure tertiaire stable et font partie de la grande famille des protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs) : au cours de l'agrégation, cette structure particulière est perdue ainsi que les propriétés et fonctions qui en découlent. Les agrégats formés sont responsables de la mort neuronale qui entraîne par un déclin cognitif et/ou moteur, chez les patients atteints par ces maladies. Du point de vue thérapeutique, l'objectif principal serait donc de désagréger et redonner la non-structuration IDP afin de restaurer les fonctions perdues. On distingue 2 grandes approches dans le développement de traitements contre les maladies neurodégénératives :

1. Par l'utilisation d'anticorps : l'immunothérapie. On parle d'immunothérapie active (IA) ou passive (IP). Alors que l'IP consiste en l'injection d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre une cible moléculaire ( $A\beta$  ou Tau), l'IA a pour objectif de stimuler notre système immunitaire par l'injection d'un antigène qui va donc stimuler la réponse immunitaire. Par exemple, l'AN-1792 (développé par Janssen et Pfizer) est la 1<sup>ère</sup> immunothérapie active développée contre la maladie d'Alzheimer favorisant l'élimination des plaques amyloïdes mais pas des PHFs (Nicoll et al., 2003) par injection de peptide  $A\beta$ . Malheureusement celle-ci fut abandonnée durant les essais cliniques en phase IIa en 2002. Concernant l'immunothérapie passive, on peut citer le Bapineuzumab (Janssen, Pfizer), le Gantenerumab (Chugai Pharmaceutical Co.) ou le Solanezumab (Eli Lilly & Co.) ciblant aussi les dépôts  $A\beta$  mais qui ont été abandonnées en phase III d'essais cliniques.
2. Par l'utilisation des petites molécules de synthèse. On peut notamment citer le LMTM (TauRx Therapeutics Ltd), un dérivé du bleu de méthylène ciblant l'agrégation de Tau qui a échoué en phase III

d'essais cliniques en 2016, les objectifs premiers n'ayant pas été atteints chez les patients atteints de la MA à un stade léger à modéré.

On constate que les immunothérapies développées et abandonnées (active ou passive) permettaient de réduire, en partie, les plaques amyloïdes mais n'inhibaient pas l'agrégation de la protéine Tau. De plus, la plupart des thérapies quelles qu'elles soient (petites molécules ou immunothérapie) ciblent principalement l'étape de formation du peptide A $\beta$  donc les activités  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases ou la clairance du dit peptide. On remarque donc que très peu de thérapies ciblent l'agrégation de Tau (Wischik et al., 2014). Par conséquent, la liste de petites molécules ciblant l'agrégation de Tau ou les dépôts A $\beta$  abandonnées durant les essais cliniques est malheureusement longue. En résumé, à ce jour, la maladie d'Alzheimer est incurable et peu de traitements ont atteint les essais cliniques de phase IV.

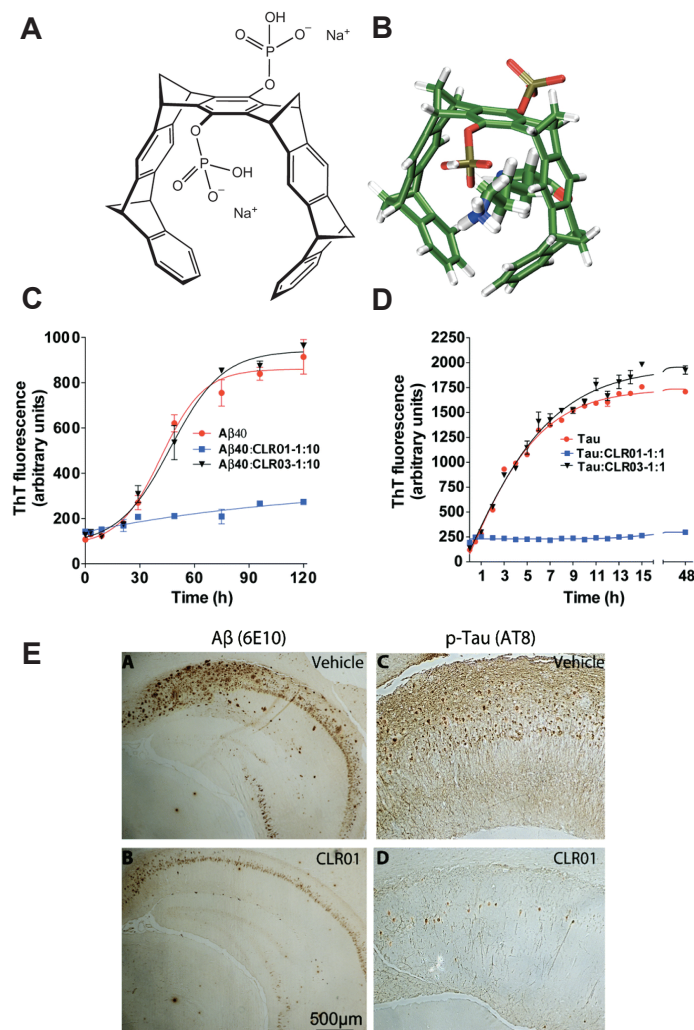
Concernant l'inhibition de l'agrégation de la protéine Tau, l'absence de traitement peut s'expliquer par les nombreux problèmes rencontrés par la communauté scientifique : la connaissance incomplète du mécanisme de l'agrégation, le risque de formation d'oligomères toxiques dans le développement des traitements visant à désagréger les PHFs, mais surtout l'absence d'un modèle d'agrégation *in vitro* de la protéine Tau, première marche vers le développement d'un traitement. Actuellement celui-ci repose sur le déclenchement de l'agrégation par ajout de polyanions tels que l'héparine, les ARNs ou les acides gras (Kampers et al., 1996). La cinétique est alors suivie par fluorescence de la thioflavine T (ThT) couplée à des observations en microscopie électronique en transmission (Friedhoff et al., 1998b). Bien que classiquement utilisé dans le criblage de molécules potentiellement inhibitrices, la fiabilité des résultats obtenus n'en reste pas moins discutable en raison de l'interaction potentielle entre l'héparine et la molécule testée. On peut par exemple imaginer une inhibition de l'agrégation qui serait induite par un déplacement de l'héparine par la petite molécule et non par l'action directe de celle-ci : on parle alors de faux-positif.

A l'aube des années 1990, sur la base du concept de « chimie supramoléculaire » défini par Jean-Marie Lehn, une nouvelle catégorie de molécules organiques est développée : les « *molecular tweezers* ». Celles-ci sont constituées

par la succession de cycles aromatiques formant une cavité et étant le siège d'interactions non covalentes (hydrophobes, électrostatiques). En raison du caractère hydrophobe de la molécule et donc de sa faible solubilité dans les solvants aqueux, peu d'applications biologiques ont été initialement décrites (Zimmerman and VanZyl, 1987). Mais en 1996, Klärner et collaborateurs proposent la synthèse d'un *tweezer* substitué par deux groupements anioniques ce qui entraîne une augmentation de la solubilité de la molécule dans l'eau et permet d'envisager l'utilisation des *molecular tweezers* dans le contexte biologique (Dutt et al., 2013; Klärner et al., 1996). De plus, ces substitutions chargées négativement vont potentiellement être le siège d'interactions électrostatiques avec des groupements cationiques tels que les chaînes latérales des lysines et arginines, acides aminés impliqués dans de nombreux processus biologiques notamment dans l'agrégation (Fokkens et al., 2005). En effet, par la présence de 4 groupements méthylène (CH<sub>2</sub>) et du cation ammonium, les chaînes latérales des lysines des protéines responsables de la formation de structures amyloïdes peuvent être impliquées dans des interactions hydrophobes et/ou électrostatiques à la base du processus agrégatif responsable de certaines pathologies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer.

Concernant l'utilisation du lysine *tweezer* CLR01 (**figure 83-A-B**) (di-substitué par des groupements phosphate) dans la maladie d'Alzheimer, Xie et collaborateurs ont identifié par spectrométrie de masse les résidus K16, K28 et R5 comme sites d'interactions spécifiques entre le CLR01 et le peptide A $\beta$  monomérique (Xie et al., 2006). De plus, *in vitro* et par l'utilisation du modèle cellulaire PC12 incubé en présence d'oligomères A $\beta$ , Sinha et collaborateurs démontrent une inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta$  en présence du CLR01 (**figure 83-C**) (Sinha et al., 2011). Dans la foulée, Attar et collaborateurs prouvent l'efficacité du CLR01 *in vivo* par l'utilisation d'un modèle de souris triple-transgéniques surexprimant TauP301L, APP, PSEN-1. A 15 mois, le CLR01 est administré par voie orale durant 28 jours puis les souris sont sacrifiées et des expériences d'immunomarquage (anti-AT8 et mab-6E10) sont réalisées sur coupes de cerveaux : les auteurs constatent une diminution de la réponse AT8 et 6E10 ce qui suggère respectivement un recul des pathologies Tau et A $\beta$  caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (**figure 83-E**) (Attar et al., 2012). Pour finir, l'étude de l'interaction CLR01/lysines par RMN a permis de mettre

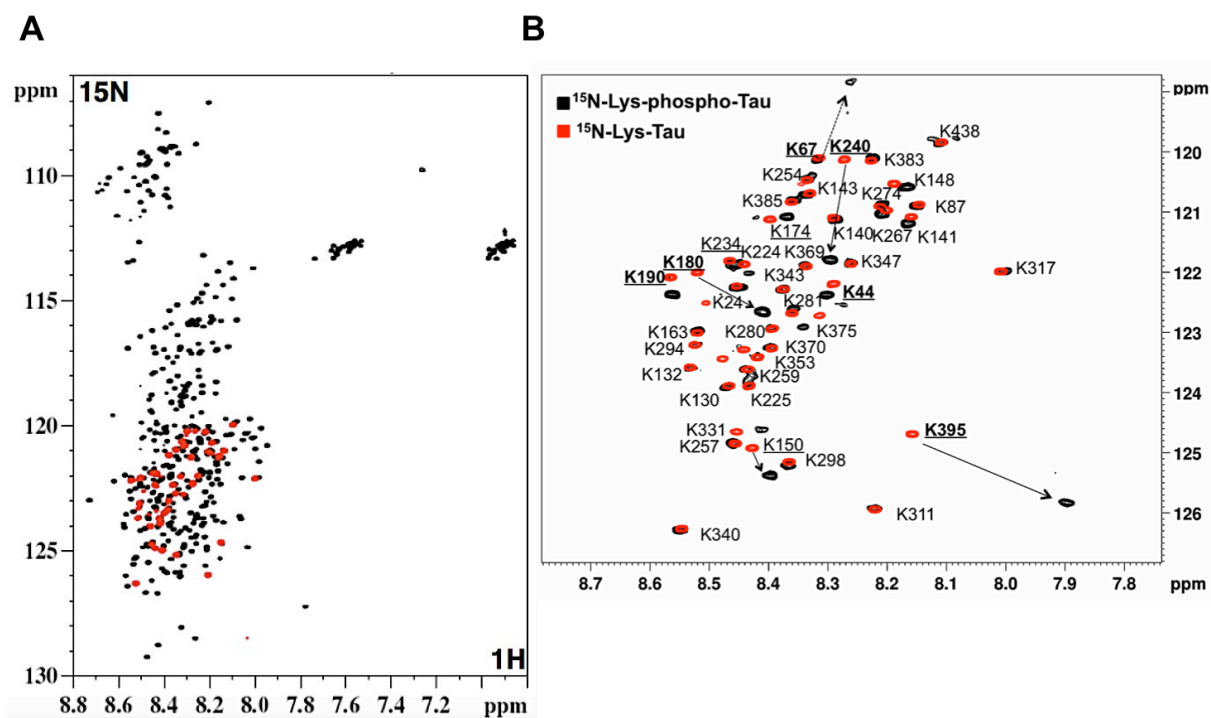
en évidence une affinité de l'ordre du  $\mu\text{M}$  (Fokkens et al., 2005) et surtout le caractère labile de cette liaison (Bier et al., 2013). Dans ce contexte, le CLR01 se pose en tant que potentiel inhibiteur de l'agrégation protéique observée dans diverses pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Tau et  $\text{A}\beta$ ), de Parkinson ( $\alpha$ -synucléine)... Néanmoins, on constate que la plupart des études portent sur le rôle inhibiteur du CLR01 dans la pathologie en dépit des résultats encourageants obtenus sur l'inhibition de l'agrégation de Tau par le CLR01 (**figure 83-D**).



**Figure 83** : Le *lysine tweezer* (CLR01), potentiel inhibiteur de l'agrégation de la protéine Tau et du peptide  $\text{A}\beta$ . **A**-Structure du CLR01. **B**-Interaction du CLR01 avec la chaîne latérale d'une lysine. **C**- **D**-Inhibition de l'agrégation du peptide  $\text{A}\beta$  (**C**) et Tau (**D**) en présence d'un excès de CLR01. On note que le CLR03 sert de contrôle négatif en raison de l'absence des pinces caractéristiques de la structure du CLR01. **E**-Immunomarquage (AT8 et 6E10) réalisé sur coupe de cerveaux de souris triple transgéniques surexprimant TauP301L, APP et PSEN-1, ayant ou non (*vehicule*) été traitées par le CLR01. On constate un recul des pathologies Tau et  $\text{A}\beta$  chez les souris ayant reçu le traitement (figure adaptée de (Schrader et al., 2016))

C'est pourquoi, dans le cadre d'une collaboration initiée avant le début de ma thèse avec le Pr. Gal Bitan (BRI, UCLA, Los Angeles, USA) et Pr. Thomas Schrader (University Duisburg-Essen, Essen, Allemagne), une première étude de l'inhibition de l'agrégation par le *lysine tweezer* (CLR01) avait été menée au sein du laboratoire sur la base de ce modèle Tau-Héparine. A la vue des résultats, il était difficile de conclure sur le rôle inhibiteur de la molécule étant donné que l'inhibition de l'agrégation observée pouvait potentiellement être dû à un déplacement de l'interaction Tau/héparine par le CLR01. De ce fait, nous nous sommes redirigés vers le modèle d'agrégation Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat et avons étudié l'interaction Tau/CLR01 par RMN et mesuré *in vitro* son pouvoir inhibiteur. Le CLR01 étant une molécule organique ciblant spécifiquement les résidus lysines, nous avons opté pour la même stratégie que celle mise en place lors de l'étude de l'acétylation : le marquage spécifique  $^{15}\text{N}_2$  des lysines qui permet de simplifier grandement le spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (**figure 84-A**). Pour mémoire, le problème de ce type de marquage sélectif est la disparition des sites de phosphorylation (Ser/Thr) et donc l'impossibilité de vérifier de manière précise la phosphorylation. Nous avons donc travaillé en parallèle sur une protéine uniformément marquée  $^{15}\text{N}$  afin de vérifier le profil de phosphorylation obtenu. De la même manière que lors de l'étude du dialogue entre phosphorylation et acétylation du fragment TauF8, nous avons ré-attribué la protéine Tau441 marquée sélectivement sur les lysines et phosphorylée (**figure 84-B**) En effet, certaines lysines (Lys67, Lys150, Lys180, Lys190, Lys240 et Lys395) étant à proximité de sites de phosphorylation, une variation de déplacement chimique du proton amide de ces résidus est observable après phosphorylation, ce qui est une preuve supplémentaire du bon déroulement de la phosphorylation.

Du point de vue expérimental, ce marquage spécifique nous a donc permis dans un premier temps d'étudier par RMN l'interaction entre le CLR01 et la protéine Tau native ou phosphorylée. Suite à cela, nous nous sommes penchés sur le rôle potentiellement inhibiteur de l'agrégation joué par le CLR01 par l'utilisation, entre autres, du modèle d'agrégation *in vitro* Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat.



**Figure 84** : Intérêt du marquage spécifique des lysines de la protéine Tau441. **A**- Superposition des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de Tau441 uniformément marquée  $^{15}\text{N}$  (noir) et sélectivement marquée sur les lysines  $^{15}\text{N}_2$  (rouge). **B**- Superposition des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de **Tau441 native (noir)** et de **Tau441 marquée sélectivement sur les lysines et phosphorylée par ERK2 (rouge)**. On constate la variation de déplacement chimique du proton amide des lysines situées à proximité de site de phosphorylation.

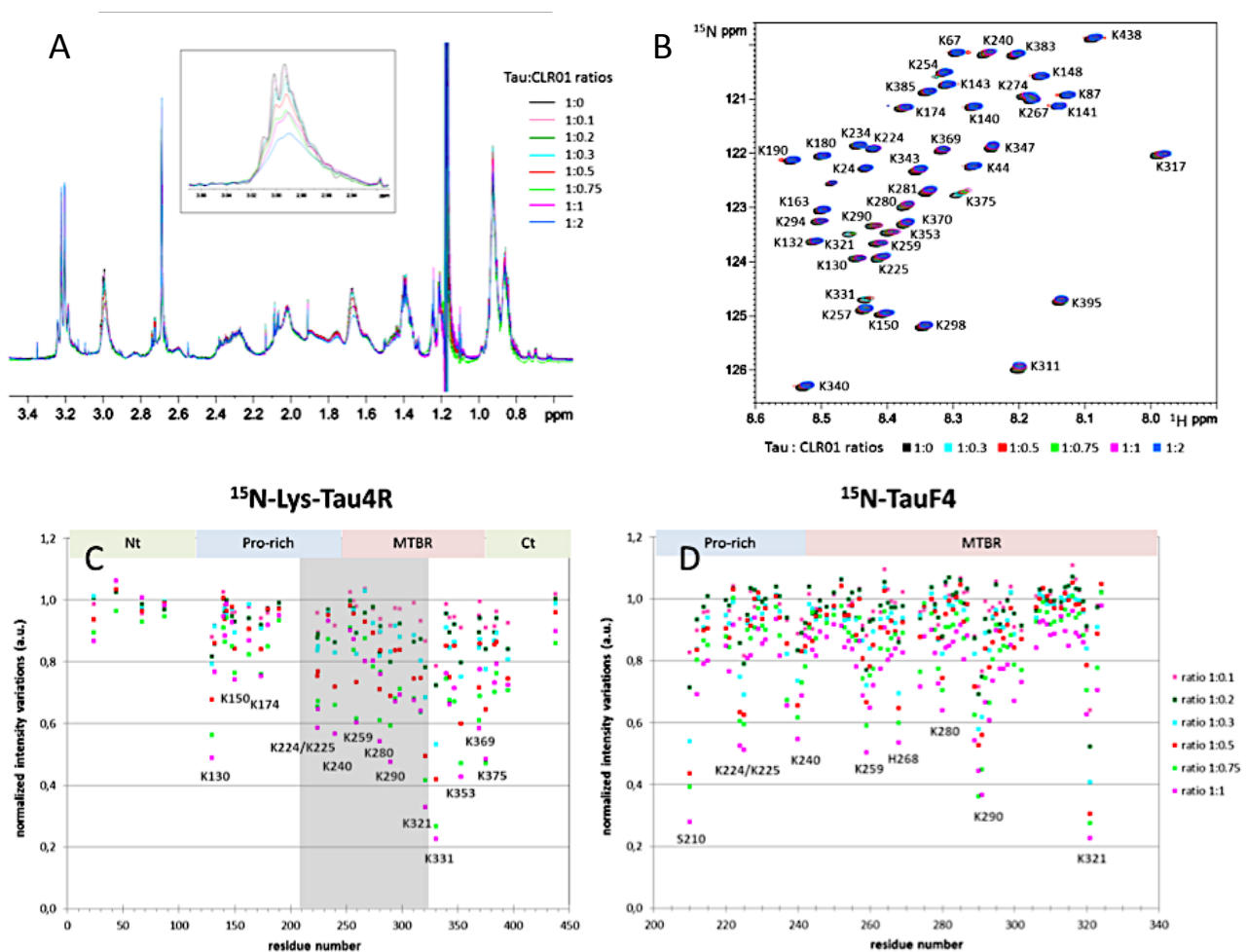
## I. Interaction Tau/lysine tweezer (CLR01)

### A. Interaction du lysine tweezer avec la protéine Tau native

Après production et purification d'une protéine Tau sélectivement marquée sur les lysines, nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'interaction du CLR01 avec Tau native. Pour se faire, des expériences de titration ont été réalisées à 900MHz. En effet, pour rappel, le déplacement chimique d'un atome est un paramètre sensible à l'environnement chimique. Ainsi l'interaction avec le CLR01 sera caractérisée par une variation de déplacement chimique de l'atome considéré. Ceci se traduira sur le spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC par une variation du déplacement chimique et/ou par une perte d'intensité en fonction du régime d'échange de l'interaction. Pour mémoire, le *lysine tweezer* CLR01 cible potentiellement les résidus lysines et arginines de la protéine, l'affinité pour les lysines étant 10 fois supérieure à celle pour les arginines (Dutt et al., 2013). Nous avons donc dans un premier temps

uniquement évalué l'interaction avec les résidus lysines : y'a-t-il une interaction ? Si oui, avec quelles lysines ? Existe-t-il une sélectivité pour certaines lysines ?

L'observation des spectres 1D de la titration montre que seule la région des lysines (proton H $\epsilon$  de la chaîne latérale) est affectée par l'interaction ce qui confirme la spécificité du CLR01 pour ces résidus (**figure 85-A**). Mais cette spécificité est-elle la même pour toutes les lysines de la protéine ?



**Figure 85** : Interaction entre le CLR01 et Tau441 native. **A**-Spectre 1D  $^1\text{H}$  de la titration à différents rapports Tau441:CLR01. **B**-Superposition des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de la titration à différents rapports Tau441 :CLR01. **C-D**-Variations d'intensités des lysines du fragment TauF4 et de Tau441 au cours de la titration. Ces résultats sont obtenus à partir des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC par la mesure de l'intensité des différentes résonances des protons amides des lysines de la protéine Tau.

En effet, même si les 44 lysines peuvent potentiellement être la cible du CLR01, on imagine aisément que cette interaction est aussi dépendante des acides

aminés voisins et de l'accessibilité de la lysine. En d'autres termes l'absence de structure tridimensionnelle fixe caractéristique des IDPs ainsi que l'environnement électronique jouent probablement un rôle dans l'interaction du *lysine tweezer* CLR01 avec la protéine Tau. De ce fait, on peut supposer que certaines lysines seront des cibles préférentielles du CLR01.

Afin de répondre à cette question nous avons réalisé des expériences de titration en deux dimensions. Différents spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC ont été enregistrés pour différents rapports Tau441:CLR01 (**figure 85-B-C**). En parallèle, afin de confirmer les résultats obtenus sur le modèle Tau441 et de simplifier l'analyse, nous avons réalisé le même type d'expérience sur le fragment fonctionnel TauF4 (Huvent et al., 2014) présentant un nombre limité de lysines (**figure 85-D**). L'observation des perturbations de déplacement chimique des protons amides des lysines nous a permis de mettre en évidence 13 sites d'interactions de Tau441 avec le *lysine tweezer* : Lys130/Lys150/Lys174/Lys224/Lys225/Lys240/Lys259/Lys280/Lys290/Lys321/Lys331/Lys353/Lys369 (**figure 85-C**). On remarque que les résidus les plus ciblés par le *tweezer* (variation du déplacement chimique la plus importante) sont localisés principalement dans le domaine de liaison aux microtubules et dans la région riche en proline (**figure 85-C**). Cette interaction se traduit par une diminution de l'intensité des signaux des protons amides des lysines ciblées ce qui suggère donc un régime d'échange rapide entre ces protons et le CLR01. De plus, l'absence d'interactions avec les régions N- et C-terminales de la protéine peut s'expliquer par la nature plus acide de ces domaines (chargés négativement) causant des répulsions électrostatiques avec le CLR01 mais aussi simplement par la faible proportion de lysines dans ces domaines (4 lysines dans les 120 premiers résidus).

Concernant l'interaction avec le domaine de liaison aux microtubules, cette région de la séquence est porteuse des motifs PHF6 ( $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ ) et PHF6\* ( $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ ), deux hexapeptides capable de s'autoassembler et induire la formation des fibres de Tau (von Bergen et al., 2000). On pourrait donc imaginer un mécanisme d'inhibition de l'agrégation de Tau par le *tweezer* par masquage des régions clés de l'agrégation. De plus, même si le *tweezer* n'est pas impliqué dans l'interaction avec les cystéines 291 et 322, on peut tout à fait penser que l'encombrement stérique induit par l'interaction avec les Lys290 et Lys321 voisines générerait la formation des ponts disulfures intermoléculaires. Néanmoins, cette

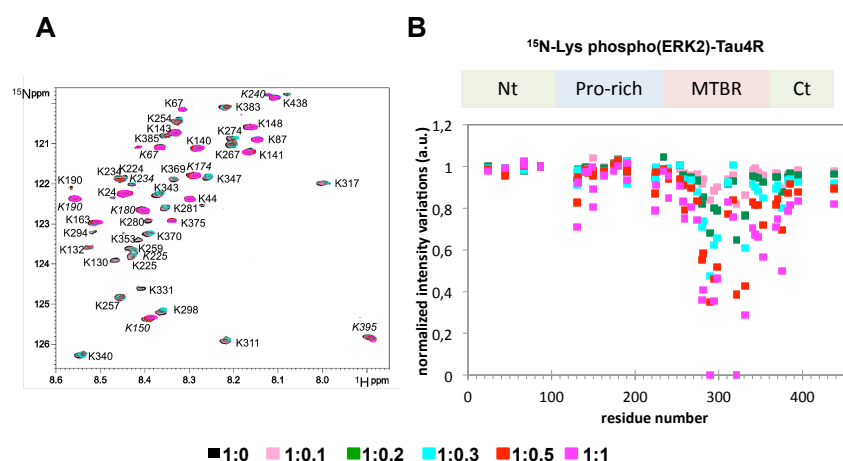


dernière hypothèse est à replacer dans le contexte de la structure des PHFs récemment résolue par cryoEM (Fitzpatrick et al., 2017). En effet, les résultats obtenus ne permettent pas de confirmer la présence de ponts disulfures dans les PHFs isolés de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer. De ce fait, la formation du pont disulfure pourrait être un artefact obtenu lors de l'agrégation *in vitro* de fragments de la protéine Tau.

Ces premiers résultats nous ont permis de mieux comprendre l'interaction entre le *tweezer* et la protéine Tau 441 native. Mais, la protéine Tau étant retrouvée hyperphosphorylée dans les PHFs (Brion et al., 1985), nous pouvons logiquement nous demandé si la phosphorylation perturbe cette interaction ? En effet si la phosphorylation empêchait l'interaction du CLR01 avec Tau, l'utilisation d'une telle molécule dans l'inhibition de l'agrégation serait compromise.

## **B. Interaction du lysine tweezer avec la protéine Tau phosphorylée**

Afin d'étudier l'interaction du CLR01 avec la protéine Tau phosphorylée, nous avons généré un échantillon Tau441, toujours marqué spécifiquement sur les résidus lysines et phosphorylé par ERK2. En effet, l'activité kinase de ERK2 génère un profil de phosphorylation similaire à celui obtenu par utilisation d'un extrait de cerveau de rat (Qi et al., 2016) sans déclencher l'agrégation ce qui nous a donc permis de réaliser les différentes expériences de titration. Ainsi de la même façon que pour l'échantillon natif et après ré-attribution de la protéine Tau sélectivement marquée sur les lysines et phosphorylée par ERK2 (**figure 84-B**), nous avons réalisé la même série d'expériences de titration à 900 MHz. L'analyse des résultats obtenus met en évidence un profil d'interaction entre le CLR01 et Tau441 phosphorylée par ERK2 tout à fait similaire à celui obtenu lors des expériences de titration réalisées avec la protéine Tau native : les 13 mêmes lysines impliquées dans l'interaction sont identifiées (**figure 86**).



**Figure 86** : Interaction entre le CLR01 et la Tau441 phosphorylée par ERK2. **A**-Superposition des différents spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC enregistrés au cours de la titration. **B**-Variations d'intensité des lysines de Tau441 phosphorylée par ERK2 au cours de la titration. Ces résultats sont obtenus à partir de spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC et intégration des différentes résonances.

Cette similarité entre les deux profils d'interaction n'est pas surprenante si l'on replace les sites d'interactions du CLR01 avec la Tau native (**figure 85**) dans le contexte de la phosphorylation par ERK2. En effet, seuls les Lys174 et Lys240 étant à la fois à proximité des sites d'interaction avec le CLR01 et des sites de phosphorylation par ERK2 (pThr175/pSer235), présentent une diminution d'interaction avec le CLR01 (**figure 86-B**). En revanche, les autres sites d'interaction étant éloignés des résidus phosphorylés, il apparaît logique que la phosphorylation ne perturbe pas leur interaction. Sur la base de ces résultats, nous pouvons donc affirmer que la phosphorylation ne perturbe pas l'interaction entre la protéine Tau et le CLR01. Ce dernier pourrait donc être utilisé dans un contexte d'hyperphosphorylation pathologique de Tau sous réserve d'une inhibition efficace de l'agrégation.

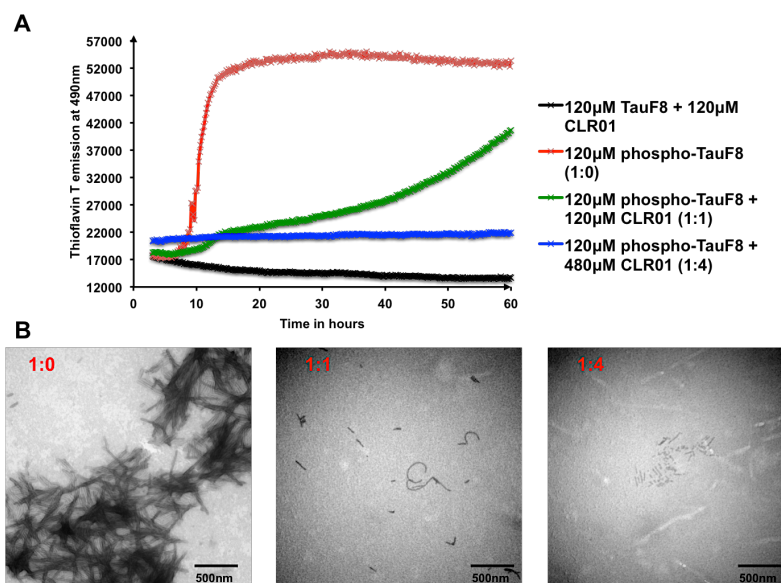
## II. Inhibition de l'agrégation de Tau hyperphosphorylée

### A. Le modèle TauF8 phosphorylée par ERK2

Après avoir démontré que la phosphorylation n'altérerait pas l'interaction entre le CLR01 et Tau, nous nous sommes intéressés au pouvoir inhibiteur de la molécule d'intérêt sur l'agrégation. Lorsque nous avons réalisé les premiers essais d'inhibition *in vitro* de l'agrégation de Tau par le CLR01, le modèle Tau441-S262A phosphorylé

par l'extrait de cerveau de rat n'était pas encore connu. C'est pourquoi nous avons utilisé le fragment TauF8 phosphorylé par ERK2 qui, dans des concentrations supérieures à 120  $\mu\text{M}$ , avait démontré ses propriétés pro-agrégation. Ainsi, nous avons réalisé plusieurs expériences d'agrégation sans inducteur polyanionique telle que l'héparine, suivies par fluorescence de la thioflavine T couplées aux observations en MET. On précise ici que la concentration protéique utilisée étant supérieure à 120  $\mu\text{M}$ , ce test ne peut en aucun cas être considéré comme un moyen de criblage haut débit mais permet de valider/invalider le pouvoir inhibiteur de quelques molécules préalablement sélectionnées par le test classique de l'agrégation induite par l'héparine.

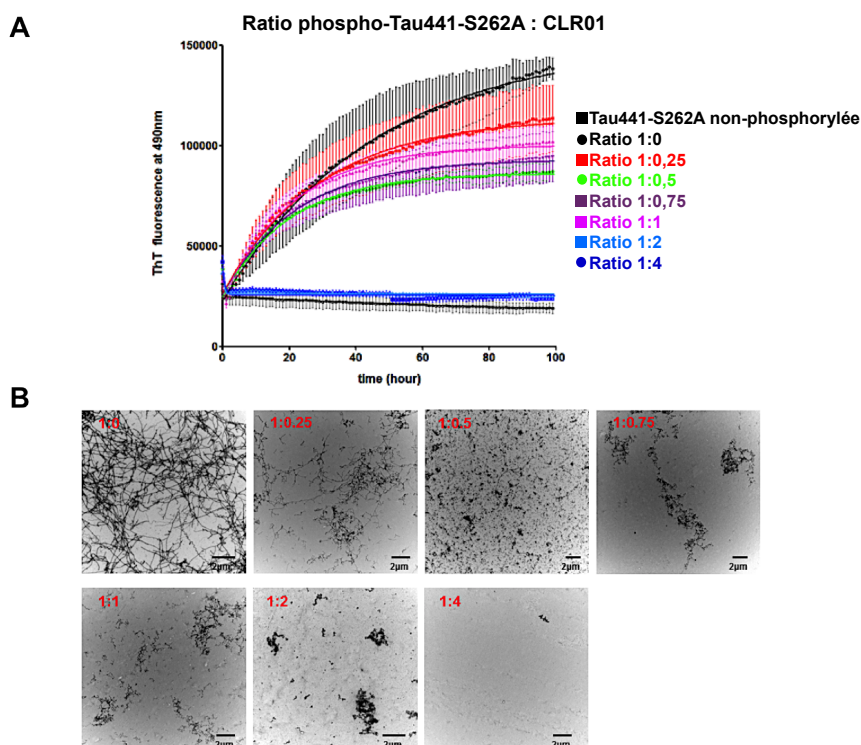
Trois rapports phospho-TauF8:CLR01 ont été testés (1:0 ; 1:1 ; 1:4) (**figure 87**). Les résultats obtenus en fluorescence indiquent une bonne inhibition de l'agrégation par le CLR01 (**figure 87-A**), ce qui est confirmé par les observations en MET avec l'absence quasi-totale de fibres pour le ratio 1:1 (**figure 87-B**). On remarque qu'un excès de CLR01 entraîne une inhibition totale de l'agrégation. Ces premiers résultats suggèrent donc un rôle inhibiteur de l'agrégation joué par le CLR01 dans des conditions d'hyperphosphorylation pathologique.



**Figure 87** : Inhibition de l'agrégation de TauF8 phosphorylée par ERK2 par différentes concentrations de *lysine tweezer* CLR01. **A**-Agrégation (sans inducteurs polyanioniques) suivie par fluorescence de la thioflavine T de phospho-TauF8 en présence de différentes concentrations en CLR01. **B**- Observations en MET des échantillons en fin d'agrégation.

## **B. Le modèle Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat**

Une fois que nous avons déterminé le profil de phosphorylation minimal capable de déclencher l'agrégation de la protéine Tau, nous avons décidé de tester le pouvoir inhibiteur du *lysine tweezer* CLR01 dans le modèle d'agrégation *in vitro* Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat (**figure 88**). De la même façon que précédemment expliqué, nous avons réalisé plusieurs expériences d'agrégation *in vitro* suivies par fluorescence de la thioflavine T et complétées par des observations en MET. Différents rapports phospho-Tau:CLR01 ont été testés dans le but de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition de l'agrégation mis en avant par l'utilisation du fragment TauF8 phosphorylé par ERK2 (**figure 87**). L'analyse des résultats obtenus en fluorescence met en évidence une inhibition de l'agrégation de Tau441-S262A phosphorylée par l'ECR en présence d'un excès de CLR01 sur-stoechiométriques (rapports 1:2 et 1:4) (**figure 88-A**). Par comparaison avec le contrôle positif (ratio 1:0, absence de CLR01) cette inhibition est confirmée par les observations en MET qui révèlent une diminution drastique de la quantité de fibres formées durant le temps d'incubation (**figure 88-B**). En revanche, l'interprétation des résultats se complique pour les concentrations sous-stoechiométriques. En effet, pour les rapports 1:0,25 et 1:0,5 (**figure 88-A, rouge et vert**) on note une diminution de la fluorescence par comparaison avec le contrôle positif qui suggère une diminution de l'agrégation de Tau441-S262A phosphorylée par l'ECR. Les observations en MET confirment cette inhibition puisqu'on note l'existence d'une corrélation positive entre la diminution du nombre de fibres observées et l'augmentation de la quantité de CLR01 : les fibres observées sont moins nombreuses et semblent plus courtes et on note la présence d'oligomères (**figure 88-B**).



**Figure 88** : Inhibition de l'agrégation de Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat (ECR) par le *lysine tweezer* CLR01. **A**-Agrégation (sans inducteurs polyanioniques) de Tau441-S262A phosphorylée par l'ECR suivie par fluorescence de la thioflavine T en présence de différentes concentrations en CLR01. **B**-Observations en MET des échantillons en fin de réaction d'agrégation.

Néanmoins, si l'on s'intéresse aux rapports 1:0,75 et 1:1 (**figure 88-A, violet et rose**), on remarque une ré-augmentation du signal de fluorescence de la ThT par rapport aux rapports inférieurs et les observations en MET mettent en évidence la présence de quelques fibres courtes mais aussi de nombreux oligomères amassés en réseaux (**figure 88-B**). Sur la base de ces observations nous pouvons donc lier la ré-augmentation du signal de fluorescence à la formation d'oligomère pour les rapports 1:0,75 et 1:1.

De façon générale, on constate une inhibition par le *lysine tweezer* CLR01 de l'agrégation de Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat, la diminution de la quantité de fibres observées étant directement corrélée à l'augmentation de la concentration en CLR01. En revanche de façon plus précise, on note que cet effet inhibiteur n'est pas proportionnel et à la quantité de CLR01 présent dans le milieu. En effet, quelques soit la quantité de CLR01 présent dans le milieu, une diminution de la taille et de la quantité des fibres est observée. Néanmoins, les

résultats obtenus en fluorescence ne corrèlent pas parfaitement avec les observations en MET puisqu'une ré-augmentation d'émission de fluorescence de la ThT est observée pour des rapports Tau:CLR01 égaux à 1:0,5 et 1:1. Dans ces conditions, on remarque une augmentation du nombre d'oligomères qui s'organisent en réseau (**figure 88**). Ces résultats semblent suggérer qu'une concentration critique en CLR01 aux alentours de 12,5  $\mu\text{M}$  dans nos conditions expérimentales induirait la formation d'oligomères. Néanmoins, ce phénomène reste inexpliqué et ne permet pas de conclure sur les paramètres d' $\text{IC}_{50}$ . Pour venir compléter ces résultats, une approche *in vivo* utilisant le modèle cellulaire neuronal développé par l'équipe du Dr. Marc Diamond (Holmes et al., 2014) est actuellement mise en oeuvre au sein du laboratoire du Pr. Gal Bitan afin de mettre en évidence une inhibition par le CLR01 de l'activité de *seeding* de phospho-Tau (ERK2 et ECR) et phospho-TauF8 (ERK2).

### III. Conclusions, discussions et perspectives

En conclusion, ces résultats démontrent que le *lysine tweezer* CLR01 est un candidat potentiel dans la course au développement d'un traitement anti-agrégatif de la protéine Tau. En effet, nous avons démontré que la phosphorylation ne gêne pas l'interaction entre la molécule et la protéine-cible, ce qui rend possible l'utilisation du CLR01 dans un contexte d'hyperphosphorylation pathologique. De plus, d'après les premiers résultats obtenus *in vitro*, l'inhibition de l'agrégation est observée même si dans certaines conditions le CLR01 semble favoriser la formation d'oligomères de Tau. Cet aspect reste problématique puisque de nombreuses études démontrent le pouvoir cytotoxique des oligomères de Tau (Shafiei et al., 2017). Néanmoins l'étude menée par Attar et collaborateurs a permis de mettre en évidence le rôle du CLR01 dans la diminution de la charge amyloïde  $A\beta$  ainsi que dans la diminution de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau chez les souris ayant reçu le CLR01 par comparaison aux contrôles non traités (Attar et al., 2012). De plus, les auteurs ont montré *via* le radiomarquage du CLR01 que cette molécule passait la barrière hémato-encéphalique, ce qui reste l'une des étapes critiques dans le développement d'un traitement anti-agrégatif.

En supposant que le CLR01 inhibe l'agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée et que cette hyperphosphorylation ne gêne pas l'interaction avec la molécule d'intérêt, nous pouvons établir un parallèle avec la structure des PHFs

récemment décrite (Fitzpatrick et al., 2017). En effet, pour mémoire le cœur des fibres est essentiellement composé des segments R3 et R4 du domaine de liaison aux microtubules, plus précisément de la région [306-378] de la protéine. On remarque que cette région est porteuse de quatre sites d'interactions avec le CLR01 (Lys321-Lys331-Lys353-Lys369) qui pourraient donc potentiellement entraver la formation des PHFs. De plus, on imagine aisément qu'une interaction entre la Lys321 et le CLR01 gênerait la formation du pont disulfure intermoléculaire permis par la Cys322 et décrit comme essentiel dans l'agrégation de la protéine (Bhattacharya et al., 2001; Schweers et al., 1995). Comme précédemment évoqué, cette hypothèse reste à nuancer puisqu'actuellement rien n'indique la présence de ponts disulfures dans la structure des PHFs isolés de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer. Outre cela, la Lys280 identifiée comme site d'interaction avec le CLR01 fait partie du PHF6\*, hexapeptide impliquée dans l'agrégation de la protéine Tau (von Bergen et al., 2000). Pour finir, nous avons identifié d'autres sites d'interaction entre le CLR01 et la protéine Tau hyperphosphorylée au niveau du domaine riche en proline qui se trouve être largement phosphorylée par différentes kinases (Morris et al., 2015) mais surtout porteur de l'épitope AT8 que nous avons décrit comme moteur de l'agrégation sous sa forme triplement phosphorylée (Despres et al., 2017). De ce fait, on peut aussi imaginer un mécanisme d'inhibition de l'agrégation induit par l'interaction du CLR01 au voisinage de cette région-clé.

Bien que ces premiers résultats nous permettent d'envisager le CLR01 comme inhibiteur potentiel de l'agrégation et soulèvent de nombreuses hypothèses quant au mécanisme d'inhibition, il faut néanmoins replacer le CLR01 dans un contexte cellulaire. En effet, l'environnement cellulaire étant très riche en protéines nous pouvons logiquement nous interroger sur la spécificité du CLR01 pour les résidus lysines de la protéine Tau, une interaction non-spécifique pouvant entraîner un dysfonctionnement cellulaire. Pour répondre à cette question, nous pourrions envisager comme première approche la mise en place d'expériences RMN *in cell*, cette approche ayant déjà été mise en place au laboratoire (Lopez et al., 2016). En effet, suite à l'internalisation de la protéine Tau marquée <sup>15</sup>N dans des cellules neuronales, le CLR01 serait ajouté au milieu et absorbé par les neurones. Suite à cela, l'enregistrement de spectres 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC permettrait de mettre en évidence ou non, une interaction intracellulaire du CLR01 avec la protéine Tau. De

plus dans le contexte de l'agrégation pathologique de la protéine Tau, il s'avère que celle-ci est non seulement phosphorylée mais aussi acétylée (Morris et al., 2015), cette dernière modification ciblant spécifiquement les lysines. Ainsi, on peut supposer que l'acétylation des lysines gênerait l'interaction avec le CLR01 induisant donc une inefficacité de la molécule. Afin de vérifier cela, nous pourrions envisager des expériences d'agrégation *in vitro* de la protéine Tau441-S262A phosphorylée et acétylée qui permettraient de compléter les résultats obtenus au cours de ma thèse.

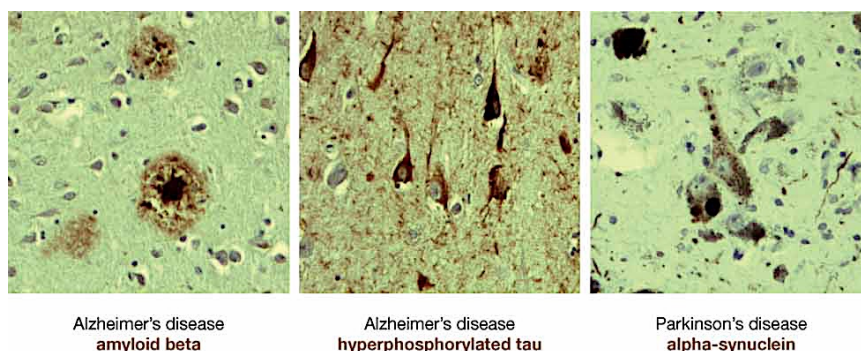
En conclusion, même si l'étude du potentiel rôle inhibiteur du *lysine tweezer* CLR01 mérite d'être approfondie et que les premiers résultats semblent encourageants, de nombreuses expériences supplémentaires utilisant des modèles cellulaires puis animaux doivent être envisagées afin de valider ou non l'efficacité de la molécule. A ce jour, des expériences en conditions cellulaires, complémentaires à notre étude *in vitro*, sont en cours au sein du laboratoire du Pr. Gal Bitan et devraient permettre d'éclaircir et de confirmer ou non, le rôle du CLR01 dans l'inhibition du *seeding* de la protéine Tau.



## **Conclusion générale**



Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la proportion de la population mondiale de plus de 60 ans devrait passer la barre des 20% soit deux milliards de personnes en 2050. La conséquence directe de cet allongement de la durée de vie est la recrudescence de nombreuses pathologies liées à l'âge telles que les maladies neurodégénératives dont les maladies d'Alzheimer et de Parkinson sont les plus tristement célèbres. De manière générale, celles-ci se caractérisent par une détérioration du fonctionnement cérébral associée à la mort cellulaire neuronale appelée neurodégénérescence. Les troubles induits par ces maladies seront directement liés à la zone cérébrale touchée et pourront être d'ordre cognitif, comportemental, sensoriel ou moteur. Par exemple, la maladie de Parkinson est initialement caractérisée par des troubles moteurs (tremblements, raideur musculaire) alors que la maladie d'Alzheimer se déclare généralement par un déclin cognitivo-comportemental (perte de mémoire, troubles du langage). Bien que les maladies neurodégénératives soient différentes du point de vue symptomatique, de nombreuses similitudes cellulaires et moléculaires ont été identifiées. En effet, l'observation en microscopie de coupes de cerveaux de patients atteints par diverses pathologies neurodégénératives a permis de mettre en évidence l'accumulation d'agrégats protéiques (**figure 89**). L'analyse biochimique de ces dépôts intra- ou extra-neuronaux a révélé l'implication de protéines-clés dans le processus neurodégénératif : par exemple, l' $\alpha$ -synucléine pour la maladie de Parkinson, la protéine Tau et le peptide  $A\beta$  pour la maladie d'Alzheimer (Ham et al., 2009).

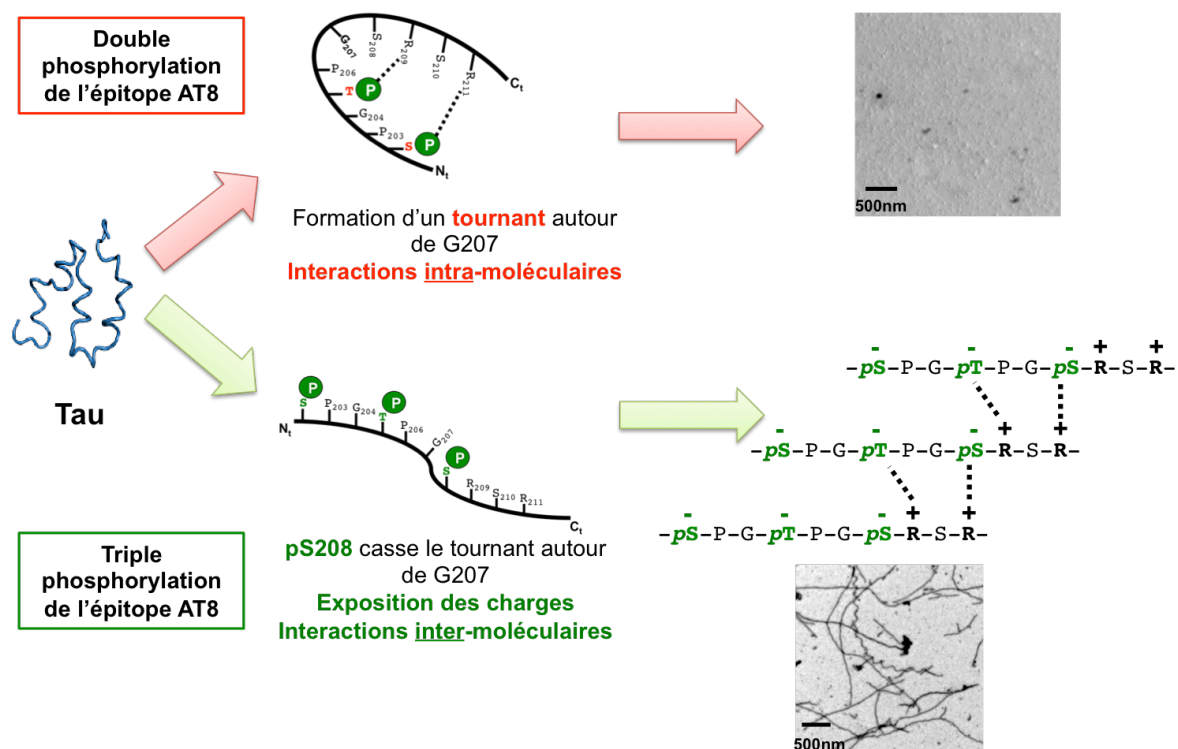


**Figure 89** : Exemple d'agrégats observés sur coupe de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer ou par la maladie de Parkinson (figure adaptée de (Ham et al., 2009)).

Le cerveau des patients atteints par la maladie d'Alzheimer est caractérisé à l'échelle moléculaire par la présence conjointe de deux lésions majeures : les plaques amyloïdes extraneuronales et les fibres intraneuronales appelées PHF (*Paired Helical Filament*) (Goedert and Spillantini, 2006). Alors que les dépôts amyloïdes sont principalement composés de peptide A $\beta$ , la protéine Tau hyperphosphorylée a été identifiée comme constituant majeur des PHFs (Brion et al., 1985; Grundke-Iqbal et al., 1986). Bien que de nombreuses études décrivent la phosphorylation comme une modification post-traductionnelle impliquée dans l'agrégation pathologique de la protéine Tau (Alonso et al., 2001; Chohan et al., 2005) et que la détection *post-mortem* de la maladie repose sur l'identification de phospho-épitope pathologique (Augustinack et al., 2002; Braak et al., 2006), aucune description précise du mécanisme induisant l'agrégation n'est connue. Qui plus est, au-delà de la phosphorylation, la protéine Tau, de par l'absence de structure tridimensionnelle stable, est une cible préférentielle pour les enzymes de modifications (Morris et al., 2015). De ce fait, le rôle d'autres modifications post-traductionnelles dans la protection ou le déclenchement de l'agrégation n'est pas à exclure. C'est pourquoi, durant ces trois années de thèse, nous nous sommes intéressés aux rôles de certaines modifications post-traductionnelles dans le mécanisme moléculaire de l'agrégation de la protéine Tau. En effet, même si l'objectif final reste le développement d'un traitement contre la maladie d'Alzheimer, la connaissance du mécanisme moléculaire pathologique permettra de mieux comprendre le déclenchement et le développement de cette maladie.

Dans un premier temps, nous avons décidé d'étudier le rôle de la phosphorylation dans le processus pathologique de l'agrégation de la protéine Tau. Par la mise en place d'une stratégie *in vitro* combinant activités kinases (ERK2 ou extrait de cerveau de rat), caractérisation par RMN de la protéine Tau phosphorylée et agrégation *in vitro* sans inducteurs polyanioniques, nous avons confirmé le rôle majeur joué par l'hyperphosphorylation de Tau dans le processus d'agrégation. De plus, nous décrivons ici pour la première fois le profil de phosphorylation minimal conduisant à l'agrégation qui se résume à l'AT8 triplement phosphorylé Ser202/Thr205/Ser208 en l'absence de phosphorylation de la Ser262 précédemment décrite comme inhibitrice de l'agrégation (Schneider et al., 1999). En effet, la double phosphorylation de l'épitope AT8 entraîne la formation d'un tournant autour de la

Gly207 qui joue un rôle protecteur contre l'agrégation (**figure 90**) (Gandhi et al., 2015). Ce tournant se résume à l'interaction électrostatique intramolécule entre les groupements phosphates portés par les chaînes latérales des résidus pSer202 et pThr205 et les chaînes latérales des résidus Arg209 et Arg211 (**figure 90**). Le troisième site de phosphorylation, la pSer208, vient déstabiliser ce tournant permettant ainsi l'ouverture du motif et l'exposition des charges positives et négatives qui se révèlent être le moteur de l'agrégation (**figure 90**). Ainsi le processus d'agrégation de la protéine Tau se déroule en deux phases successives : l'ouverture du tournant AT8 par la triple phosphorylation et le démarrage de la polymérisation par les interactions électrostatiques inter-moléculaires.



**Figure 90** : Représentation schématique du mécanisme moléculaire putatif, initiateur de l'agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée.

Après modélisation 3D du tournant AT8 dans le cas di-phosphorylé ayant été modélisée, celle de la version triplement phosphorylée montrant l'ouverture du tournant AT8 est envisagée en collaboration avec le Dr. Neha S. Gandhi (School of Mathematical Sciences, Queensland University of Technology, Brisbane, Australie). De plus, les résultats obtenus par l'agrégation *in vitro* du mutant Tau441-S262A-2RA

(R209A et R211A) phosphorylé par l'extrait de cerveau de rat corroborent cette hypothèse d'ouverture du tournant puisque l'absence des résidus arginines entraîne l'inhibition de l'agrégation en dépit d'un profil de phosphorylation optimal pour l'agrégation. A ce jour, des expériences RMN sont en cours afin de confirmer du point de vue structural l'implication des arginines dans le mécanisme pathologiques de l'agrégation. Afin de prouver les changements conformationnels de l'épitope AT8 triplement phosphorylé, des expériences RMN de type PRE (*Paramagnetic Relaxation Enhancement*) sont en cours sur la protéine Tau441-AT8 doublement (Ser202/Thr205) ou triplement (Ser202/Thr205/Ser208) phosphorylée. De plus ces expériences permettront, ou non, de mettre en évidence des changements structuraux à longue distance induits par la phosphorylation de l'épitope AT8.

Sur la base de ces résultats se pose tout d'abord la question de la détection et de la progression de la maladie d'Alzheimer telle que l'a défini le médecin Allemand Heiko Braak (Braak and Braak, 1991). En effet, l'épitope AT8 est retrouvé chez les patients atteints de la maladie mais aussi au stade du développement embryonnaire, alors que les fœtus ne sont pas atteints de la maladie. Nous pouvons donc supposer que l'épitope AT8 reconnu au stade embryonnaire serait en fait l'AT8 doublement phosphorylé formant le tournant et étant donc protecteur de l'agrégation alors que dans le cas de patients atteints de la maladie, l'épitope détecté serait la version triplement phosphorylée conduisant à l'agrégation. De plus, la protéine Tau fait partie de la famille des MAP (*microtubule associated protein*) et joue un rôle dans la polymérisation et la stabilisation des microtubules. De nombreuses études démontrent l'inhibition de l'activité MAP par la phosphorylation de la protéine Tau (Alonso et al., 1994; Biernat et al., 1993; Lindwall and Cole, 1984; Mandelkow et al., 1995) ce qui soulève la question des conséquences du profil de phosphorylation que nous décrivons ici sur la capacité qu'a Tau à polymériser et stabiliser les microtubules et plus particulièrement le rôle de la phosphorylation de la Ser208 sur cette activité. Au laboratoire, Amniai et collaborateurs ont démontré que la phosphorylation conjointe des épitopes AT8 (pSer/pThr205) et AT180 (pThr231/pSer235) induisait une inhibition de la polymérisation des microtubules mais n'entraînait pas le détachement de Tau des microtubules (Amniai et al., 2009). En revanche la phosphorylation de la Ser214 par PKA (Schneider et al., 1999; Sillen et al., 2007) ou celle de la Ser262 par MARK (Biernat et al., 1993; Drewes et al.,

1997; Schneider et al., 1999) se traduit par une diminution de l'affinité de Tau pour les microtubules. Dans ces conditions, il est difficile de conclure sur la capacité de liaison et de polymérisation des microtubules par la protéine Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat. D'une part, la Ser214 n'étant pas phosphorylée par l'activité kinase de l'ECR (Despres et al., 2017; Qi et al., 2016) et la Ser262 étant mutée en A262, on peut supposer que notre modèle se liera aux microtubules mais perdra sa capacité de polymérisation de la tubuline puisque les épitopes AT8 et AT180 seront phosphorylés. D'autre part, le domaine riche en proline étant essentiel dans l'interaction Tau/microtubules (Gustke et al., 1994; Mandelkow et al., 1995; Mukrasch et al., 2007) et présentant une affinité pour les microtubules supérieures à celle du MBD (Fauquant et al., 2011) on peut imaginer que la phosphorylation de la Ser208 au sein de ce domaine PR permettrait le détachement de Tau des microtubules. De ce fait, si l'on se focalise sur l'épitope AT8, le troisième site de phosphorylation, la Ser208, induirait le détachement de Tau des microtubules et l'agrégation de la protéine Tau. Bien évidemment ce raisonnement n'est qu'hypothétique et des expériences supplémentaires sont envisagées afin de répondre à ces questions.

En résumé, la détermination du profil minimal de phosphorylation induisant l'agrégation pose la Ser208 comme l'un des résidus-clés dans le mécanisme pathologique de l'agrégation et soulève la question du dialogue et de la compétition entre les modifications post-traductionnelles puisque les résidus Ser/Thr peuvent être la cible des kinases mais aussi des glycosyl-transférases. En effet, bien que la phosphorylation soit la modification post-traductionnelles ciblant Tau la plus abondante, de nombreuses autres modifications ont été identifiées. C'est pourquoi, suite à l'obtention de ces résultats, nous nous sommes intéressés au lien entre acétylation/phosphorylation et O-GlcNAcylation/phosphorylation ainsi qu'aux conséquences de ces doubles modifications sur la capacité d'agrégation *in vitro* de la protéine Tau.

Tout d'abord, l'étude du lien entre l'O-GlcNAcylation et la phosphorylation m'a permis de m'initier à la synthèse peptidique ainsi qu'à l'utilisation de la stratégie de l'EPL (*expressed protein ligation*) grâce à mes différents séjours au sein du laboratoire du Pr. Christian Hackenberger (FMP-Berlin, Allemagne). Par l'utilisation de cette stratégie hémisynthétique permettant d'introduire de manière spécifique et

quantitative les modifications souhaitées, nous avons abordé la notion de dialogue entre phosphorylation et O-GlcNAcylation à travers l'étude de deux épitopes pathologiques : l'AT8 et le PHF-1 respectivement potentiellement O-GlcNAcylés sur les Ser208 (Smet-Nocca et al., 2011) et Ser400 (Morris et al., 2015). Dans les deux cas, nous avons rencontré des problèmes de rendement qui nous ont obligé à reconsidérer la stratégie globale et proposer des alternatives permettant d'augmenter les rendements. Pour l'épitope PHF-1, nous avons mis au point une stratégie de ligation C-terminale en une étape réalisée entre le peptide triplement phosphorylé [390-441]pSer396/pSer400/pSer404 et la protéine Tau[1-389]. Concernant l'étude de l'épitope AT8, nous avons opté pour une stratégie de ligation N-terminale entre le peptide AT8 [192-227] et la partie recombinante [228-324] du fragment TauF8. Afin d'éviter les problèmes de rendement et le risque d'agrégation du peptide AT8 triplement phosphorylé, le peptide synthétisé est porteur de la Ser208 phosphorylée ou O-GlcNAcylée et subira l'activité kinase ERK2 avant l'étape de ligation. A ce jour, la collaboration avec le Pr. Christian Hackenberger se poursuit et nous espérons pouvoir réaliser les expériences d'agrégation *in vitro* des protéines doublement modifiées afin de mettre en évidence ou non, le rôle de l'O-GlcNAcylation dans le contexte de l'agrégation. En effet, sur la base de notre étude mettant en avant le rôle central de la triple phosphorylation pSer202/pThr205/pSer208 de l'épitope AT8, il serait intéressant d'étudier les conséquences structurales et fonctionnelles de l'épitope AT8 pSer202/pThr205/O-GlcNAcSer208 : l'O-GlcNAcylation de la Ser208 empêche-t-elle la formation du tournant induit par la double phosphorylation Ser202/Thr205 ? Quel est le rôle de l'O-GlcNAc porté par la Ser208 sur l'agrégation en l'absence de la triple phosphorylation ?

Concernant l'étude du dialogue entre acétylation et phosphorylation, nous avons mis en évidence une interconnexion entre ces modifications post-traductionnelles au niveau du fragment TauF8. Du point de vue quantitatif, alors que l'acétylation par CBP n'affecte pas la phosphorylation par ERK2, une diminution globale du niveau d'acétylation est observée lorsque le fragment TauF8 est préalablement phosphorylé. De plus, les expériences d'agrégation *in vitro* sans inducteurs polyanioniques des échantillons phosphorylés et/ou acétylés a permis de mettre en évidence le rôle inhibiteur de l'acétylation dans le mécanisme pathologique d'agrégation de la protéine Tau phosphorylée. Ces résultats préliminaires ayant été



obtenus par l'utilisation du fragment TauF8, l'utilisation du modèle Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat couplée à l'acétylation par CBP est envisagée afin de valider ou non le rôle inhibiteur de l'acétylation dans le processus d'agrégation.

Pour finir, du point de vue thérapeutique, l'établissement du profil de phosphorylation induisant l'agrégation grâce au modèle d'agrégation *in vitro* Tau441-S262A phosphorylée par l'extrait de cerveau de rat nous a permis de re-tester le rôle potentiellement inhibiteur du *lysine tweezer* CLR01 dans l'agrégation. Nous avons tout d'abord démontré par RMN que la phosphorylation ne perturbe pas l'interaction de la molécule d'intérêt avec la protéine. De plus, par des expériences d'agrégation *in vitro*, nous avons observé une inhibition de l'agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée par l'extrait de cerveau en présence de CLR01. Ces premiers résultats suggèrent donc l'utilisation potentielle du CLR01 dans le contexte de l'hyperphosphorylation pathologique de la protéine Tau conduisant à l'agrégation. Néanmoins, le mécanisme d'inhibition reste inconnu à ce jour et des expériences *in cellulo* sont en cours afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro*.

En conclusion générale, par la mise en place d'une stratégie d'étude *in vitro*, ces trois années de thèse nous ont permis d'avancer dans la compréhension du mécanisme pathologique d'agrégation de la protéine Tau principalement par la redéfinition de la notion d'hyperphosphorylation pathologique observée dans la maladie d'Alzheimer. Cette nouvelle avancée soulève de nouvelles questions synonymes de défis scientifiques à relever. Répondre à ces questions permettrait d'avancer dans la compréhension du mécanisme pathologique de la maladie d'Alzheimer et, je l'espère, permettrait ainsi de développer un moyen de lutte efficace contre cette maladie.



# **Matériels et Méthodes**



## I. Expression et purifications des protéines recombinantes

### A. Protéine Tau et mutants

#### i. Protocole d'expression

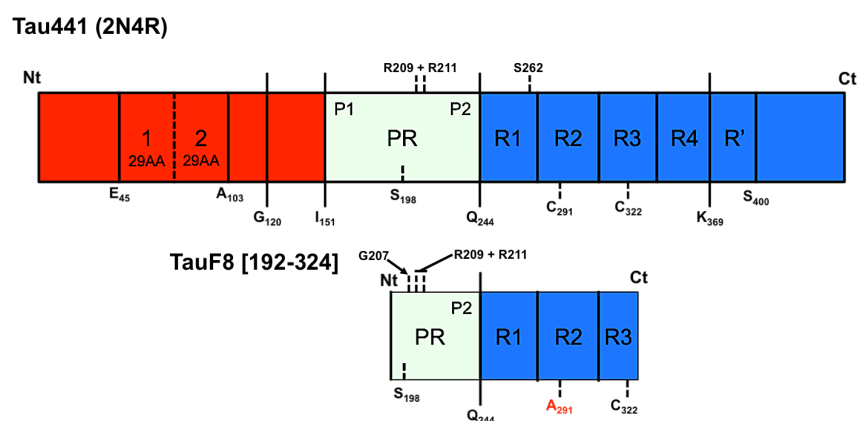
##### a. Banque d'ADN plasmidique

Afin d'étudier le lien entre modifications post-traductionnelles et agrégation, nous avons généré différentes constructions de Tau non-étiquetées, toutes clonées dans le plasmide pET15b (ampicilline<sup>R</sup>) et résumées dans le **tableau 8**.

Tau441 (2N4R)	Fragment TauF8 [192-324]
Tau441 sauvage	TauF8-C291A
Tau44-S262A	TauF8-C291A-S262A
Tau441-S262A-R209A-R211A	TauF8-C291A-S262A-R209A-R211A
Tau441-AT8	TauF8-C291A-G207V

**Tableau 8** : Liste des différentes constructions générées.

Le fragment TauF8 [192-324] correspond à une version raccourcie de la protéine Tau, constituée d'une partie de la région riche en proline porteuse de l'épitope AT8, et du domaine de liaison aux microtubules tronqué au milieu du R3 (**figure 91**). De plus, la mutation de la cystéine 291 permet d'éviter la formation d'un pont disulfure intramoléculaire incompatible avec l'agrégation.



**Figure 91** : Représentation schématique des constructions de la protéine Tau étudiée

La séquence du mutant AT8 est basée sur l'étude menée au laboratoire par Qi et collaborateurs (Qi et al., 2016). Ayant identifié les sites de phosphorylation de Tau par l'extrait de cerveau de rat, nous avons généré un mutant Tau441 dont la plupart des sites identifiés ont été mutés en alanine : seuls les résidus Ser202, Thr205 et Ser208 sont conservés (**figure 92**).

```

1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKEAPLQA 50
51 PTEDGSEEPG SETSDAKSAP TAEDVTAPLV DEGAPGQAA AQPHEIPEG 100
101 TTAEAEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK 150
151 IAAPRGAAPP GQKQANATR IPAKAPPAPK APPSSGEPPK AGDRSGYSA 200
201 GSPCTPGSRS RTPSLPAPPT REPKKVAVVR APPKAPSSAK SRLQTAPVPM 250
251 PDLKNVSKI GATENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV 300
301 PGGGSVQIVY KVPDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKDFDRV 350
351 QSKIGALDNI THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKAPVVS 400
401 GDTAPRHLSN VSSTGSIDMV DAPQLATLAD EVSASLAKQG L 441

```

**Figure 92** : Séquence peptidique du mutant Tau441-AT8 dans laquelle **tous les sites de phosphorylation ont été mutés en alanine (bleu)** sauf les résidus **Ser202/Thr205/Ser208 (rouge)**.

## b. Marquages isotopiques et expression recombinante

Toutes ces protéines sont produites suivant un protocole bien établi dans le laboratoire, utilisant la voie recombinante par la transformation de bactérie *E. coli* BL21 DE3 électro- ou chimio-compétentes. Les bactéries transformées sont étalées sur boîte LB/agar contenant de l'ampicilline à 100 µg/L et incubées une nuit à 37°C. Une pré-culture liquide à 37°C sous agitation, toujours en milieu LB/ampicilline (100µg/L), est ensuite réalisée à partir d'une colonie. La DO<sub>600nm</sub> est alors suivie jusqu'à 0,8 (phase exponentielle de croissance) puis 10 mL sont prélevés afin d'inoculer 1 L de milieu minimum M9 complétementé avec les différentes sources de minéraux, carbone et azote nécessaires à la croissance bactérienne. En fonction du marquage isotopique souhaité, différents isotopes seront utilisés. La composition d'un litre de milieu M9 reconstitué en fonction du type de marquage isotopique est résumée dans le **tableau 9**.

Pour 1L de milieu M9	<sup>15</sup> N uniforme	<sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C	<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Lysine	<sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C-Lys + <sup>13</sup> C uniforme
Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 4g	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 2g	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 4g	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 2g
Chlorure d'ammonium (NH <sub>4</sub> Cl)	<sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl 1g	<sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl 1g	NH <sub>4</sub> Cl 1g	NH <sub>4</sub> Cl 1g
Isogro (Sigma)	Isogro <sup>15</sup> N 0,5g	Isogro <sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C 0,5g	---	---
Lysine marquée (ajoutée 20min avant induction)	---	---	<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Lysine 150mg	<sup>15</sup> N <sub>2</sub> / <sup>13</sup> C-Lysine 150mg
MgSO <sub>4</sub> 1M	1mL	1mL	1mL	1mL
CaCl <sub>2</sub> 1M	100μL	100μL	100μL	100μL
Vitamines 100X (Sigma)	10mL	10mL	10mL	10mL
Ampicilline (100mg/mL)	1mL	1mL	1mL	1mL

**Tableau 9** : composition d'un litre de milieu M9 en fonction du marquage isotopique.

La culture inoculée est ensuite incubée à 37°C sous agitation (170 RPM) jusqu'à atteindre une DO<sub>600nm</sub> comprise entre 0,8 et 1. Une fois cette valeur atteinte, l'expression protéique est induite par ajout d'IPTG à 500 μM finaux durant 2h45 à 37°C sous agitation (170 RPM). Dans le cas du marquage spécifique des lysines, 150 mg de lysine marquée sont ajoutés 20 minutes avant induction.

Lorsque l'étape d'induction est terminée, la culture est centrifugée 30 minutes à 6000 g à 4°C. Les bactéries sont ensuite re-suspendues dans 30 mL de tampon d'extraction : 50 mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> pH 6,2 ; 2,5 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 1% Triton X100 ; RNase A 10 mg/mL ; DNase I 1 mg/mL ; cocktail d'inhibiteurs de protéases EDTA free (Roche). Pour finir, les protéines sont extraites par lyse cellulaire (système EMUSILFLEX) suivie d'une centrifugation à 30000 g, 30 minutes à 4°C. Le

surnageant est ensuite pré-purifiées par chauffage à 75°C induisant une précipitation des protéines structurées. De la même façon qu'après l'étape de lyse, une centrifugation à 30000 g est réalisée et le surnageant est filtré sur membrane 0,45 microns afin d'éliminer les éventuels agrégats pouvant entraîner des problèmes de pression lors de l'étape chromatographique (colmatage de la colonne).

## ii. Purification par chromatographie

La protéine Tau sauvage, mutante ou le fragment F8 [192-324] sont purifiés par chromatographie liquide moyenne pression (système AKTA *purifier*) sur colonne échangeuse de cations (HiTrap SP HP, 5 mL, GE Healthcare) à pH 6,2. Après équilibration de la colonne dans le tampon A (50 mM  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  pH 6,2 ; 2,5mM EDTA, le lysat est chargé sur la colonne à un débit de 0,5 mL/min ce qui entraîne une augmentation du signal UV à 280nm en sortie de colonne. Lorsque celui-ci est de retour à la ligne de base, la colonne est lavée par cinq volumes de colonne avec le tampon A à 1 mL/min. L'élution se fait par un gradient de tampon B (tampon A + 2M NaCl) : 0 à 100% en 20 minutes à un débit de 1 mL/min. Des fractions de 0,5 mL sont recueillies et une analyse par électrophorèse SDS-PAGE est réalisée afin de ne conserver que les fractions d'intérêt.

Concernant l'analyse des fractions par électrophorèse SDS-PAGE, le taux de réticulation (T) du gel est différent en fonction de la protéine purifiée : un gel à T=12% est utilisé lors des purifications de Tau441 sauvage ou mutée alors qu'un gel à T=15% est nécessaire pour l'analyse des fractions de purification du fragment F8 ; 10  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont prélevés et mélangés à 10 $\mu\text{L}$  de bleu de charge Laemmli. Le mélange réactionnel est chauffé à 99°C durant 10 minutes, brièvement centrifugé et l'intégralité est déposée sur le gel. La migration est réalisée à 180 V durant 60 à 80 minutes. Le gel est ensuite révélé par utilisation de bleu de Coomassie.

Suite à l'analyse sur gel, les fractions sélectionnées sont chargées sur une colonne de dessalage (HiPrep 26/10 *Desalting column*, GE Healthcare) préalablement équilibrée avec un tampon bicarbonate d'ammonium à 50 mM. Le dessalage est réalisé à un débit de 5mL/min et des fractions de 5 mL contenant la protéine d'intérêt dessalée sont recueillies, congelées à l'azote liquide et lyophilisées.



## B. Enzymes recombinantes

### i. Production des kinases ERK2 et MEK R<sub>4</sub>F

#### a. ADN plasmidique et protocole d'expression

Les deux enzymes nécessaires aux réactions de phosphorylation doivent être fraîchement produites. His-ERK2 (His6-tagged p42 MAP kinase de *Xenopus laevis*) et GST-MEK R<sub>4</sub>F (mutant constitutivement activé) sont respectivement clonées dans les vecteurs d'expression T7 et pGEX porteurs du gène de résistance à l'ampicilline.

La culture (*E. coli* BL21 DE3) est réalisée en milieu LB, à 37°C, 160 RPM. Lorsque la DO<sub>600nm</sub> atteint 0,9, l'induction par l'IPTG à 500 µM est lancée, ceci durant 4h à 30°C. Les enzymes sont ensuite extraites par lyse cellulaire (système EMULSIFLEX). Le lysat est ensuite centrifugé à 30000 g durant 30 minutes à 4°C : le surnageant est alors immédiatement purifié. On note que les étiquettes portées par les protéines ne gênent en rien l'efficacité des réactions.

#### b. Purification

His-ERK2 est purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (Ni-NTA 1mL, Thermo Science) préalablement équilibrée dans un tampon A (50 mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> pH 7,6 ; 300 mM NaCl ; 10 mM imidazole). Le lysat est chargé sur la colonne à un débit de 0,5 mL/min, ce qui entraîne une augmentation du signal UV à 280nm en sortie de colonne. Lorsque celui-ci est de retour à la ligne de base, la colonne est lavée par cinq volumes de colonne avec le tampon A à 1 mL/min. L'élution est réalisée sans gradient par 50 mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> pH 7,6 ; 300 mM NaCl ; 250 mM imidazole. Des fractions de 1 mL sont collectées et analysées sur gel SDS-PAGE (T=12%) permettant la sélection des fractions d'intérêt. Celles-ci seront utilisées pour la réaction de phosphorylation suite à un changement de tampon sur colonne Zeba™ Spin MWCO 7 kDa (1 ou 2 mL) : l'enzyme est alors dans le tampon de phosphorylation et prête à être utilisée. La quantité de protéine est estimée par utilisation du système Nanodrop permettant de déterminer l'absorbance à 280 nm.

GST-MEK R<sub>4</sub>F est purifiée par chromatographie d'affinité en *batch* (100 µL de résine par mL d'extrait) sur résine Glutathione Sepharose 4b (GE Healthcare) préalablement équilibrée dans 50 mM Tris-HCl, pH7,5, 1 mM EDTA, 300 mM NaCl.

L'incubation est réalisée durant une nuit à 4°C sous agitation douce afin d'éviter la sédimentation de la résine. Celle-ci est ensuite lavée abondamment 4 fois dans le tampon d'équilibration. L'étape d'élution est réalisée en 2 incubations successives de 30 minutes à température ambiante dans 50 mM Tris-HCl, pH7,5, 1 mM EDTA, 300mM NaCl, 20mM Glutathion réduit. On note qu'entre chaque incubation, l'échantillon est centrifugé à 500 g 5 minutes et le surnageant (fraction d'élution) est récupéré. Les deux fractions d'élutions sont alors groupées et analysées sur gel SDS-PAGE (T=12%) pour vérifier la présence de l'enzyme. Suite à cela, celles-ci sont concentrées sur membrane (Sartorius Vivaspin Turbo 4, MWCO 30 kDa) jusqu'à 1 mL. L'unique fraction est ensuite mise dans le tampon de phosphorylation par un changement de tampon sur colonne Zeba™ Spin MWCO 7 kDa et prête à être utilisée. On note que la quantité d'enzyme produite est faible mais suffisante pour activer ERK2.

## **ii. Production du fragment [1202-1848] de l'acétyl-transférase CBP**

### **a. ADN plasmidique et protocole d'expression**

Le fragment [1202-1848] de la protéine CBP porteur de l'activité HAT (*Histone-Acetyl-Transferase*) est cloné dans le plasmide pGEX-6P-1. La protéine est exprimée dans le système bactérien BL21-DE3 en milieu LB-ampicilline (100 µg/mL). La pré-culture en milieu LB-ampicilline est incubée à 37°C sous agitation (170 g) jusqu'à atteindre une DO<sub>600nm</sub> comprise entre 0,6 et 0,8 ; 10 mL sont alors prélevés pour inoculer 1 L de culture.

La cultureensemencée est ensuite incubée à 37°C sous agitation (170 g) jusqu'à atteindre une DO<sub>600nm</sub> comprise entre 0,8 et 1. Une fois cette valeur atteinte, l'expression protéique est induite par ajout d'IPTG à 500 µM finaux durant 4 h à 18°C sous agitation (170 g). L'induction terminée, la culture est centrifugée 30 minutes à 6000 g à 4°C. Les bactéries sont ensuite re-suspendues dans 30 mL de tampon d'extraction (PBS ; 10% glycérol ; 1% Triton X100 ; 10 mM EDTA ; cocktail d'inhibiteurs de protéases EDTA free (Roche)). Pour finir, les protéines sont extraites par lyse cellulaire (système EMUSILFLEX) suivie d'une centrifugation à 30000 g, 30 minutes à 4°C. Le surnageant est alors prêt à être purifié.

## **b. Purification**

La purification est réalisée en *batch* sur billes de Glutathione Sepharose 4b (GE Healthcare) préalablement équilibrées dans le tampon d'acétylation (25mM HEPES-KOH pH 7,8 ; 1 mM Tris-phosphine ; 0,1 mM EDTA, 50% de glycérol). L'incubation (25 µL de résine par mL de surnageant) est réalisée durant 3 h à 4°C sous agitation douce afin d'éviter la sédimentation de la résine. Celle-ci est ensuite lavée abondamment 4 fois dans le tampon d'équilibration. L'enzyme est conservée sur la résine à -20°C jusqu'à utilisation. On note que la quantité de protéine est grossièrement estimée sur gel SDS-PAGE à 10%.

## **II. Protocoles de phosphorylation et d'acétylation de Tau**

### **A. Phosphorylation *in vitro* par ERK2**

La phosphorylation de Tau par ERK2 nécessite l'activation de la kinase par MEK R<sub>4</sub>F. Cette réaction d'activation est réalisée dans le même tampon que la réaction de phosphorylation (50mM HEPES/KOH pH 8, 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 5 mM ATP). Ainsi, dans le tampon de réaction sont ajoutées les deux kinases ainsi que la protéine Tau. Le mélange réactionnel est incubé à 37°C durant 18 h. Les enzymes sont ensuite inactivées par chauffage à 75°C, 15 minutes. Après centrifugation 16 000 g pendant 30 minutes à 4°C, la phosphorylation est vérifiée sur gel SDS-PAGE (T=10%) : un retard de migration doit être observé pour l'échantillon phosphorylé par comparaison avec l'échantillon non-phosphorylé. La protéine phosphorylée peut être dessalée sur colonne PD-10 G25 (GE-Healthcare) dans un tampon 50 mM bicarbonate d'ammonium puis lyophilisée ou utilisée pour différents tests d'activité. Dans ce cas, un changement de tampon est réalisé par utilisation de colonne de dessalage Zeba™ Spin MWCO 7 kDa.

### **B. Phosphorylation *in vitro* par l'extrait de cerveau de rat**

#### **i. Production de l'extrait**

Le rat (250 à 300 g) est sacrifié par décapitation et le cerveau (4 à 5 g) récupéré après dissection et élimination de la substance blanche. Celui-ci est tout

d'abord rincé dans 10 mL de PBS froid puis dans le tampon d'homogénéisation (Tampon H : 50 mM Tris-Cl pH 7,4, 2,5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1  $\mu$ M acide okadaïque, inhibiteurs de protéases 1X) ; 2,5mL de tampon H par gramme de cerveau sont ensuite ajoutés et l'ensemble est homogénéisé dans un Potter en verre-téflon à 4°C. A partir de cette étape, toutes les précautions sont prises pour que l'extrait reste à 4°C. L'homogénat est centrifugé 1 h à 42000 g. Pour finir, le surnageant est récupéré et constitue l'extrait brut qui sera utilisé pour la phosphorylation. Un dosage Bradford (gamme étalon avec la BSA) est réalisé avant utilisation de l'extrait afin d'estimer la concentration protéique de l'extrait qui est en moyenne de 9 à 12 mg/mL.

## ii. Réaction de phosphorylation

3 mg de Tau marquée sont dissous dans 4,5 mL de tampon HMED (40mM HEPES/KOH pH 7,3, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 2 mM DTT) pour atteindre une concentration finale d'environ 10-15  $\mu$ M ; 1 $\mu$ M d'acide okadaïque est ensuite ajouté pour bloquer l'activité phosphatase contenue dans l'extrait de cerveau. Pour finir, 2mM ATP, inhibiteurs de protéases 1X et 500  $\mu$ L d'extrait sont successivement ajoutés et le mélange réactionnel est incubé précisément 24h à 37°C. La réaction de phosphorylation est arrêtée par chauffage du mélange réactionnel à 75°C durant 15 minutes. Après centrifugation 16000 g pendant 30 minutes à 4°C, la phosphorylation est vérifiée sur gel SDS-PAGE (T=10%) : un retard de migration doit être observé pour l'échantillon phosphorylé par comparaison avec l'échantillon non-phosphorylé. Pour finir, la protéine phosphorylée est dessalée sur colonne PD-10 G25 (GE-Healthcare) dans un tampon 50 mM bicarbonate d'ammonium puis lyophilisée.

## **C. Acétylation *in vitro* par le fragment de CBP [1202-1848]**

L'activité HAT du fragment de la CBP est préalablement contrôlée sur un peptide de la protéine TDG (Thymine DNA glycosylase).

La réaction d'acétylation est directement réalisée par mélange de la protéine Tau et de la résine sur laquelle est fixée l'enzyme. La protéine Tau est donc resuspendue dans le tampon d'acétylation (25 mM HEPES-KOH pH 7,8 ; 1 mM Tris-

phosphine ; 0,1 mM EDTA) à une concentration finale de 100  $\mu$ M en présence de 4mM d'acétyl-Coenzyme A. L'échantillon est incubé avec 100  $\mu$ L de résine, porteuse de l'activité HAT, durant une nuit (12 à 16h) à température ambiante.

L'échantillon acétylé est ensuite centrifugé à 4000 g durant 5 minutes de manière à sédimenter les billes. Le surnageant est injecté sur colonne C8 semi-préparative afin d'éliminer l'excès d'acétyl-CoA. Les fractions d'intérêt sont ensuite congelées à l'azote liquide et lyophilisées.

### **III. Analyse du profil de modifications et agrégation**

#### **A. Analyse des modifications par résonance magnétique nucléaire (RMN)**

##### **i. Préparation des échantillon**

La RMN étant une technique relativement peu sensible, la protéine Tau et le fragment F8, enrichis en isotopes stables, sont analysés à des concentrations supérieures ou égales à 100  $\mu$ M. Les protéines lyophilisées sont reprises dans le tampon d'analyse (50 mM  $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$  pH 6,2 ; 25 mM NaCl ; 2,5 mM EDTA ; 1 mM DTT, 10% de  $\text{D}_2\text{O}$ , 1mM de TMSP servant de référence). En fonction de la quantité de protéine disponible et donc du volume de tampon ajouté pour se situer dans la bonne gamme de concentration, différents tubes peuvent être utilisés : 3 mm (180  $\mu$ L), 5 mm (500  $\mu$ L) et Shigemi 5mm (300  $\mu$ L).

Les peptides de Tau non marqués, sont analysés pour des concentrations supérieures au mM. Les peptides sont solubilisés dans le tampon d'analyse précédemment cité. On note que le pH doit être impérativement contrôlé en raison de la présence potentielle d'ion TFA résiduels, amenés lors de la purification en phase inverse.

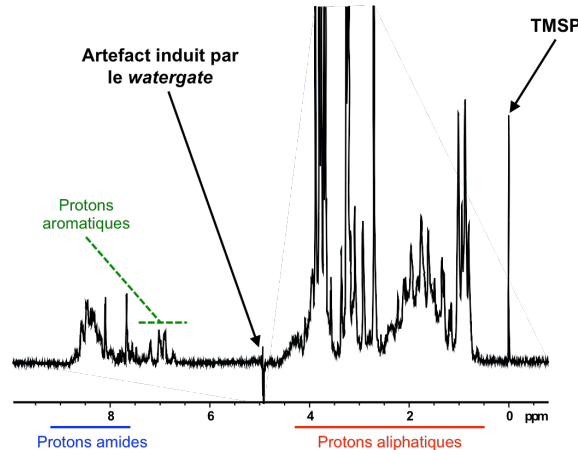
##### **ii. Analyse RMN**

Les différentes expériences RMN ont été enregistrées sur des spectromètres Bruker 600 MHz et 900 MHz à 20°C. L'ensemble des spectres ont été processés sous Topspin 3.5pl2 (Bruker) et analysés avec NMRFAM-SPARKY.

### a. Expériences de bases pour l'analyse de la protéine Tau

Les deux expériences de bases dans l'analyse des protéines par RMN sont le spectre 1D proton et l'expérience 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC :

- L'expérience 1D- $^1\text{H}$  : chaque proton de la protéine se situe dans un environnement électronique propre, ce qui se traduit sur le spectre par un déplacement chimique propre. On distingue ainsi 3 régions correspondant aux différents types de protons portés par une protéine: aliphatiques, amides et aromatiques (**figure 93**). Du fait de l'utilisation de solvants aqueux majoritairement non-deutérés pour l'analyse, la suppression du signal de l'eau est nécessaire : ceci nécessite l'utilisation d'une séquence d'élimination d'eau de type *watergate* (zgpgw5) ou pré-saturation (zgpr). Pour finir, il est également possible d'estimer la concentration d'un échantillon par comparaison du spectre 1D de la protéine avec un spectre contrôle : l'intensité des protons aliphatiques étant insensible au pH, cette zone du spectre est utilisée pour le dosage des échantillons.



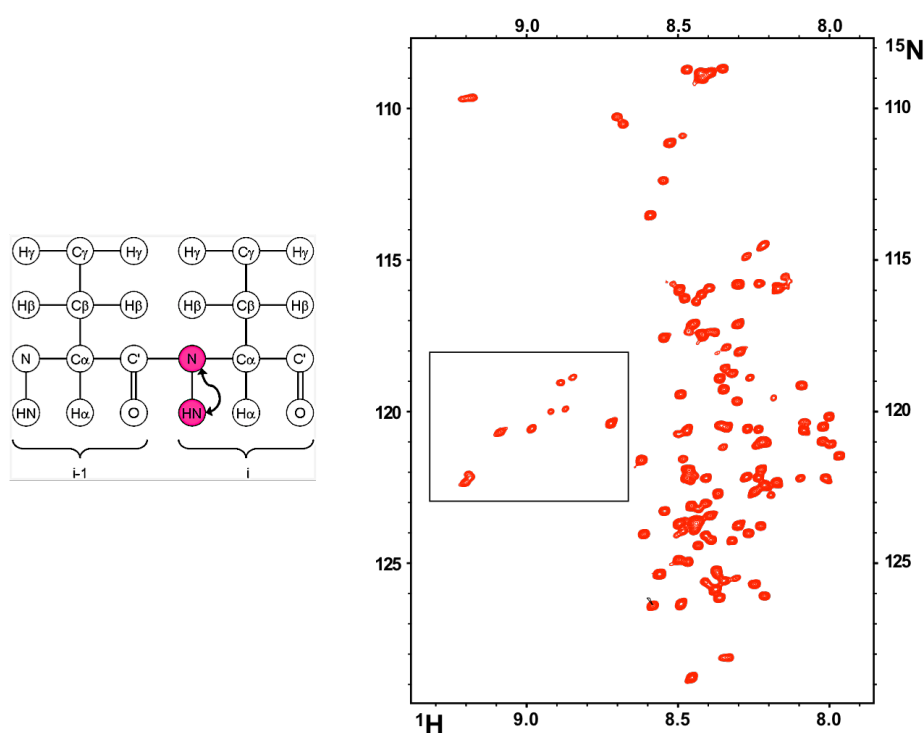
**Figure 93** : Spectre 1D proton du fragment TauF8-C291A. On distingue les différents types de protons. On note ici l'absence de protons aromatiques du fait de la faible proportion d'acides aminés de ce type.

- L'expérience 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC : il s'agit d'une expérience bidimensionnelle qui permet de corréler l'azote avec le proton qui lui est covalamment lié, ce qui se traduit par l'observation d'une résonance pour chaque acide aminé. Seuls la proline (pas de fonction amide primaire) et le résidu N-terminal ne

sont pas détectables sur ce spectre. La protéine Tau étant une IDP, le spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC est caractérisé par une faible dispersion des déplacements chimiques protons (**figure 94**). Ainsi, ce type d'expérience permet la visualisation rapide des sites de phosphorylation qui se retrouvent décalés en raison du déblindage du proton amide par la présence du groupement phosphate. Le niveau de phosphorylation ou d'acétylation est estimé par la détermination du rapport R des intensités entre le pic modifié et la somme du ou des intensités des pics du résidu modifié et non-modifié.

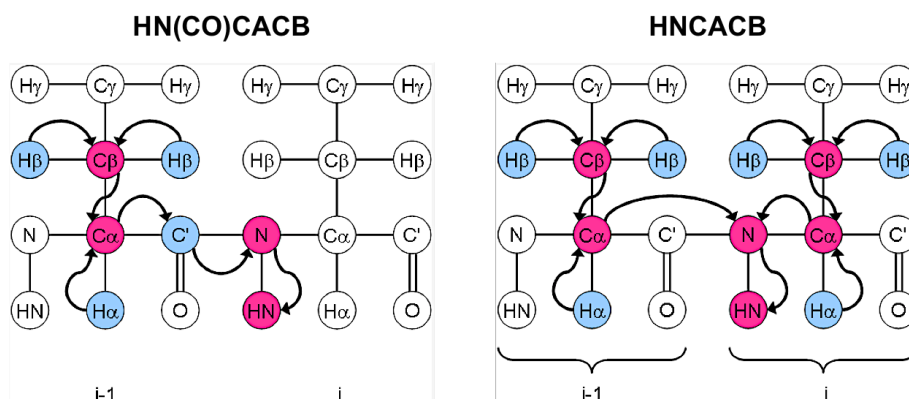
$$R = \frac{I(\text{résidu modifié})}{\sum [I(\text{résidu modifié}) + I(\text{résidu non modifié})]}$$

Dans la majorité des cas, les spectres HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ont été enregistrés avec 64 scans par incrément, 3072 et 512 points en dimension proton et azote respectivement (11h25 d'acquisition).



**Figure 94** : Schéma représentant le transfert d'aimantation dans une expérience de type  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC et le spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de TauF8-C291A phosphorylé par ERK2. On note tout d'abord la faible dispersion des déplacements chimiques protons caractéristiques des IDPs (trait rouge). De plus, on constate la perturbation du déplacement chimique des résidus phosphorylés qui se retrouvent isolés du spectre et donc facilement repérable (cadre noir).

L'identification des sites d'acétylation et de phosphorylation est en majeure partie basée sur les études menées au laboratoire par les Drs. Amina Kamah (Kamah et al., 2014) et Haoling Qi (Qi et al., 2016). On note que quelques expériences tridimensionnelles nécessitant des échantillons doublement marqués  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  ont été enregistrées afin d'identifier et confirmer les résultats précédemment obtenus. On distingue deux expériences de base pour l'attribution d'une protéines couplées au  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC : HNCACB et HN(CO)CACB (**figure 95**). Ces expériences ont été utilisées pour l'attribution du fragment TauF8 phosphorylé ainsi que pour la confirmation des sites de phosphorylation identifiés sur Tau441. Les expériences ont été enregistrées avec 16 scans par incrément. Des fenêtres spectrales de 14, 23 et 61 ppm ont été fixées en dimension  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$  avec 2048, 64 et 120 points, respectivement.



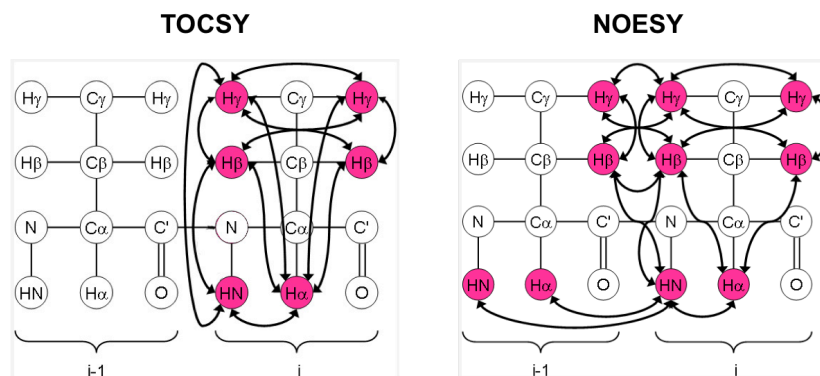
**Figure 95** : Schémas représentant les transferts d'aimantation dans les deux expériences classiquement utilisées pour l'attribution des protéines, HNCACB et HN(CO)CACB. La première permet l'identification et l'attribution des C $\alpha$  et C $\beta$  des résidus i et i-1 corrélés au HN du résidu i. En revanche, le conditionnement du transfert d'aimantation *via* le CO dans l'expérience HN(CO)CACB permet d'identifier uniquement les C $\alpha$  et C $\beta$  du résidu i-1 corrélés au HN du résidu i.

## b. Expériences de bases pour l'analyse des peptides de Tau

L'expérience de base reste le spectre 1D- $^1\text{H}$  pour les mêmes raisons que précédemment évoquées. En revanche, les peptides n'étant pas marqués, l'enregistrement du spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC est réalisé en abondance naturelle ( $^{15}\text{N}$ , 0,4 % d'abondance naturelle), ce qui nécessite des échantillons concentrés (mM) et un temps d'acquisition plus long. De ce fait, les expériences ont été enregistrées avec 128 scans par incréments, 2048 et 256 points en proton et azote respectivement. L'attribution des différents peptides générés est réalisée par



enregistrement d'expériences bidimensionnelles homonucléaires  $^1\text{H}$  TOCSY et NOESY. Alors que la première permet mettre en évidence les couplages scalaires entre les protons d'un même résidu, la seconde révèle la proximité spatiale (couplages dipolaires) entre protons et donc permet d'identifier les résidus voisins (**figure 96**). Ces expériences ont été enregistrées avec 64 scans par incrément, 4096 et 512 en dimension proton et azote respectivement. Pour finir, concernant les délais permettant le transfert de l'aimantation, des temps de mélange de 60 et 400 ms ont respectivement été utilisés pour la TOCSY et la NOESY. On note qu'un temps de mélange trop court entraîne un transfert d'aimantation insuffisant et donc une diminution des informations obtenues. En revanche, un temps de mélange trop long dans l'expérience NOESY induit le phénomène de diffusion de spin et l'apparition de signaux artéfactuels.



**Figure 96** : Schémas représentant les transferts d'aimantation dans les expériences de types TOCSY et NOESY. La première permet d'identifier les différents protons d'un résidu *i*, sous réserve d'un temps de mélange suffisamment long. La seconde permet d'identifier les couplages dipolaires entre protons, autrement dit les proximités spatiales avec des résidus voisins.

## B. Agrégation *in vitro* de la protéine Tau

### i. Réaction d'agrégation

Quel que soit le modèle considéré, la cinétique d'agrégation est suivie par fluorescence de la thioflavine T (ThT) sur le système PHERAstar (BMG Labtech). L'incubation à 37°C degrés est réalisée dans l'appareil. L'absorbance à 340 nm mesurée pour chaque puit est moyennée sur 10 mesures. Une série de mesure est réalisée toutes les 300 secondes.

### **a. Modèle d'agrégation induit par l'héparine**

Ce test d'agrégation en présence d'héparine est couramment utilisé au laboratoire et sert de référence dans l'étude de l'agrégation de la protéine Tau. L'agrégation est réalisée durant 24 h à 37°C dans un tampon 25 mM  $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$  pH6, 25 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 0,33 mM DTT, 2,5 mM héparine. Ce test est optimisé pour une concentration de Tau finale de 10  $\mu\text{M}$ . La cinétique d'agrégation est suivie par fluorescence de la thioflavine T (ThT) à 50  $\mu\text{M}$  finaux, sur le système PHERAstar (BMG Labtech).

### **b. Modèle d'agrégation SANS héparine**

La réaction d'agrégation de la protéine Tau phosphorylée par ERK2 ou par l'extrait de cerveau de rat est réalisée en absence d'inducteur polyanionique (héparine, acides gras...). La protéine phosphorylée est incubée 5 jours à 37°C dans un tampon 100 mM MES pH 6,9, 2 mM EGTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM NaF et 0,33 mM DTT. Ce test est réalisé pour une concentration finale en phospho-Tau de 20 à 120 $\mu\text{M}$  suivant les mutants utilisés. En effet, dans le cas du fragment TauF8 phosphorylé par ERK2, 120 $\mu\text{M}$  sont nécessaires afin d'obtenir une agrégation après 4 à 6 jours d'incubation. Ceci s'explique par le fait que le profil de phosphorylation n'est pas optimal pour l'agrégation. En revanche, dans le cas d'échantillons phosphorylés par l'extrait de cerveau de rat, 20-25  $\mu\text{M}$  suffisent. De la même manière que pour le test avec l'héparine, la cinétique d'agrégation est suivie par fluorescence de la ThT à 50 $\mu\text{M}$  finaux, sur le système PHERAstar (BMG Labtech).

## **ii. Observations en microscopie électronique en transmission**

Quel que soit le modèle d'agrégation considéré, la présence de fibres est confirmée par observations en microscopie électronique en transmission à 80 kV (Hitachi H7500).

### **a. Coloration à l'acétate d'uranyle**

Le principe de la microscopie électronique repose sur le bombardement de l'échantillon par un faisceau d'électrons qui viennent ensuite impressionner un écran phosphorescent : les électrons interagissant avec l'objet observé ne parviennent donc pas à atteindre l'écran, ce qui se traduit par une zone « noire ». A l'inverse, si les électrons n'interagissent pas avec l'objet, ils impressionnent le film phosphorescent, ce qui donne une image « blanche ». Or les fibres observées ne sont constituées que d'atomes « légers » et ne donneraient donc qu'une image peu contrastée. Afin d'augmenter le contraste, l'échantillon est traité avec un atome lourd avant l'observation, l'acétate d'uranyle : on parle de coloration négative car les fibres ne sont pas directement colorées, l'atome lourd se fixant sur le pourtour de l'objet.

A la fin de l'expérience d'agrégation, 10 µL d'échantillons sont déposés sur une grille de cuivre 200 ou 400 mesh préalablement recouverte d'un polymère de formvar. Après 1min30 d'incubation, la grille est séchée puis lavée 3 fois à l'eau désionisée puis séchée. 10 µL d'acétate d'uranyle à 2 % dans l'eau sont ensuite déposés sur la grille durant 1min30. Pour finir, la grille est abondamment lavée à l'eau puis séchée.

### **b. Immuno-marquage**

Deux anticorps primaires ont été utilisés pour marquer les fibres :

- *Human PHF-TAU clone AT8* : il reconnaît le phospho-épitope AT8 pS202/pThr205.
- anti-Tau (4-repeat isoform RD4), clone 1E1/A6

Le protocole suivi nécessite plusieurs étapes : fixation de l'échantillon, incubations successives avec les anticorps, coloration et lavages multiples.

- 1) Adsorption de l'échantillon : 10 µL d'échantillon sont déposés sur une grille de cuivre 200 ou 400 mesh préalablement recouverte d'un polymère de formvar durant 20 minutes à température ambiante.
- 2) L'excès d'échantillon est éliminé par trois lavages au PBS, sans étape de séchage.

- 3) Saturation de la grille : la grille est incubé 1h à température ambiante sur gouttes de PBS/SAB 1%.
- 4) L'excès de SAB est éliminé par trois lavages au PBS, sans étape de séchage.
- 5) Incubation avec 10  $\mu$ L d'anticorps primaire dilué au 1/100<sup>e</sup> dans une solution PBS/SAB 1 % durant 1h à température ambiante.
- 6) L'excès d'anticorps primaire est éliminé par cinq lavages au PBS, sans étape de séchage.
- 7) Incubation avec 10  $\mu$ L d'anticorps secondaire dilué au 1/20<sup>e</sup> dans une solution PBS/SAB 1 %. L'anticorps secondaire utilisé est porteur d'une bille d'or colloïdale de 6 nm (6 nm-*Gold donkey IgG anti-mouse IgG (H+L)*)
- 8) L'excès d'anticorps secondaire est éliminé par dix lavages à l'eau. Avant coloration, le PBS doit impérativement être éliminé afin d'éviter la précipitation de l'acétate d'uranyle.
- 9) Coloration : la grille est incubée 8 minutes avec 10  $\mu$ L d'acétate d'uranyle à 2 % dans l'eau.
- 10) La grille est finalement lavée 4 fois à l'eau puis séchée.

Ces différents protocoles ont donné lieu à deux publications (retrouvées en annexe) regroupant l'intégralité des figures relatives aux étapes de purification et à la phosphorylation présentées ci dessous

# **Bibliographie**



Aizawa, H., Kawasaki, H., Murofushi, H., Kotani, S., Suzuki, K., and Sakai, H. (1989). A common amino acid sequence in 190-kDa microtubule-associated protein and tau for the promotion of microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* *264*, 5885–5890.

Alafuzoff, I., Arzberger, T., Al-Sarraj, S., Bodi, I., Bogdanovic, N., Braak, H., Bugiani, O., Del-Tredici, K., Ferrer, I., Gelpi, E., et al. (2008). Staging of Neurofibrillary Pathology in Alzheimer's Disease: A Study of the BrainNet Europe Consortium. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *18*, 484–496.

Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M.J., Jakes, R., Virdee, K., Yoshida, H., Holzer, M., Craxton, M., Emson, P.C., et al. (2002). Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 9340–9351.

Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001). Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 6923–6928.

Alonso, A.C., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 5562–5566.

Amniai, L., Barbier, P., Sillen, A., Wieruszeski, J.-M., Peyrot, V., Lippens, G., and Landrieu, I. (2009). Alzheimer disease specific phosphoepitopes of Tau interfere with assembly of tubulin but not binding to microtubules. *FASEB J.* *23*, 1146–1152.

Anand, R., and Marmorstein, R. (2007). Structure and mechanism of lysine-specific demethylase enzymes. *J. Biol. Chem.* *282*, 35425–35429.

Arendt, T., Holzer, M., Fruth, R., Brückner, M.K., and Gärtner, U. (1998). Phosphorylation of tau, Abeta-formation, and apoptosis after in vivo inhibition of PP-1 and PP-2A. *Neurobiol. Aging* *19*, 3–13.

Arnold, C.S., Johnson, G.V., Cole, R.N., Dong, D.L., Lee, M., and Hart, G.W. (1996). The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* *271*, 28741–28744.

Attar, A., Ripoli, C., Riccardi, E., Maiti, P., Li Puma, D.D., Liu, T., Hayes, J., Jones, M.R., Lichti-Kaiser, K., Yang, F., et al. (2012). Protection of primary neurons and mouse brain from Alzheimer's pathology by molecular tweezers. *Brain J. Neurol.*

135, 3735–3748.

Augustinack, J.C., Schneider, A., Mandelkow, E.-M., and Hyman, B.T. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 103, 26–35.

Bah, A., Vernon, R.M., Siddiqui, Z., Krzeminski, M., Muhandiram, R., Zhao, C., Sonenberg, N., Kay, L.E., and Forman-Kay, J.D. (2015). Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature* 519, 106–109.

Basurto-Islas, G., Luna-Muñoz, J., Guillozet-Bongaarts, A.L., Binder, L.I., Mena, R., and García-Sierra, F. (2008). Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 470–483.

Bell, K.F.S., Zheng, L., Fahrenholz, F., and Cuello, A.C. (2008). ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol. Aging* 29, 554–565.

von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E.-M., and Mandelkow, E. (2000). Assembly of  $\tau$  protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (306VQIVYK311) forming  $\beta$  structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5129–5134.

Beyreuther, K., and Masters, C.L. (1991). Amyloid precursor protein (APP) and beta A4 amyloid in the etiology of Alzheimer's disease: precursor-product relationships in the derangement of neuronal function. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 1, 241–251.

Bhattacharya, K., Rank, K.B., Evans, D.B., and Sharma, S.K. (2001). Role of Cysteine-291 and Cysteine-322 in the Polymerization of Human Tau into Alzheimer-like Filaments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 20–26.

Bian, F., Nath, R., Sobocinski, G., Booher, R.N., Lipinski, W.J., Callahan, M.J., Pack, A., Wang, K.K.-W., and Walker, L.C. (2002). Axonopathy, tau abnormalities, and dyskinesia, but no neurofibrillary tangles in p25-transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* 446, 257–266.

Bier, D., Rose, R., Bravo-Rodriguez, K., Bartel, M., Ramirez-Anguita, J.M., Dutt, S., Wilch, C., Klärner, F.-G., Sanchez-Garcia, E., Schrader, T., et al. (2013). Molecular tweezers modulate 14-3-3 protein-protein interactions. *Nat. Chem.* 5, 234–



239.

Biernat, J., Mandelkow, E.M., Schröter, C., Lichtenberg-Kraag, B., Steiner, B., Berling, B., Meyer, H., Mercken, M., Vandermeeren, A., and Goedert, M. (1992). The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J.* *11*, 1593–1597.

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* *11*, 153–163.

Binder, L.I., Frankfurter, A., and Rebhun, L.I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* *101*, 1371–1378.

Blair, L.J., Nordhues, B.A., Hill, S.E., Scaglione, K.M., O’Leary, J.C., Fontaine, S.N., Breydo, L., Zhang, B., Li, P., Wang, L., et al. (2013). Accelerated neurodegeneration through chaperone-mediated oligomerization of tau. *J. Clin. Invest.* *123*, 4158–4169.

Bock-Marquette, I., Saxena, A., White, M.D., Dimaio, J.M., and Srivastava, D. (2004). Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* *432*, 466–472.

Bolmont, T., Clavaguera, F., Meyer-Luehmann, M., Herzig, M.C., Radde, R., Staufenbiel, M., Lewis, J., Hutton, M., Tolnay, M., and Jucker, M. (2007). Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *Am. J. Pathol.* *171*, 2012–2020.

Bondalapati, S., Jbara, M., and Brik, A. (2016). Expanding the chemical toolbox for the synthesis of large and uniquely modified proteins. *Nat. Chem.* *8*, 407–418.

Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *82*, 239–259.

Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., and Del Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using

paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 112, 389–404.

Braithwaite, S.P., Stock, J.B., Lombroso, P.J., and Nairn, A.C. (2012). Protein phosphatases and Alzheimer's disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 106, 343–379.

Brion, J.P., Couck, A.M., Passareiro, E., and Flament-Durand, J. (1985). Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* 17, 89–96.

Brion, J.P., Tremp, G., and Octave, J.N. (1999). Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 154, 255–270.

Brownlee, M., Cerami, A., and Vlassara, H. (1988). Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes. Metab. Rev.* 4, 437–451.

Bulbarelli, A., Lonati, E., Cazzaniga, E., Gregori, M., and Masserini, M. (2009). Pin1 affects Tau phosphorylation in response to Aβ oligomers. *Mol. Cell. Neurosci.* 42, 75–80.

Cadwell, K., and Coscoy, L. (2005). Ubiquitination on Nonlysine Residues by a Viral E3 Ubiquitin Ligase. *Science* 309, 127–130.

Caselli, R.J., Beach, T.G., Knopman, D.S., and Graff-Radford, N.R. (2017). Alzheimer Disease: Scientific Breakthroughs and Translational Challenges. *Mayo Clin. Proc.* 92, 978–994.

Chambraud, B., Sardin, E., Giustiniani, J., Dounane, O., Schumacher, M., Goedert, M., and Baulieu, E.-E. (2010). A role for FKBP52 in Tau protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2658–2663.

Chen, J., and Brooks, C.L. (2007). Critical importance of length-scale dependence in implicit modeling of hydrophobic interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2444–2445.

Chohan, M.O., Haque, N., Alonso, A., El-Akkad, E., Grundke-Iqbal, I., Grover, A., and Iqbal, K. (2005). Hyperphosphorylation-induced self assembly of murine tau: a comparison with human tau. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 112, 1035–1047.

Chung, C.W., Song, Y.H., Kim, I.K., Yoon, W.J., Ryu, B.R., Jo, D.G., Woo, H.N., Kwon, Y.K., Kim, H.H., Gwag, B.J., et al. (2001). Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. *Neurobiol. Dis.* *8*, 162–172.

Cohen, T.J., Guo, J.L., Hurtado, D.E., Kwong, L.K., Mills, I.P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.Y. (2011). The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat. Commun.* *2*, 252.

Cohen, T.J., Constance, B.H., Hwang, A.W., James, M., and Yuan, C.-X. (2016). Intrinsic Tau Acetylation Is Coupled to Auto-Proteolytic Tau Fragmentation. *PloS One* *11*, e0158470.

Cook, C., Gendron, T.F., Scheffel, K., Carlomagno, Y., Dunmore, J., DeTure, M., and Petrucelli, L. (2012). Loss of HDAC6, a novel CHIP substrate, alleviates abnormal tau accumulation. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 2936.

Cook, C., Stankowski, J.N., Carlomagno, Y., Stetler, C., and Petrucelli, L. (2014a). Acetylation: a new key to unlock tau's role in neurodegeneration. *Alzheimers Res. Ther.* *6*, 29.

Cook, C., Carlomagno, Y., Gendron, T.F., Dunmore, J., Scheffel, K., Stetler, C., Davis, M., Dickson, D., Jarpe, M., DeTure, M., et al. (2014b). Acetylation of the KXGS motifs in tau is a critical determinant in modulation of tau aggregation and clearance. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 104–116.

Cripps, D., Thomas, S.N., Jeng, Y., Yang, F., Davies, P., and Yang, A.J. (2006). Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* *281*, 10825–10838.

Crowther, R.A. (1991). Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 2288–2292.

Crowther, R.A., Olesen, O.F., Jakes, R., and Goedert, M. (1992). The microtubule binding repeats of tau protein assemble into filaments like those found in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* *309*, 199–202.

Crowther, T., Goedert, M., and Wischik, C.M. (1989). The repeat region of microtubule-associated protein tau forms part of the core of the paired helical

filament of Alzheimer's disease. *Ann. Med.* 21, 127–132.

Cuchillo-Ibanez, I., Seereeram, A., Byers, H.L., Leung, K.-Y., Ward, M.A., Anderton, B.H., and Hanger, D.P. (2008). Phosphorylation of tau regulates its axonal transport by controlling its binding to kinesin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 3186–3195.

Dan, A., Takahashi, M., Masuda-Suzukake, M., Kametani, F., Nonaka, T., Kondo, H., Akiyama, H., Arai, T., Mann, D.M., Saito, Y., et al. (2013). Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol. Commun.* 1, 54.

David, D.C., Layfield, R., Serpell, L., Narain, Y., Goedert, M., and Spillantini, M.G. (2002). Proteasomal degradation of tau protein. *J. Neurochem.* 83, 176–185.

Delacourte, A. (2006). REVIEW ARTICLE  
Tauopathies: recent insights into old diseases. *Folia Neuropathol.* 43, 244–257.

Despres, C., Byrne, C., Qi, H., Cantrelle, F.-X., Huvent, I., Chambraud, B., Baulieu, E.-E., Jacquot, Y., Landrieu, I., Lippens, G., et al. (2017). Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201708448.

Dickey, C.A., Dunmore, J., Lu, B., Wang, J.-W., Lee, W.C., Kamal, A., Burrows, F., Eckman, C., Hutton, M., and Petrucelli, L. (2006). HSP induction mediates selective clearance of tau phosphorylated at proline-directed Ser/Thr sites but not KXGS (MARK) sites. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 753–755.

Dixit, R., Ross, J.L., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L.F. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319, 1086–1089.

Domanski, M., Hertzog, M., Coutant, J., Gutsche-Perelroizen, I., Bontems, F., Carlier, M.-F., Guittet, E., and van Heijenoort, C. (2004). Coupling of folding and binding of thymosin beta4 upon interaction with monomeric actin monitored by nuclear magnetic resonance. *J. Biol. Chem.* 279, 23637–23645.

Dorval, V., and Fraser, P.E. (2006). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 281, 9919–9924.

Dourlen, P. (2017). Identification of Tau Toxicity Modifiers in the *Drosophila* Eye. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1523, 375–389.

Drewes, G., Mandelkow, E.M., Baumann, K., Goris, J., Merlevede, W., and Mandelkow, E. (1993). Dephosphorylation of tau protein and Alzheimer paired helical filaments by calcineurin and phosphatase-2A. *FEBS Lett.* 336, 425–432.

Drewes, G., Ebnet, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89, 297–308.

Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.-M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., et al. (1996). Increased amyloid- $\beta$ 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383, 710–713.

Duff, K., Knight, H., Refolo, L.M., Sanders, S., Yu, X., Picciano, M., Malester, B., Hutton, M., Adamson, J., Goedert, M., et al. (2000). Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol. Dis.* 7, 87–98.

Dunker, A.K., Babu, M.M., Barbar, E., Blackledge, M., Bondos, S.E., Dosztányi, Z., Dyson, H.J., Forman-Kay, J., Fuxreiter, M., Gsponer, J., et al. (2013). What's in a name? Why these proteins are intrinsically disordered. *Intrinsically Disord. Proteins* 1, e24157.

Dutt, S., Wilch, C., Gersthagen, T., Talbiersky, P., Bravo-Rodriguez, K., Hanni, M., Sánchez-García, E., Ochsenfeld, C., Klärner, F.-G., and Schrader, T. (2013). Molecular tweezers with varying anions: a comparative study. *J. Org. Chem.* 78, 6721–6734.

Engel, T., Lucas, J.J., Hernández, F., and Avila, J. (2007). A mouse model to study tau pathology related with tau phosphorylation and assembly. *J. Neurol. Sci.* 257, 250–254.

Fauquant, C., Redeker, V., Landrieu, I., Wieruszeski, J.-M., Verdegem, D., Laprévote, O., Lippens, G., Gigant, B., and Knossow, M. (2011). Systematic Identification of Tubulin-interacting Fragments of the Microtubule-associated Protein Tau Leads to a Highly Efficient Promoter of Microtubule Assembly. *J. Biol. Chem.* 286, 33358–33368.

Fitzpatrick, A.W.P., Falcon, B., He, S., Murzin, A.G., Murshudov, G., Garringer, H.J., Crowther, R.A., Ghetti, B., Goedert, M., and Scheres, S.H.W. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature* *547*, 185–190.

Fokkens, M., Schrader, T., and Klärner, F.-G. (2005). A molecular tweezer for lysine and arginine. *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 14415–14421.

Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E.-M., Davies, P., and Mandelkow, E. (1998a). A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15712–15717.

Friedhoff, P., Schneider, A., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1998b). Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry (Mosc.)* *37*, 10223–10230.

Funk, K.E., Thomas, S.N., Schafer, K.N., Cooper, G.L., Liao, Z., Clark, D.J., Yang, A.J., and Kuret, J. (2014). Lysine methylation is an endogenous post-translational modification of tau protein in human brain and a modulator of aggregation propensity. *Biochem. J.* *462*, 77.

Gandhi, N.S., Landrieu, I., Byrne, C., Kukic, P., Amniai, L., Cantrelle, F.-X., Wieruszeski, J.-M., Mancera, R.L., Jacquot, Y., and Lippens, G. (2015). A Phosphorylation-Induced Turn Defines the Alzheimer's Disease AT8 Antibody Epitope on the Tau Protein. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *54*, 6819–6823.

García-Sierra, F., Mondragón-Rodríguez, S., and Basurto-Islas, G. (2008). Truncation of tau protein and its pathological significance in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* *14*, 401–409.

Gastard, M.C., Troncoso, J.C., and Koliatsos, V.E. (2003). Caspase activation in the limbic cortex of subjects with early Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* *54*, 393–398.

Gigant, B., Landrieu, I., Fauquant, C., Barbier, P., Huvent, I., Wieruszeski, J.-M., Knossow, M., and Lippens, G. (2014). Mechanism of Tau-promoted microtubule assembly as probed by NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 12615–12623.

Giustiniani, J., Sineus, M., Sardin, E., Dounane, O., Panchal, M., Sazdovitch, V., Duyckaerts, C., Chambrud, B., and Baulieu, E.-E. (2012). Decrease of the

immunophilin FKBP52 accumulation in human brains of Alzheimer's disease and FTDP-17. *J. Alzheimers Dis. JAD* 29, 471–483.

Giustiniani, J., Chambraud, B., Sardin, E., Dounane, O., Guillemeau, K., Nakatani, H., Paquet, D., Kamah, A., Landrieu, I., Lippens, G., et al. (2014). Immunophilin FKBP52 induces Tau-P301L filamentous assembly in vitro and modulates its activity in a model of tauopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 4584–4589.

Glennner, G.G., and Wong, C.W. (2012). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. 1984. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 534–539.

Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., and James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706.

Goedert, M., and Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 9, 4225–4230.

Goedert, M., and Spillantini, M.G. (2006). A century of Alzheimer's disease. *Science* 314, 777–781.

Goedert, M., Wischik, C.M., Crowther, R.A., Walker, J.E., and Klug, A. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4051–4055.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., and Crowther, R.A. (1989). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8, 393–399.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Cairns, N.J., and Crowther, R.A. (1992). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159–168.

Goedert, M., Jakes, R., Crowther, R.A., Cohen, P., Vanmechelen, E.,

Vandermeeren, M., and Cras, P. (1994). Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem. J.* *301* ( Pt 3), 871–877.

Goedert, M., Jakes, R., Qi, Z., Wang, J.H., and Cohen, P. (1995). Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Neurochem.* *65*, 2804–2807.

Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M.G., Hasegawa, M., Smith, M.J., and Crowther, R.A. (1996). Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* *383*, 550–553.

Goedert, M., Hasegawa, M., Jakes, R., Lawler, S., Cuenda, A., and Cohen, P. (1997). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* *409*, 57–62.

Goedert, M., Jakes, R., and Crowther, R.A. (1999). Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments. *FEBS Lett.* *450*, 306–311.

Goode, B.L., Denis, P.E., Panda, D., Radeke, M.J., Miller, H.P., Wilson, L., and Feinstein, S.C. (1997). Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol. Biol. Cell* *8*, 353–365.

Gorsky, M.K., Burnouf, S., Dols, J., Mandelkow, E., and Partridge, L. (2016). Acetylation mimic of lysine 280 exacerbates human Tau neurotoxicity in vivo. *Sci. Rep.* *6*, 22685.

Götz, J., Probst, A., Spillantini, M.G., Schäfer, T., Jakes, R., Bürki, K., and Goedert, M. (1995). Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J.* *14*, 1304–1313.

Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J., and Nitsch, R.M. (2001a). Formation of neurofibrillary tangles in P301I tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* *293*, 1491–1495.



Götz, J., Tolnay, M., Barmettler, R., Chen, F., Probst, A., and Nitsch, R.M. (2001b). Oligodendroglial tau filament formation in transgenic mice expressing G272V tau. *Eur. J. Neurosci.* 13, 2131–2140.

Graham, D.L., Gray, A.J., Joyce, J.A., Yu, D., O'Moore, J., Carlson, G.A., Shearman, M.S., Dellovade, T.L., and Hering, H. (2014). Increased O-GlcNAcylation reduces pathological tau without affecting its normal phosphorylation in a mouse model of tauopathy. *Neuropharmacology* 79, 307–313.

Greenberg, S.G., Davies, P., Schein, J.D., and Binder, L.I. (1992). Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J. Biol. Chem.* 267, 564–569.

Grueninger, F., Bohrmann, B., Czech, C., Ballard, T.M., Frey, J.R., Weidensteiner, C., von Kienlin, M., and Ozmen, L. (2010). Phosphorylation of Tau at S422 is enhanced by Abeta in TauPS2APP triple transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 37, 294–306.

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 tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4913–4917.

Gu, Y., Oyama, F., and Ihara, Y. (1996). Tau is widely expressed in rat tissues. *J. Neurochem.* 67, 1235–1244.

Guillozet-Bongaarts, A.L., Cahill, M.E., Cryns, V.L., Reynolds, M.R., Berry, R.W., and Binder, L.I. (2006). Pseudophosphorylation of tau at serine 422 inhibits caspase cleavage: in vitro evidence and implications for tangle formation in vivo. *J. Neurochem.* 97, 1005–1014.

Guo, A., Gu, H., Zhou, J., Mulhern, D., Wang, Y., Lee, K.A., Yang, V., Aguiar, M., Kornhauser, J., Jia, X., et al. (2014). Immunoaffinity Enrichment and Mass Spectrometry Analysis of Protein Methylation. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 13, 372.

Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., and Mandelkow, E. (1994). Domains of tau Protein and Interactions with Microtubules. *Biochemistry (Mosc.)* 33, 9511–9522.

Haass, C. (2010). Initiation and propagation of neurodegeneration. *Nat. Med.*

16, 1201–1204.

Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.

Habchi, J., Tompa, P., Longhi, S., and Uversky, V.N. (2014). Introducing protein intrinsic disorder. *Chem. Rev.* 114, 6561–6588.

Hackenberger, C.P.R., and Schwarzer, D. (2008). Chemoselective ligation and modification strategies for peptides and proteins. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 47, 10030–10074.

Hall, G.F., Yao, J., and Lee, G. (1997). Human tau becomes phosphorylated and forms filamentous deposits when overexpressed in lamprey central neurons in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4733–4738.

Hall, G.F., Chu, B., Lee, G., and Yao, J. (2000). Human tau filaments induce microtubule and synapse loss in an in vivo model of neurofibrillary degenerative disease. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 8), 1373–1387.

Halverson, R.A., Lewis, J., Frausto, S., Hutton, M., and Muma, N.A. (2005). Tau protein is cross-linked by transglutaminase in P301L tau transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 1226–1233.

Ham, T.J. van, Breitling, R., Swertz, M.A., and Nollen, E.A.A. (2009). Neurodegenerative diseases: Lessons from genome-wide screens in small model organisms. *EMBO Mol. Med.* 1, 360–370.

Hamdane, M., Dourlen, P., Bretteville, A., Sambo, A.-V., Ferreira, S., Ando, K., Kerdraon, O., Bégard, S., Geay, L., Lippens, G., et al. (2006). Pin1 allows for differential Tau dephosphorylation in neuronal cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 32, 155–160.

Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P., and Anderton, B.H. (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci. Lett.* 147, 58–62.

Hanger, D.P., Betts, J.C., Loviny, T.L., Blackstock, W.P., and Anderton, B.H. (1998). New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass

spectrometry. *J. Neurochem.* *71*, 2465–2476.

Hanger, D.P., Byers, H.L., Wray, S., Leung, K.-Y., Saxton, M.J., Seereeram, A., Reynolds, C.H., Ward, M.A., and Anderton, B.H. (2007). Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J. Biol. Chem.* *282*, 23645–23654.

Hanger, D.P., Anderton, B.H., and Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol. Med.* *15*, 112–119.

Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., and Hirokawa, N. (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* *369*, 488–491.

Hart, G.W., Housley, M.P., and Slawson, C. (2007). Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* *446*, 1017–1022.

Härtig, W., Klein, C., Brauer, K., Schüppel, K.F., Arendt, T., Brückner, G., and Bigl, V. (2000). Abnormally phosphorylated protein tau in the cortex of aged individuals of various mammalian orders. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *100*, 305–312.

Harwood, K.R., and Hanover, J.A. (2014). Nutrient-driven O-GlcNAc cycling – think globally but act locally. *J Cell Sci* *127*, 1857–1867.

Hasegawa, M., Morishima-Kawashima, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K., and Ihara, Y. (1992). Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* *267*, 17047–17054.

Heidary, G., and Fortini, M.E. (2001). Identification and characterization of the *Drosophila* tau homolog. *Mech. Dev.* *108*, 171–178.

Heiss, W.D., Szelies, B., Kessler, J., and Herholz, K. (1991). Abnormalities of energy metabolism in Alzheimer's disease studied with PET. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *640*, 65–71.

Herholz, K. (2014). Guidance for reading FDG PET scans in dementia patients. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging Off. Publ. Ital. Assoc. Nucl. Med. AIMN Int. Assoc. Radiopharmacol. IAR Sect. Soc. Of* *58*, 332–343.

Heuer, E., Rosen, R.F., Cintron, A., and Walker, L.C. (2012). Nonhuman Primate Models of Alzheimer-Like Cerebral Proteopathy. *Curr. Pharm. Des.* *18*,

1159–1169.

Hick, M., Herrmann, U., Weyer, S.W., Mallm, J.-P., Tschäpe, J.-A., Borgers, M., Mercken, M., Roth, F.C., Draguhn, A., Slomianka, L., et al. (2015). Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APP $\alpha$  in synaptic plasticity. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 21–37.

Hippius, H., and Neundörfer, G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* 5, 101–108.

Holmes, B.B., Furman, J.L., Mahan, T.E., Yamasaki, T.R., Mirbaha, H., Eades, W.C., Belaygorod, L., Cairns, N.J., Holtzman, D.M., and Diamond, M.I. (2014). Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4376-4385.

Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B.I., Geschwind, D.H., Bird, T.D., McKeel, D., Goate, A., et al. (1998). Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 282, 1914–1917.

Horowitz, P.M., Patterson, K.R., Guillozet-Bongaarts, A.L., Reynolds, M.R., Carroll, C.A., Weintraub, S.T., Bennett, D.A., Cryns, V.L., Berry, R.W., and Binder, L.I. (2004). Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 7895–7902.

Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., et al. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702–705.

Huvent, I., Kamah, A., Cantrelle, F.-X., Barois, N., Slomianny, C., Smet-Nocca, C., Landrieu, I., and Lippens, G. (2014). A functional fragment of Tau forms fibers without the need for an intermolecular cysteine bridge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 445, 299–303.

Hyman, B.T., Phelps, C.H., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Carrillo, M.C., Dickson, D.W., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Masliah, E., et al. (2012). National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J.*

Alzheimers Assoc. 8, 1–13.

Ikegami, S., Harada, A., and Hirokawa, N. (2000). Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 279, 129–132.

Ikura, T., and Ito, N. (2013). Peptidyl-prolyl isomerase activity of FK506 binding protein 12 prevents tau peptide from aggregating. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* 26, 539–546.

Irwin, D.J., Cohen, T.J., Grossman, M., Arnold, S.E., Xie, S.X., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2012). Acetylated tau, a novel pathological signature in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Brain* 135, 807.

Ishihara, T., Hong, M., Zhang, B., Nakagawa, Y., Lee, M.K., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1999). Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24, 751–762.

Ivančević, V., Alavi, A., Souder, E., Mozley, P.D., Gur, R.E., Bénard, F., and Munz, D.L. (2000). Regional cerebral glucose metabolism in healthy volunteers determined by fluorodeoxyglucose positron emission tomography: appearance and variance in the transaxial, coronal, and sagittal planes. *Clin. Nucl. Med.* 25, 596–602.

Iyer, S.P.N., and Hart, G.W. (2003). Roles of the tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 278, 24608–24616.

Jackson, G.R., Wiedau-Pazos, M., Sang, T.-K., Wagle, N., Brown, C.A., Massachi, S., and Geschwind, D.H. (2002). Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron* 34, 509–519.

Jenkins, S.M., and Johnson, G.V. (1998). Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport* 9, 67–71.

Jinwal, U.K., Koren, J., Borysov, S.I., Schmid, A.B., Abisambra, J.F., Blair, L.J., Johnson, A.G., Jones, J.R., Shults, C.L., O'Leary, J.C., et al. (2010). The Hsp90 cochaperone, FKBP51, increases Tau stability and polymerizes microtubules. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 591–599.

Johnson, G.V., Cox, T.M., Lockhart, J.P., Zinnerman, M.D., Miller, M.L., and Powers, R.E. (1997). Transglutaminase activity is increased in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 751, 323–329.

Julien, C., Tremblay, C., Émond, V., Lebbadi, M., Salem, N., Jr, Bennett, D.A., and Calon, F. (2009). SIRT1 Decrease Parallels the Accumulation of tau in Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 48.

Kamah, A., Huvent, I., Cantrelle, F.-X., Qi, H., Lippens, G., Landrieu, I., and Smet-Nocca, C. (2014). Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Acetylation Pattern of the Neuronal Tau Protein. *Biochemistry (Mosc.)* 53, 3020–3032.

Kamah, A., Cantrelle, F.X., Huvent, I., Giustiniani, J., Guillemeau, K., Byrne, C., Jacquot, Y., Landrieu, I., Baulieu, E.E., Smet, C., et al. (2016). Isomerization and Oligomerization of Truncated and Mutated Tau Forms by FKBP52 are Independent Processes. *J. Mol. Biol.* 428, 1080–1090.

Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1996). RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett.* 399, 344–349.

Khachaturian, Z.S. (1985). Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Arch. Neurol.* 42, 1097–1105.

Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 192–193.

Kim, D., Nguyen, M.D., Dobbin, M.M., Fischer, A., Sananbenesi, F., Rodgers, J.T., Delalle, I., Baur, J.A., Sui, G., Armour, S.M., et al. (2007). SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.* 26, 3169.

Klärner, F.-G., Benkhoff, J., Boese, R., Burkert, U., Kamieth, M., and Naatz, U. (1996). Molecular Tweezers as Synthetic Receptors in Host—Guest Chemistry: Inclusion of Cyclohexane and Self-Assembly of Aliphatic Side Chains. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35, 1130–1133.

Koenig, R.J., Peterson, C.M., Jones, R.L., Saudek, C., Lehrman, M., and Cerami, A. (1976). Correlation of glucose regulation and hemoglobin A<sub>1c</sub> in diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 295, 417–420.

Krebs, M.R.H., Bromley, E.H.C., and Donald, A.M. (2005). The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct. Biol.* 149, 30–37.

Ksiezak-Reding, H., Liu, W.K., and Yen, S.H. (1992). Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res.* 597, 209–219.

Lai, R.Y.K., Harrington, C.R., and Wischik, C.M. (2016). Absence of a Role for Phosphorylation in the Tau Pathology of Alzheimer's Disease. *Biomolecules* 6, 19.

Landau, M., Sawaya, M.R., Faull, K.F., Laganowsky, A., Jiang, L., Sievers, S.A., Liu, J., Barrio, J.R., and Eisenberg, D. (2011). Towards a pharmacophore for amyloid. *PLoS Biol.* 9, e1001080.

Landrieu, I., Smet-Nocca, C., Amniai, L., Louis, J.V., Wieruszeski, J.-M., Goris, J., Janssens, V., and Lippens, G. (2011). Molecular implication of PP2A and Pin1 in the Alzheimer's disease specific hyperphosphorylation of Tau. *PloS One* 6, e21521.

Latham, J.A., and Dent, S.Y.R. (2007). Cross-regulation of histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1017–1024.

Lebouvier, T., Scales, T.M.E., Williamson, R., Noble, W., Duyckaerts, C., Hanger, D.P., Reynolds, C.H., Anderton, B.H., and Derkinderen, P. (2009). The microtubule-associated protein tau is also phosphorylated on tyrosine. *J. Alzheimers Dis. JAD* 18, 1–9.

Lee, A.T., and Cerami, A. (1992). Role of Glycation in Aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 663, 63–70.

Lee, G., Neve, R.L., and Kosik, K.S. (1989). The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2, 1615–1624.

Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L., Bussi re, T., Dupire, M.-J., Delacourte, A., Michalski, J.-C., and Caillet-Boudin, M.-L. (2003). Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta* 1619, 167–176.

Leroy, K., Yilmaz, Z., and Brion, J.-P. (2007). Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 43–55.

Lindner, H., Sarg, B., Hoernagl, B., and Helliger, W. (1998). The Microheterogeneity of the Mammalian H10Histone EVIDENCE FOR AN AGE-DEPENDENT DEAMIDATION. *J. Biol. Chem.* *273*, 13324–13330.

Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* *259*, 5301–5305.

Liou, Y.-C., Sun, A., Ryo, A., Zhou, X.Z., Yu, Z.-X., Huang, H.-K., Uchida, T., Bronson, R., Bing, G., Li, X., et al. (2003). Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature* *424*, 556–561.

Lipton, A.M., Cullum, C.M., Satumtira, S., Sontag, E., Hynan, L.S., White, C.L., and Bigio, E.H. (2001). Contribution of asymmetric synapse loss to lateralizing clinical deficits in frontotemporal dementias. *Arch. Neurol.* *58*, 1233–1239.

Liu, F., Zaidi, T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., and Gong, C.-X. (2002). Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience* *115*, 829–837.

Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Hart, G.W., and Gong, C.-X. (2004). O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 10804–10809.

Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* *22*, 1942–1950.

Liu, F., Li, B., Tung, E.-J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2007). Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur. J. Neurosci.* *26*, 3429–3436.

Liu, F., Shi, J., Tanimukai, H., Gu, J., Gu, J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2009). Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* *132*, 1820.

Liu, Y., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., and Gong, C.-X. (2008). Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Lett.* *582*, 359–364.

Lopez, J., Schneider, R., Cantrelle, F.-X., Huvent, I., and Lippens, G. (2016).



Studying Intrinsically Disordered Proteins under True In Vivo Conditions by Combined Cross-Polarization and Carbonyl-Detection NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **55**, 7418–7422.

Lu, K.P., Finn, G., Lee, T.H., and Nicholson, L.K. (2007). Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 619–629.

Lu, P.J., Wulf, G., Zhou, X.Z., Davies, P., and Lu, K.P. (1999). The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* **399**, 784–788.

Luc Buée, T.B. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev. Brain Res. Brain Res. Rev.* **33**, 95–130.

Luo, H.-B., Xia, Y.-Y., Shu, X.-J., Liu, Z.-C., Feng, Y., Liu, X.-H., Yu, G., Yin, G., Xiong, Y.-S., Zeng, K., et al. (2014). SUMOylation at K340 inhibits tau degradation through deregulating its phosphorylation and ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 16586–16591.

Luo, J., Ma, J., Yu, D.-Y., Bu, F., Zhang, W., Tu, L.-H., and Wei, Q. (2008). Infusion of FK506, a specific inhibitor of calcineurin, induces potent tau hyperphosphorylation in mouse brain. *Brain Res. Bull.* **76**, 464–468.

Malia, T.J., Teplyakov, A., Ernst, R., Wu, S.-J., Lacy, E.R., Liu, X., Vandermeeren, M., Mercken, M., Luo, J., Sweet, R.W., et al. (2016). Epitope mapping and structural basis for the recognition of phosphorylated tau by the anti-tau antibody AT8. *Proteins* **84**, 427–434.

Mandelkow, E.M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J.R., and Mandelkow, E. (1992). Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett.* **314**, 315–321.

Mandelkow, E.M., Biernat, J., Drewes, G., Gustke, N., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1995). Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol. Aging* **16**, 355-362-363.

Mannige, R.V., Haxton, T.K., Proulx, C., Robertson, E.J., Battigelli, A., Butterfoss, G.L., Zuckermann, R.N., and Whitelam, S. (2015). Peptoid nanosheets exhibit a new secondary-structure motif. *Nature* **526**, 415–420.

de Matos, A.M., de Macedo, M.P., and Rauter, A.P. (2017). Bridging Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease: Assembling the Puzzle Pieces in the Quest for the Molecules With Therapeutic and Preventive Potential. *Med. Res. Rev.*

McKerrow, J.H., and Robinson, A.B. (1971). Deamidation of asparaginyl residues as a hazard in experimental protein and peptide procedures. *Anal. Biochem.* *42*, 565–568.

McKerrow, J.H., and Robinson, A.B. (1974). Primary Sequence Dependence of the Deamidation of Rabbit Muscle Aldolase. *Science* *183*, 85–85.

Mena, R., Edwards, P.C., Harrington, C.R., Mukaetova-Ladinska, E.B., and Wischik, C.M. (1996). Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *91*, 633–641.

Min, S.-W., Cho, S.-H., Zhou, Y., Schroeder, S., Haroutunian, V., Seeley, W.W., Huang, E.J., Shen, Y., Masliah, E., Mukherjee, C., et al. (2010). Acetylation of Tau Inhibits Its Degradation and Contributes to Tauopathy. *Neuron* *67*, 953.

Min, S.-W., Chen, X., Tracy, T.E., Li, Y., Zhou, Y., Wang, C., Shirakawa, K., Minami, S.S., Defensor, E., Mok, S.A., et al. (2015). Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits. *Nat. Med. advance online publication*.

Mondragón-Rodríguez, S., Basurto-Islas, G., Santa-Maria, I., Mena, R., Binder, L.I., Avila, J., Smith, M.A., Perry, G., and García-Sierra, F. (2008). Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *Int. J. Exp. Pathol.* *89*, 81–90.

Montejo de Garcini, E., and Avila, J. (1987). In vitro conditions for the self-polymerization of the microtubule-associated protein, tau factor. *J. Biochem. (Tokyo)* *102*, 1415–1421.

Montejo de Garcini, E., Serrano, L., and Avila, J. (1986). Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *141*, 790–796.

Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., and Mucke, L. (2011). The Many Faces of Tau. *Neuron* *70*, 410–426.

Morris, M., Knudsen, G.M., Maeda, S., Trinidad, J.C., Ioanoviciu, A., Burlingame, A.L., and Mucke, L. (2015). Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat. Neurosci.* *18*, 1183–1189.

Mufson, E.J., Mahady, L., Waters, D., Counts, S.E., Perez, S.E., DeKosky, S.T., Ginsberg, S.D., Ikonomic, M.D., Scheff, S.W., and Binder, L.I. (2015). Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer's disease. *Neuroscience* *309*, 51–67.

Muir, T.W., Sondhi, D., and Cole, P.A. (1998). Expressed protein ligation: A general method for protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 6705–6710.

Mukrasch, M.D., Biernat, J., von Bergen, M., Griesinger, C., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2005). Sites of tau important for aggregation populate {beta}-structure and bind to microtubules and polyanions. *J. Biol. Chem.* *280*, 24978–24986.

Mukrasch, M.D., Bergen, M. von, Biernat, J., Fischer, D., Griesinger, C., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2007). The “Jaws” of the Tau-Microtubule Interaction. *J. Biol. Chem.* *282*, 12230–12239.

Multhaup, G., Huber, O., Buée, L., and Galas, M.-C. (2015). Amyloid Precursor Protein (APP) Metabolites APP Intracellular Fragment (AICD), A $\beta$ 42, and Tau in Nuclear Roles. *J. Biol. Chem.* *290*, 23515–23522.

Murray, M.E., Kouri, N., Lin, W.-L., Jack, C.R., Dickson, D.W., and Vemuri, P. (2014). Clinicopathologic assessment and imaging of tauopathies in neurodegenerative dementias. *Alzheimers Res. Ther.* *6*, 1.

Murthy, S.N., Wilson, J.H., Lukas, T.J., Kuret, J., and Lorand, L. (1998). Cross-linking sites of the human tau protein, probed by reactions with human transglutaminase. *J. Neurochem.* *71*, 2607–2614.

Nacharaju, P., Ko, L., and Yen, S.H. (1997). Characterization of in vitro glycation sites of tau. *J. Neurochem.* *69*, 1709–1719.

Necula, M., and Kuret, J. (2004). Pseudophosphorylation and Glycation of Tau Protein Enhance but Do Not Trigger Fibrillization in Vitro. *J. Biol. Chem.* *279*, 49694–49703.

Nelson, P.T., Alafuzoff, I., Bigio, E.H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N.J., Castellani, R.J., Crain, B.J., Davies, P., Del Tredici, K., et al. (2012). Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 362–381.

Nicoll, J.A.R., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., and Weller, R.O. (2003). Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat. Med.* 9, 448–452.

Nikolaev, A., McLaughlin, T., O’Leary, D., and Tessier-Lavigne, M. (2009). N-APP binds DR6 to cause axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457, 981.

Papasozomenos, S.C., and Binder, L.I. (1987). Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil. Cytoskeleton* 8, 210–226.

Pelech, S.L. (1995). Networking with proline-directed protein kinases implicated in tau phosphorylation. *Neurobiol. Aging* 16, 247-256-261.

Pérez, M., Valpuesta, J.M., Medina, M., Montejo de Garcini, E., and Avila, J. (1996). Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J. Neurochem.* 67, 1183–1190.

Peric, S., Mandic-Stojmenovic, G., Markovic, I., Stefanova, E., Ilic, V., Parojcic, A., Misirlic-Dencic, S., Ostojic, M., Rakocevic-Stojanovic, V., and Kostic, V. (2014). Cerebrospinal fluid biomarkers of neurodegeneration in patients with juvenile and classic myotonic dystrophy type 1. *Eur. J. Neurol.* 21, 231–237.

Perl, D.P. (2010). Neuropathology of Alzheimer’s Disease. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 77, 32.

Peters, A., Schweiger, U., Pellerin, L., Hubold, C., Oltmanns, K.M., Conrad, M., Schultes, B., Born, J., and Fehm, H.L. (2004). The selfish brain: competition for energy resources. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 143–180.

Pooler, A.M., Polydoro, M., Maury, E.A., Nicholls, S.B., Reddy, S.M., Wegmann, S., William, C., Saqran, L., Cagsal-Getkin, O., Pitstick, R., et al. (2015). Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 3, 14.

Poorkaj, P., Bird, T.D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R.M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W.C., Raskind, M., and Schellenberg, G.D. (1998). Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* **43**, 815–825.

Qi, H., Prabakaran, S., Cantrelle, F.-X., Chambrud, B., Gunawardena, J., Lippens, G., and Landrieu, I. (2016). Characterization of Neuronal Tau Protein as a Target of Extracellular Signal-regulated Kinase. *J. Biol. Chem.* **291**, 7742–7753.

Qian, W., Yin, X., Hu, W., Shi, J., Gu, J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C.-X., and Liu, F. (2011). Activation of protein phosphatase 2B and hyperphosphorylation of Tau in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* **23**, 617–627.

Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P., and Ferreira, A. (2002). Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 6364–6369.

Reimann, O., Smet-Nocca, C., and Hackenberger, C.P.R. (2015a). Traceless purification and desulfurization of tau protein ligation products. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **54**, 306–310.

Reimann, O., Smet-Nocca, C., and Hackenberger, C.P.R. (2015b). Traceless Purification and Desulfurization of Tau Protein Ligation Products. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 306–310.

Reimann, O., Smet-Nocca, C., and Hackenberger, C.P.R. (2017). Tag-Free Semi-Synthesis of the Tau Protein. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1523**, 215–235.

Robertson, L.A., Moya, K.L., and Breen, K.C. (2004). The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* **6**, 489–495.

Robinson, N.E. (2002). Protein deamidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5283–5288.

Robinson, N.E., and Robinson, A.B. (2001). Deamidation of human proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 12409–12413.

Robinson, A.B., McKerrow, J.H., and Legaz, M. (1974). Sequence Dependent Deamidation Rates for Model Peptides of Cytochrome C. *Int. J. Pept. Protein Res.* **6**, 31–35.

Rosen, R.F., Farberg, A.S., Gearing, M., Dooyema, J., M. Long, P., Anderson, D.C., Davis-Turak, J., Coppola, G., Geschwind, D.H., Paré, J.-F., et al. (2008). Tauopathy with paired helical filaments in an aged chimpanzee. *J. Comp. Neurol.* *509*, 259–270.

Rubinsztein, D.C. (1997). The genetics of Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* *52*, 447–454.

Sato, Y., Naito, Y., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Endo, T. (2001). Analysis of N-glycans of pathological tau: possible occurrence of aberrant processing of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* *496*, 152–160.

Schettini, G., Govoni, S., Racchi, M., and Rodriguez, G. (2010). Phosphorylation of APP-CTF-AICD domains and interaction with adaptor proteins: signal transduction and/or transcriptional role--relevance for Alzheimer pathology. *J. Neurochem.* *115*, 1299–1308.

Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Bégard, S., Brion, J.-P., Hamdane, M., and Buée, L. (2006). Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am. J. Pathol.* *169*, 599–616.

Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.M. (1999). Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry (Mosc.)* *38*, 3549–3558.

Schrader, T., Bitan, G., and Klärner, F.-G. (2016). Molecular tweezers for lysine and arginine - powerful inhibitors of pathologic protein aggregation. *Chem. Commun. Camb. Engl.* *52*, 11318–11334.

Schwagerus, S., Reimann, O., Despres, C., Smet-Nocca, C., and Hackenberger, C.P.R. (2016). Semi-synthesis of a tag-free O-GlcNAcylated tau protein by sequential chemoselective ligation. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.*

Schweers, O., Mandelkow, E.M., Biernat, J., and Mandelkow, E. (1995). Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 8463–8467.

Scott, C.W., Blowers, D.P., Barth, P.T., Lo, M.M., Salama, A.I., and Caputo, C.B. (1991). Differences in the abilities of human tau isoforms to promote microtubule assembly. *J. Neurosci. Res.* *30*, 154–162.

Sergeant, N., Wattez, A., and Delacourte, A. (1999). Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively “exon 10” isoforms. *J. Neurochem.* *72*, 1243–1249.

Sergeant, N., Delacourte, A., and Buée, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* *1739*, 179–197.

Shafiei, S.S., Guerrero-Muñoz, M.J., and Castillo-Carranza, D.L. (2017). Tau Oligomers: Cytotoxicity, Propagation, and Mitochondrial Damage. *Front. Aging Neurosci.* *9*.

Shang, F., Deng, G., Liu, Q., Guo, W., Haas, A.L., Crosas, B., Finley, D., and Taylor, A. (2005). Lys6-modified ubiquitin inhibits ubiquitin-dependent protein degradation. *J. Biol. Chem.* *280*, 20365–20374.

Shen, D.L., Gloster, T.M., Yuzwa, S.A., and Vocadlo, D.J. (2012). Insights into O-Linked N-Acetylglucosamine ([0-9]O-GlcNAc) Processing and Dynamics through Kinetic Analysis of O-GlcNAc Transferase and O-GlcNAcase Activity on Protein Substrates. *J. Biol. Chem.* *287*, 15395.

Sibille, N., Sillen, A., Leroy, A., Wieruszeski, J.-M., Mulloy, B., Landrieu, I., and Lippens, G. (2006). Structural impact of heparin binding to full-length Tau as studied by NMR spectroscopy. *Biochemistry (Mosc.)* *45*, 12560–12572.

Sillen, A., Leroy, A., Wieruszeski, J.-M., Loyens, A., Beauvillain, J.-C., Buée, L., Landrieu, I., and Lippens, G. (2005). Regions of tau implicated in the paired helical fragment core as defined by NMR. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *6*, 1849–1856.

Sillen, A., Barbier, P., Landrieu, I., Lefebvre, S., Wieruszeski, J.-M., Leroy, A., Peyrot, V., and Lippens, G. (2007). NMR investigation of the interaction between the neuronal protein tau and the microtubules. *Biochemistry (Mosc.)* *46*, 3055–3064.

Singh, T.J., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996). Non-proline-dependent protein kinases phosphorylate several sites found in tau from Alzheimer disease brain. *Mol. Cell. Biochem.* *154*, 143–151.

Sinha, S., Lopes, D.H.J., Du, Z., Pang, E.S., Shanmugam, A., Lomakin, A., Talbiersky, P., Tennstaedt, A., McDaniel, K., Bakshi, R., et al. (2011). Lysine-specific molecular tweezers are broad-spectrum inhibitors of assembly and toxicity of amyloid proteins. *J. Am. Chem. Soc.* *133*, 16958–16969.

Skorobogatko, Y.V., Deuso, J., Adolf-Bryfogle, J., Adolf-Bergfoyle, J., Nowak, M.G., Gong, Y., Lippa, C.F., and Vosseller, K. (2011). Human Alzheimer's disease synaptic O-GlcNAc site mapping and iTRAQ expression proteomics with ion trap mass spectrometry. *Amino Acids* *40*, 765–779.

Smet, C., Sambo, A.-V., Wieruszeski, J.-M., Leroy, A., Landrieu, I., Buée, L., and Lippens, G. (2004). The peptidyl prolyl cis/trans-isomerase Pin1 recognizes the phospho-Thr212-Pro213 site on Tau. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 2032–2040.

Smet, C., Wieruszeski, J.-M., Buée, L., Landrieu, I., and Lippens, G. (2005). Regulation of Pin1 peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity by its WW binding module on a multi-phosphorylated peptide of Tau protein. *FEBS Lett.* *579*, 4159–4164.

Smet-Nocca, C., Broncel, M., Wieruszeski, J.-M., Tokarski, C., Hanouille, X., Leroy, A., Landrieu, I., Rolando, C., Lippens, G., and Hackenberger, C.P.R. (2011). Identification of O-GlcNAc sites within peptides of the Tau protein and their impact on phosphorylation. *Mol. Biosyst.* *7*, 1420–1429.

Smith, M.A., Tabaton, M., and Perry, G. (1996). Early contribution of oxidative glycation in Alzheimer disease. *Neurosci. Lett.* *217*, 210–211.

Song, M.S., Rauw, G., Baker, G.B., and Kar, S. (2008). Memantine protects rat cortical cultured neurons against beta-amyloid-induced toxicity by attenuating tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* *28*, 1989–2002.

Spillantini, M.G., Bird, T.D., and Ghetti, B. (1998). Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *8*, 387–402.

Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Bruynseels, K., Vandezande, K., Laenen, I., Geerts, H., Mercken, M., Sciot, R., Van Lommel, A., et al. (1999). Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am. J. Pathol.* *155*, 2153–2165.



Stern, J.L., Lessard, D.V., Hoeprich, G.J., Morfini, G.A., and Berger, C.L. (2017). Phospho-regulation of tau modulates inhibition of kinesin-1 motility. *Mol. Biol. Cell.*

Sugata, H., Matsuo, K., Nakagawa, T., Takahashi, M., Mukai, H., Ono, Y., Maeda, K., Akiyama, H., and Kawamata, T. (2009). A peptidyl-prolyl isomerase, FKBP12, accumulates in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neurosci. Lett.* *459*, 96–99.

Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., et al. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J. Biol. Chem.* *286*, 4566–4575.

Swatton, J.E., Sellers, L.A., Faull, R.L.M., Holland, A., Iritani, S., and Bahn, S. (2004). Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 2711–2719.

Takahashi, K., Ishida, M., Komano, H., and Takahashi, H. (2008). SUMO-1 immunoreactivity co-localizes with phospho-Tau in APP transgenic mice but not in mutant Tau transgenic mice. *Neurosci. Lett.* *441*, 90–93.

Tanemura, K., Murayama, M., Akagi, T., Hashikawa, T., Tominaga, T., Ichikawa, M., Yamaguchi, H., and Takashima, A. (2002). Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 133–141.

Tatebayashi, Y., Miyasaka, T., Chui, D.-H., Akagi, T., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Tanemura, K., Murayama, M., Ishiguro, K., et al. (2002). Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 13896–13901.

Tatro, E.T., Everall, I.P., Kaul, M., and Achim, C.L. (2009). Modulation of glucocorticoid receptor nuclear translocation in neurons by immunophilins FKBP51 and FKBP52: implications for major depressive disorder. *Brain Res.* *1286*, 1–12.

Taylor, R.P., Parker, G.J., Hazel, M.W., Soesanto, Y., Fuller, W., Yazzie, M.J., and McClain, D.A. (2008). Glucose Deprivation Stimulates O-GlcNAc Modification of Proteins through Up-regulation of O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* *283*, 6050–6057.

Thomas, S.N., Funk, K.E., Wan, Y., Liao, Z., Davies, P., Kuret, J., and Yang, A.J. (2012). Dual modification of Alzheimer's disease PHF-tau protein by lysine methylation and ubiquitylation: a mass spectrometry approach. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 105.

Torres, C.R., and Hart, G.W. (1984). Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* 259, 3308–3317.

Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1995). Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol. Biol. Cell* 6, 1887–1902.

Trzeciakiewicz, H., Tseng, J.-H., Wander, C.M., Madden, V., Tripathy, A., Yuan, C.-X., and Cohen, T.J. (2017). A Dual Pathogenic Mechanism Links Tau Acetylation to Sporadic Tauopathy. *Sci. Rep.* 7, 44102.

Tucholski, J., Kuret, J., and Johnson, G.V. (1999). Tau is modified by tissue transglutaminase in situ: possible functional and metabolic effects of polyamination. *J. Neurochem.* 73, 1871–1880.

Uversky, V.N. (2002). Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 11, 739–756.

Varki, A., Freeze, H.H., and Gagneux, P. (2009). Evolution of Glycan Diversity. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.

Wainaina, M.N., Chen, Z., and Zhong, C. (2014). Environmental factors in the development and progression of late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* 30, 253–270.

Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996). Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 871–875.

Wang, Z., Udeshi, N.D., O'Malley, M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Hart, G.W. (2010). Enrichment and site mapping of O-linked N-acetylglucosamine by a combination of chemical/enzymatic tagging, photochemical cleavage, and electron

transfer dissociation mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 9, 153–160.

Wani, W.Y., Chatham, J.C., Darley-USmar, V., McMahon, L.L., and Zhang, J. (2016). O-GlcNAcylation and neurodegeneration. *Brain Res. Bull.*

Ward, J.J., Sodhi, J.S., McGuffin, L.J., Buxton, B.F., and Jones, D.T. (2004). Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J. Mol. Biol.* 337, 635–645.

Watanabe, A., Takio, K., and Ihara, Y. (1999). Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments. Unusual properties of the microtubule-binding domain of tau. *J. Biol. Chem.* 274, 7368–7378.

Wille, H., Drewes, G., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1992). Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *J. Cell Biol.* 118, 573–584.

Wischik, C.M. (1989). Cell biology of the Alzheimer tangle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 115–122.

Wischik, C.M., Novak, M., Edwards, P.C., Klug, A., Tichelaar, W., and Crowther, R.A. (1988). Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4884–4888.

Wischik, C.M., Edwards, P.C., Lai, R.Y., Gertz, H.N., Xuereb, J.H., Paykel, E.S., Brayne, C., Huppert, F.A., Mukaetova-Ladinska, E.B., and Mena, R. (1995). Quantitative analysis of tau protein in paired helical filament preparations: implications for the role of tau protein phosphorylation in PHF assembly in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 16, 409-417-431.

Wischik, C.M., Harrington, C.R., and Storey, J.M.D. (2014). Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* 88, 529–539.

Wittmann, C.W., Wszolek, M.F., Shulman, J.M., Salvaterra, P.M., Lewis, J., Hutton, M., and Feany, M.B. (2001). Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293, 711–714.

Xie, M., and Schowen, R.L. (1999). Secondary structure and protein deamidation. *J. Pharm. Sci.* 88, 8–13.

Xie, Y., Zhang, J., Yin, S., and Loo, J.A. (2006). Top-down ESI-ECD-FT-ICR

mass spectrometry localizes noncovalent protein-ligand binding sites. *J. Am. Chem. Soc.* *128*, 14432–14433.

Yamamoto, T., and Hirano, A. (1986). A comparative study of modified Bielschowsky, Bodian and thioflavin S stains on Alzheimer's neurofibrillary tangles. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *12*, 3–9.

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* *53*, 337–351.

Yuzwa, S.A., Yadav, A.K., Skorobogatko, Y., Clark, T., Vosseller, K., and Vocadlo, D.J. (2011). Mapping O-GlcNAc modification sites on tau and generation of a site-specific O-GlcNAc tau antibody. *Amino Acids* *40*, 857–868.

Yuzwa, S.A., Cheung, A.H., Okon, M., McIntosh, L.P., and Vocadlo, D.J. (2014). O-GlcNAc modification of tau directly inhibits its aggregation without perturbing the conformational properties of tau monomers. *J. Mol. Biol.* *426*, 1736–1752.

Zhang, J.Y., Liu, S.J., Li, H.L., and Wang, J.-Z. (2005). Microtubule-associated protein tau is a substrate of ATP/Mg(2+)-dependent proteasome protease system. *J. Neural Transm. Vienna Austria* *1996* *112*, 547–555.

Zhang, W., Ganguly, D., and Chen, J. (2012). Residual structures, conformational fluctuations, and electrostatic interactions in the synergistic folding of two intrinsically disordered proteins. *PLoS Comput. Biol.* *8*, e1002353.

Zhao, L.N., Long, H., Mu, Y., and Chew, L.Y. (2012). The Toxicity of Amyloid  $\beta$  Oligomers. *Int. J. Mol. Sci.* *13*, 7303–7327.

Zheng, W.-H., Bastianetto, S., Mennicken, F., Ma, W., and Kar, S. (2002). Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* *115*, 201–211.

Zhou, X.Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P.J., Shen, M., Stoller, G., Küllertz, G., Stark, M., Fischer, G., and Lu, K.P. (2000). Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol. Cell* *6*, 873–883.

Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Van Deerlin, V.M., Bruce, J., Shuck,

T., Grossman, M., Clark, C.M., Arnold, S.E., Masliah, E., Galasko, D., et al. (2001). Loss of brain tau defines novel sporadic and familial tauopathies with frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* *49*, 165–175.

Zimmerman, S.C., and VanZyl, C.M. (1987). Rigid molecular tweezers: synthesis, characterization, and complexation chemistry of a diacridine. *J. Am. Chem. Soc.* *109*, 7894–7896.



# **Annexes**





# Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation

Clément Despres<sup>a</sup>, Cillian Byrne<sup>b,c</sup>, Haoling Qi<sup>a</sup>, François-Xavier Cantrelle<sup>a</sup>, Isabelle Huvent<sup>a</sup>, Béatrice Chambraud<sup>d</sup>, Etienne-Emile Baulieu<sup>d,1</sup>, Yves Jacquot<sup>b</sup>, Isabelle Landrieu<sup>a</sup>, Guy Lippens<sup>e,1</sup>, and Caroline Smet-Nocca<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS UMR 8576, Université de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France; <sup>b</sup>Laboratoire des Biomolécules, CNRS UMR 7203, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Ecole Normale Supérieure-Paris Sciences et Lettres Research University, 75252 Paris cedex 05, France; <sup>c</sup>Institut Baulieu, Inserm UMR 1195, Université Paris-Saclay, 94276 Le Kremlin Bicêtre, France; <sup>d</sup>Inserm UMR 1195, Université Paris-Saclay, 94276 Le Kremlin Bicêtre, France; and <sup>e</sup>Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, CNRS, Institut National des Sciences Appliquées, Institut National de Recherche Agronomique, Université de Toulouse, 31077 Toulouse, France

Contributed by Etienne-Emile Baulieu, July 10, 2017 (sent for review June 16, 2017; reviewed by Michel Goedert and Jürgen Götz)

**Determining the functional relationship between Tau phosphorylation and aggregation has proven a challenge owing to the multiple potential phosphorylation sites and their clustering in the Tau sequence. We use here in vitro kinase assays combined with NMR spectroscopy as an analytical tool to generate well-characterized phosphorylated Tau samples and show that the combined phosphorylation at the Ser202/Thr205/Ser208 sites, together with absence of phosphorylation at the Ser262 site, yields a Tau sample that readily forms fibers, as observed by thioflavin T fluorescence and electron microscopy. On the basis of conformational analysis of synthetic phosphorylated peptides, we show that aggregation of the samples correlates with destabilization of the turn-like structure defined by phosphorylation of Ser202/Thr205.**

Tau | phosphorylation | aggregation | Alzheimer's disease | NMR

The brains of patients with Alzheimer's disease (AD) are characterized at the molecular level by two different lesions: extraneuronal amyloid plaques and intraneuronal tangles (1). Whereas the former are composed of the A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 peptide (2), the tangles contain fibrillary structures mainly composed of the microtubule-associated Tau protein (3–5). Early on, it was found that the Tau molecules in these fibrillary structures are phosphorylated at distinct sites and to elevated levels, of which neither is found in a healthy brain (6). These observations led to the term of hyperphosphorylated Tau, with a characteristic gel shift in SDS/PAGE (7, 8). The latter shift can, however, also be caused by a single phosphorylation event (9), so a precise definition of hyperphosphorylation in terms of sites and stoichiometry is still lacking. Phosphorylation of Tau gained direct clinical importance when the traditional assay to determine postmortem the progression of AD (based on Gallyas silver staining of the amyloid structures in the brain) was replaced by an immunohistochemistry assay with the AT8 antibody (10). The epitope of this antibody was mapped for more than 20 y to a doubly phosphorylated peptide of Tau centered at positions Ser202/Thr205 (following the numbering of the longest 2N4R adult isoform, Tau441) (11–13). A combined NMR and molecular dynamics study showed that this phosphopeptide adopts a particular turn-like structure in solution (14). Only very recently has the crystal structure of its fragment antigen body (Fab) with different phosphorylated peptides suggested that a third phosphorylation event at position Ser208 might lead to an epitope with an even better affinity (15). However, whether phosphorylation is a driver of aggregation remains unclear, and even more so the precise definition of the phosphopattern or phosphopatterns that can cause the aggregation of Tau.

Although earlier work with recombinant Tau phosphorylated by a rat brain extract suggested this posttranslational modification (PTM) is sufficient to promote fiber formation (16), the Tau aggregation inhibitor methylene blue was discovered in an assay independent of this PTM (17, 18). Its clinical failure underscores that further knowledge of the aggregation process is still required.

More recently, significant efforts to discover Tau aggregation inhibitors have relied on the discovery that poly-anions such as heparin promote the assembly of nonphosphorylated recombinant Tau (19, 20), leading to fibrillary structures with the same morphology as the paired helical filaments (PHFs) observed in AD brains (21). While seeding aggregation with AD brain-derived PHFs has been reported in vitro for recombinant Tau (22, 23), as well as in vivo (24–26), it still does not answer whether phosphorylation can drive the initial nucleation of fibers.

We show here that disrupting the turn-like structure of the pSer202/pThr205-centered Tau peptide (14) by the substitution of Gly207 to a Val induces fiber formation for a fragment of Tau after phosphorylation by activated ERK2 kinase. This mutation never having been described for patients, we then use the kinase activity of rat brain extract to phosphorylate not only the Ser202/Thr205 sites but equally the Ser208 site in the native sequence. Because this kinase activity also phosphorylates Ser262, which was reported to interfere with Tau aggregation (27), we mutate this Ser to an Ala and show that the resulting phosphorylation pattern induces aggregation of a full-length Tau sample without the addition of any exogenous poly-anion. Our present work hence confirms that phosphorylation can induce Tau aggregation, defines the precise pattern of phosphorylation that leads to aggregation, and links it to disruption of the turn-like structure induced by phosphorylation of Ser202/Thr205. It thereby provides a framework to study potential aggregation inhibitors in the context of a well-defined phosphorylated Tau species.

## Significance

**In Alzheimer's disease, the microtubule-associated protein Tau is invariably found in a hyperphosphorylated and aggregated form. Whether (hyper)phosphorylation can drive aggregation is less clear, and no precise phosphorylation pattern leading to aggregation has been described. Combining in vitro phosphorylation assays with purified kinases and a rat brain extract with the analytical power of NMR spectroscopy, we unravel here the phosphorylation pattern of Tau that drives its aggregation. The results point to the importance of this posttranslational modification in Tau's aggregation and suggest orienting therapeutic strategies toward phosphorylated Tau.**

Author contributions: E.-E.B., Y.J., I.L., G.L., and C.S.-N. designed research; C.D., C.B., H.Q., F.-X.C., and I.H. performed research; C.B., H.Q., I.H., B.C., E.-E.B., and Y.J. contributed new reagents/analytic tools; C.D., I.L., G.L., and C.S.-N. analyzed data; and G.L. and C.S.-N. wrote the paper.

Reviewers: M.G., MRC Laboratory of Molecular Biology; and J.G., The University of Queensland.

The authors declare no conflict of interest.

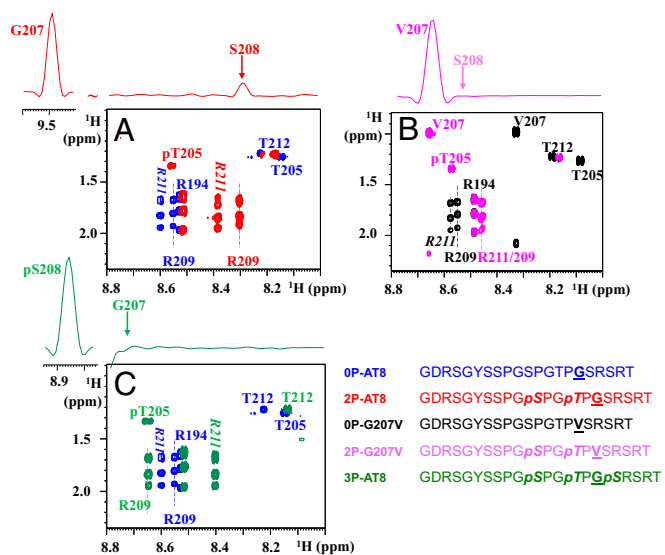
<sup>1</sup>To whom correspondence may be addressed. Email: glippens@insa-toulouse.fr, etienne.baulieu@inserm.fr, or caroline.smet@univ-lille1.fr.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1708448114/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1708448114/-DCSupplemental).

## Results

**The Gly207Val Substitution Breaks the 2P-AT8 Turn-Like Structure in a Peptide Model.** A combined NMR and molecular dynamics study on a doubly phosphorylated Tau peptide centered on the AT8 epitope (2P-AT8) showed that as a result of phosphorylation of Ser202/Thr205, a hydrogen bond forms over the ring of the Pro206 between the pThr205 phosphate side-chain and the amide proton of Gly207 (14) (*SI Appendix, Fig. S1*). As a result, the amide proton of Gly207 experiences a downfield chemical shift from 8.4 to 9.5 ppm (14) (*SI Appendix, Figs. S1 and S2A*). Although Arg209 and Arg211 further stabilize this helical turn motif, molecular dynamics simulations showed that conformational heterogeneity is still possible for this site (14). Phosphorylation of threonine in two identical Thr-Pro-Gly motifs of the initially intrinsically disordered 4E-BP2 protein also induces similar turns and leads to the folding of 4E-BP2 into a stable four-stranded  $\beta$ -sheet (28) (*SI Appendix, Fig. S1*). In 4E-BP2, these two phosphorylation-induced turn motifs are completely stable in the resulting  $\beta$ -sheet, as witnessed by their glycine amide protons shifting to  $\sim$ 11 ppm after phosphorylation (28). When valines were substituted for the glycines in both 4E-BP2 Thr-Pro-Gly motifs, they were found to disrupt hairpin formation through steric hindrance, and even prevent folding of 4E-BP2 after phosphorylation (28).

In light of these observations, we first substituted the Gly207 by a Val in the 2P-AT8 peptide model to see whether the helical turn in Tau would be disrupted by this mutation, and compared the NMR spectra of both peptides (Fig. 1 *A* and *B* and *SI Appendix, Figs. S2 and S3*). The amide proton of Val207 in the 2P-G207V peptide shifts a mere 0.3 ppm on phosphorylation of Ser202/Thr205 (*SI Appendix, Fig. S3A*), far from the 0.9-ppm shift experienced by the Gly207 in the native Tau sequence (*SI Appendix, Fig. S2A*). The absence of the turn in the 2P-G207V peptide is evident by the absence of an NOE contact between the amide protons of



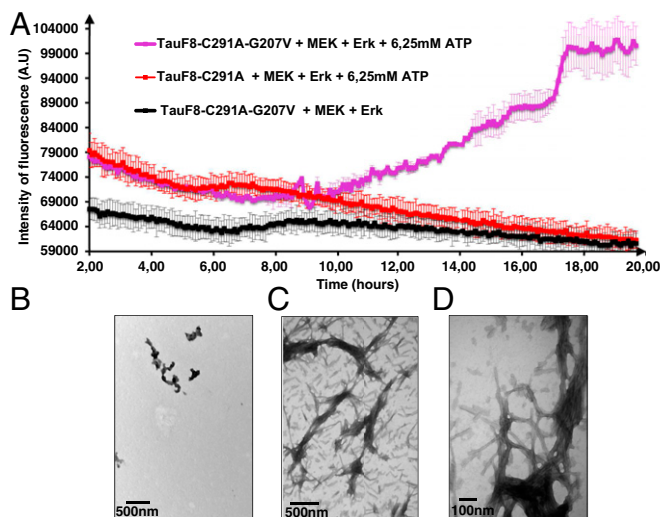
**Fig. 1.** Breaking the turn-like structure by the Gly207Val mutation or by phosphorylation of Ser208. Zooms of the homonuclear TOCSY spectra of the nonmodified and phosphorylated peptides centered on the Thr205 and Arg209/211 residues. (*Upper*) The 1D traces are extracted from the corresponding NOESY spectra on the phosphorylated peptides. (*A*) Phosphorylation of the WT peptide at Ser202/Thr205, as in the 2P-AT8 peptide, leads to an important shift for the Arg209 amide proton and is accompanied by an NOE contact between the amide protons of Gly207 and Ser208, indicative of the phosphorylation-induced turn (14). (*B*) When Gly207 is substituted for a Val, the absence of an NOE contact in the 2P-G207V peptide between the amide protons of Val207 and Ser208 and the reduced shift for Arg209 indicate a destabilization of the turn-like structure. (*C*) Additional phosphorylation of Ser208 in the 3P-AT8 peptide has a similar effect as the Gly-to-Val substitution at position 207.

Val207 and Ser208 (Fig. 1*B* and *SI Appendix, Fig. S3B*). Whereas the Arg209 amide proton shifts 0.3 ppm upfield on phosphorylation of Thr205 in the 2P-AT8 peptide (*SI Appendix, Fig. S2A*), phosphorylation of Ser202/Thr205 in this Gly207Val-modified peptide causes only a minor 0.1-ppm shift of the Arg209 amide proton (*SI Appendix, Fig. S3A*). The Gly-to-Val substitution at position 207 hence destabilizes the turn induced by phosphorylation of Ser202/Thr205 and decouples effectively the down- and upstream residues of Pro206.

**The Gly207Val Mutation in a Tau Fragment Promotes Phosphorylation-Induced Aggregation.** To ascertain that the same substitution also destabilizes the turn-like conformation in a larger Tau construct, we extended the functional TauF4 fragment (Tau 208–324) (29, 30) by 16 residues so as to start at the same Gly192 residue as the above-described AT8 peptide models (*SI Appendix, Fig. S4*). Incubation with the recombinant activated ERK2 kinase led to the p-TauF8 sample, incorporating phosphates at many sites, similar to what we observed previously for full-length Tau (31) (*SI Appendix, Fig. S5*). NMR assignment and quantification of p-TauF8 showed in particular that both Ser202 and Thr205 were completely phosphorylated, with concomitant induction of the turn-like structure, as validated by the downfield shift of the Gly207 amide proton, as seen in the peptide model (*SI Appendix, Fig. S5*). Mutating Gly207 to a Val in the same TauF8 fragment and subsequent phosphorylation by the activated ERK2 kinase led to a comparable phosphorylation pattern, as assessed by NMR (*SI Appendix, Fig. S6*). However, Val207 in the spectrum of the phosphorylated TauF8-G207V fragment does not shift significantly, but only to a position equivalent to that in the peptide model. We equally observed the absence of a significant chemical shift change for Arg209 in the p-TauF8-G207V spectrum (*SI Appendix, Fig. S6*). The effective decoupling of the residues N and C terminal to the central Pro206 due to a Val at position 207 hence is also observed in the Erk-phosphorylated TauF8 fragment.

During the 20-h incubation to phosphorylate the TauF8-G207V fragment with the activated ERK2 kinase, a sizeable amount of aggregated material visible to the naked eye appeared in the reaction mixture. To test whether disrupting the turn-like structure leads to amyloid-like structures, we set up a thioflavin T (ThT) assay (32) during the phosphorylation reaction. TauF8 and TauF8-G207V fragments were incubated with the recombinant MEK3 and ERK2 kinases, and aggregation on phosphorylation was monitored in situ by ThT fluorescence emission at 490 nm. An increase of ThT signal was observed after a lag time of 10 h only for the TauF8-G207V fragment (Fig. 2*A*), confirming aggregation takes place during the overnight TauF8-G207V phosphorylation process. Electron microscopy confirmed the presence of many bona fide fibrils for the phosphorylated TauF8-G207V fragment (Figs. 2*B* and *C*). In agreement with our previous results on full-length Tau (31), no ThT response could be detected during the phosphorylation of the TauF8 sample, and further analysis by electron microscopy of this sample showed very few structures after 20 h of incubation (Fig. 2*D*). When combined with ERK2 catalyzed phosphorylation, the turn-like disrupting G207V mutation in TauF8 hence leads to fast aggregation that already occurs during the phosphorylation reaction.

**Triple Phosphorylation at the AT8 Epitope Equally Breaks the Turn and Promotes Tau Aggregation.** Because no G207 Tau mutation has ever been described, we wondered whether a PTM might destabilize the turn-like structure in a similar manner. An obvious candidate is the phosphorylation of the nearby Ser208, recently added to the AT8 epitope on top of the phosphorylated Ser202/Thr205 residues (15). The crystal structure of a triply phosphorylated Tau peptide in complex with the AT8 Fab shows the peptide in an extended conformation compatible with a model whereby it would interfere with the turn-like structure in a similar way as the G207V mutation (*SI Appendix, Fig. S7*). To characterize the potential structural changes induced by the simultaneous phosphorylation of Ser208 and Ser202/Thr205, we synthesized the triply phosphorylated peptide



**Fig. 2.** Destabilizing the turn by the G207V mutation combined with ERK2-mediated phosphorylation leads to aggregation of the TauF8 fragment. (A) Aggregation of TauF8 (without external inducers) during the phosphorylation reaction, as followed by ThT emission at 490 nm. An increase in ThT emission is observed only for the G207V mutant. Error bars correspond to three independent aggregation experiments, with new batches of TauF8, TauF8-G207V, MEK, and ERK2 kinases. (B–D) TEM at the end point of the phosphorylation reactions shows a large amount of fibrils after phosphorylation of the TauF8-G207V mutant (B and C), but only a smattering of fibril-like structures for the wt TauF8 (D).

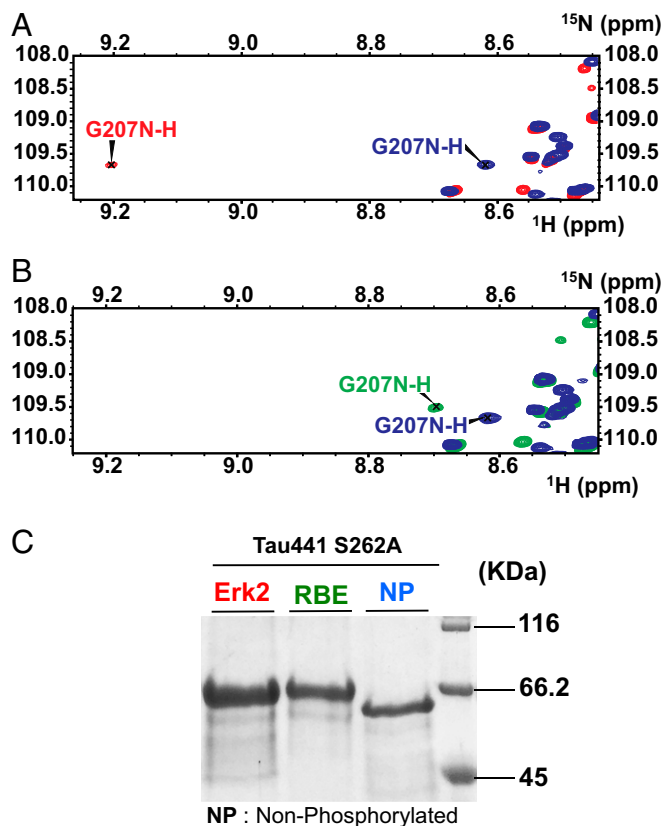
(3P-AT8) and analyzed its conformation by NMR spectroscopy (Fig. 1C and *SI Appendix*, Fig. S8). The most obvious change induced by the additional phosphorylation of Ser208 is the amide proton shift of Gly207 that returns from 9.5 ppm in the doubly phosphorylated peptide (2P-AT8; *SI Appendix*, Fig. S2) to 8.7 ppm when Ser208 is additionally phosphorylated in the 3P-AT8 peptide (*SI Appendix*, Fig. S8). Further evidence for disruption of the turn-like structure in this 3P-AT8 peptide comes from the absence of a Gly207-pSer208  $H_N-H_N$  NOE contact (Fig. 1C). Additional phosphorylation at position 208 hence prevents the turn-like structure in a manner similar to the Gly-to-Val mutation at position 207.

We have previously confirmed that ERK2, as a proline-directed kinase, does not phosphorylate the Ser208 residue (31). However, the kinase activity of a rat brain extract (RBE) in the presence of serine/threonine phosphatase inhibitor okadaic acid can lead to phosphorylation of the Ser208 site, but also phosphorylates Ser262 (31). As phosphorylation of Ser262 has been described as inhibitory for Tau aggregation (27), we mutated Ser262 to alanine in the TauF8 fragment and phosphorylated the resulting TauF8-S262A sample by the RBE. After only 5 h of incubation with RBE, we observed a quasi-total loss of the soluble fraction and the formation of a pellet composed of aggregates and fibers (*SI Appendix*, Fig. S9).

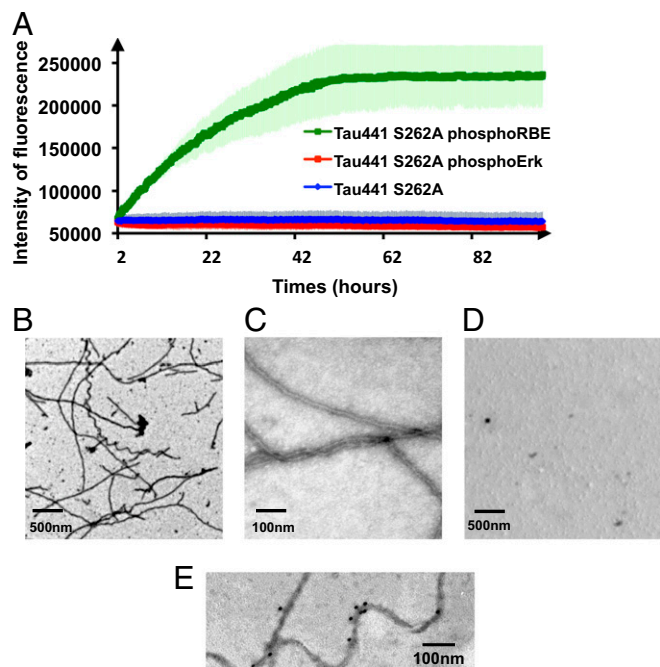
Fragments of Tau devoid of their N or C termini tend to aggregate faster than full-length Tau (33, 34), leading us to consider the effect of the phosphorylation of Ser208 in the context of Tau441. However, when previously using the RBE kinase activity with Tau441 as a substrate, we did not obtain significant amounts of protein aggregates (31). With hindsight, and suspecting the inhibitory role of Ser262 phosphorylation not only in a heparin-derived assay (27) but equally when phosphorylation is the driver, we produced both WT and the S262A mutant of Tau441 (Tau441-S262A). On independent incubation with the activated ERK2 kinase or with the RBE, none of the full-length Tau samples aggregated to a significant extent during the phosphorylation reaction. Closer NMR analysis of the resulting phosphorylation patterns showed that Thr205 is fully phosphorylated both by the activated ERK2 kinase (*SI Appendix*, Fig. S10) and the kinase activity present in RBE (*SI Appendix*, Fig. S11), but Ser208 is exclusively phosphorylated by

kinases of the RBE (*SI Appendix*, Fig. S11). The similar gel shift of both phosphorylated samples in an SDS/PAGE analysis (Fig. 3C) shows the superior analytical power of NMR spectroscopy in deciphering complex PTM patterns. Similar to the peptide models, the downfield shift of the Gly207 amide proton resonance observed in the ERK2-phosphorylated sample (Fig. 3A) is absent after phosphorylation with RBE (Fig. 3B). On the basis of a 3D NMR experiment on a RBE phosphorylated  $^{15}N,^{13}C$ -labeled sample, we identified its resonance for Gly207 in the crowded region where other glycines are found, with an amide proton chemical shift identical to that found in the 3P-AT8 peptide (Fig. 3B).

Setting up a ThT aggregation assay (32) with the phosphorylated samples in the absence of any other inducer, we obtained a sizeable fluorescence signal for RBE phosphorylated Tau441-S262A protein (Fig. 4A). The ERK2-phosphorylated Tau441-S262A sample (without phosphorylated Ser208, and hence with the Ser202/Thr205 phosphorylation-induced helical turn) gave no ThT signal in the same conditions (Fig. 4A). In agreement with this result, the electron microscopy images showed plenty of fibers for the RBE phosphorylated sample (Fig. 4B and C), whereas very few fibers were detected in the phospho-ERK sample (Fig. 4D). Further morphological characterization of the resulting fibers was performed by immunohistochemistry and NMR spectroscopy. As for AD patient brain-derived fibers, our synthetic phospho-Tau fibers were stained by the AT8 antibody (Fig. 4E). The flexible nature of



**Fig. 3.** Phosphorylation of Ser208 by RBE, but not ERK2, kinase activity promotes aggregation of Tau441-S262A. (A and B) Glycine region from the  $^1H-^{15}N$  HSQC spectra of Tau441-S262A (blue), Tau441-S262A phosphorylated by ERK2 (red), and Tau441-S262A phosphorylated by RBE (green). The downfield shift for the G207 amide proton resonance observed in the ERK2-phosphorylated sample is absent after phosphorylation with RBE. (C) SDS/PAGE analysis of Tau441-S262A before and after phosphorylation by ERK2 and RBE. By comparison with the native protein (lane NP), a similar gel shift is observed for the two phosphorylated samples. The pS208 and pS356 sites phosphorylated solely by the RBE cannot be distinguished by SDS/PAGE.



**Fig. 4.** Additional phosphorylation of Ser208 by RBE promotes aggregation of Tau441-Ser262A. (A) Aggregation of Tau441-S262A (blue), Tau441-S262A phosphorylated by ERK2 (red), and Tau441-S262A phosphorylated by RBE (green) followed by ThT emission at 490 nm. An increase in ThT emission at 490 nm is observed only for the 3P-AT8 Tau441-S262A protein. Error bars correspond to three independent aggregation experiments, with new batches of proteins and different RBEs. (B–D) TEM images at the end point of the aggregation assay of Tau441-S262A phosphorylated by RBE (B and C) or by Erk (D) confirm the results obtained in the aggregation assay. Large amounts of fibrils are observed only for Tau441-S262A phosphorylated by RBE. (E) Immunogold electron microscopy of the fibers obtained with Tau441-S262A phosphorylated by RBE. AT8 indeed stains the fibers in a similar manner as AD brain-derived fibers.

the N and C termini of Tau in the resulting fibers was further confirmed by the presence of NMR signal after aggregation for residues in these regions (35, 36), whereas the rigid core was further confirmed by disappearance of the signals of the core region and notably the PHF6 peptide (*SI Appendix, Fig. S12*).

Confirmation of the inhibitory role of Ser262 phosphorylation came from the fluorescence curve of RBE phosphorylated Tau441. The phosphorylation patterns of the Tau441 and Tau441-S262A samples after incubation with RBE were almost identical, except for Ser262, which was only phosphorylated to 70% in the wt Tau441 sample (*SI Appendix, Fig. S13*). Concomitantly, we did observe a weaker ThT signal than for Tau441-S262A (*SI Appendix, Fig. S14*), roughly corresponding to the 30% fraction of Tau441 that is not phosphorylated at the Ser262 position.

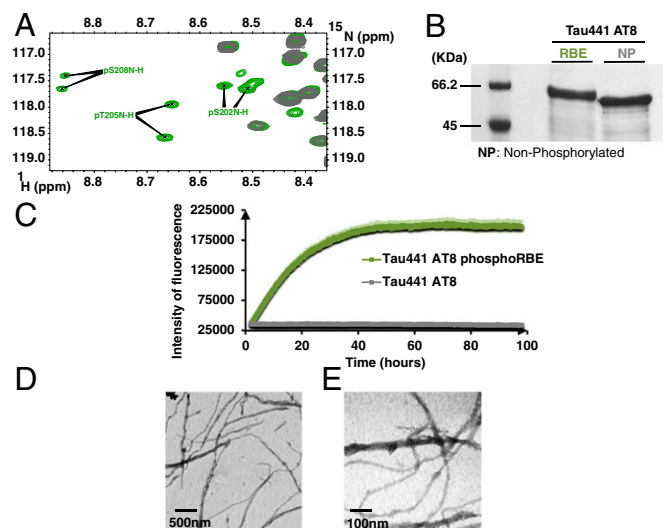
**Triple Phosphorylation at the AT8 Epitope Is Sufficient to Promote Tau Aggregation.** RBE kinases phosphorylate many residues outside the abovementioned 3P-AT8 motif (*SI Appendix, Fig. S13*). To investigate whether these additional sites also contribute to the aggregation process, we made a mutant whereby all previously identified phosphorylation sites by the RBE kinase activity except for Ser202/Thr205/Ser208 were mutated into alanine residues (*SI Appendix, Fig. S15*). Phosphorylation of this Tau441 AT8 protein by RBE leads to a simpler spectrum than for the phosphorylated Tau441-Ser262A protein, albeit with several resonances for each phospho-site because of incomplete phosphorylation (37) (Fig. 5A). Even with fewer phosphorylation sites, a gel shift on phosphorylation is still observable on SDS/PAGE (Fig. 5B). The ThT assay with the RBE phosphorylated Tau441 AT8 protein (Fig. 5C) reached similar levels as the RBE-phosphorylated Tau441-Ser262A sample (Fig. 4A), and electron microscopy again confirmed the presence of many fibers

(Fig. 5D and E). The sole 3P-AT8 motif hence is capable of driving the aggregation of Tau.

## Discussion

Phosphorylation was identified early on as a defining PTM of those Tau molecules that make up the intraneuronal tangles that characterize AD patient brains (6). In analogy with the situation of unmodified Tau, however, where in vitro production of fibrillary structures with full-length Tau proved difficult (38), obtaining AD-like fibers with phosphorylated Tau has not been an easy task. One study phosphorylated Tau with a RBE to 12–15 phosphates per Tau molecule and obtained fibers with the macroscopic aspect of those isolated from AD patient brains (16). However, no precise definition of the phosphorylation pattern generated by the RBE was determined, and attempts to repeat this experiment did not yield any appreciable amount of fibers (31, 39).

The analytical challenge of determining a precise phosphorylation pattern of Tau is significant, mostly because of its large number of potential phosphorylation sites and their clustering in regions such as the proline-rich region or the extreme C terminus. Recent progress in mass spectrometry has improved the coverage of Tau's possible PTMs (40, 41), but antibodies remain the workhorse in a clinical setting. Notably, Braak staging, whereby the cognitive decline of deceased patients is correlated with the extent of the lesions in their brain, has been standardized on the basis of immunohistochemistry with the AT8 antibody (10). The recent finding that the optimal epitope of this clinical antibody is not limited to the double phosphorylation at Ser202/Thr205 of Tau but also can include the modification of the Ser208 residue was quite unexpected (15). Whereas the former 2P-AT8 epitope is characterized by a turn-like structure (14), we show here that this structure can be disrupted either by mutating the Gly207 to Val or by phosphorylation of the Ser208 (Fig. 1). Our finding that the resulting Tau species with phosphorylation at Ser202/Thr205, but with a disrupted turn-like



**Fig. 5.** The 3P-AT8 motif alone is sufficient to drive aggregation. (A) Region of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of RBE phosphorylated Tau441-AT8. Because of incomplete phosphorylation, two resonances for each phospho-site are identified. (B) SDS/PAGE analysis of Tau441-AT8 before and after phosphorylation by RBE. Whereas a gel shift is still visible on phosphorylation, it is less pronounced in this mutant, where most phosphorylation sites have been removed. (C) Aggregation of RBE phosphorylated Tau441-AT8 as followed by ThT emission at 490 nm confirms phosphorylation of the Ser202/Thr205/Ser208 epitope is sufficient to trigger aggregation. (D and E) TEM images at the end point of the aggregation reveal a network of fibers when RBE-phosphorylated Tau-AT8 is allowed to aggregate for 4 d. Error bars correspond to two independent experiments with the same Tau441-AT8 batch, but with different RBEs.

structure, forms abundant fibers detectable by thioflavin fluorescence or electron microscopy (Figs. 2 and 4) suggests the initial turn-like structure induced by the phosphorylation of only Ser202 and Thr205 is protective against aggregation. A protective role for the phosphorylation of Tau at the Thr205 position was equally proposed for the synaptic pool of Tau, not in the aggregation process but, rather, in the attenuation of the A $\beta$  oligomer-induced toxicity (42). Importantly, here, our resulting fibers show several characteristics of the natural fibers that fill the neurons of patients with AD, such as robust AT8 staining (Fig. 4), a core region composed of the microtubule-binding repeats of Tau characterized by disappearing NMR signals, as well as a fuzzy coat around this core with residual NMR intensity (43) (*SI Appendix, Fig. S12*). Some morphological differences exist between the twisted fibrils observed with RBE-phosphorylated Tau441-S262A (Fig. 4) and the straight and less well-defined fibers obtained after aggregation of Tau441-AT8 (Fig. 5). These transmission electron microscopy (TEM) observations suggest a link between the exact phosphorylation patterns and the morphology of fibrils that might be relevant for the different tauopathies. Phosphorylation at Ser208 might be catalyzed by Casein kinase 1 (44), and its identification as a potential site for O-GlcNAcylation (45) points to the important role of this residue. The exact mechanism of the aggregation process is not clear at this moment, but is subject to intense study by the combined approach of synthetic phosphorylated peptides, *in vitro* kinase assays, and NMR spectroscopy we have used here to define the aggregation-inducing phosphorylation pattern of Tau.

Our results indicate “hyperphosphorylation” as a driving force for Tau aggregation and describe this widely used expression in terms of sites and occupancy. Indeed, Tau phosphorylation at the three positions, Ser202/Thr205/Ser208, while not at Ser262, is sufficient to induce aggregation without the addition of any exogenous aggregation inducer. The former three sites correspond to the AT8 epitope, as recently redefined on the basis of the AT8 Fab crystal structure in complex with the triply phosphorylated peptide (15), and hence suggest the antibody, clinically used to stage the disease progression (10), indeed immunostains a Tau species that can aggregate without any other factors. Whereas the quest for aggregation inhibitors has been mainly performed with heparin as an external aggregation inducer (46–49), our present description of a phosphorylation-driven Tau aggregation assay opens up new avenues and should allow retesting of the previously defined classes of molecules or the discovery of potentially more specific molecules that counteract the aggregation of phosphorylated Tau.

## Materials and Methods

**Peptide Synthesis and Purification.** Peptides were synthesized manually, using standard Fmoc-SPPS protocols, in a fritted syringe on a 0.1-mmol scale, using Rink amide resin (0.4–0.7 mmol·g<sup>-1</sup>). Coupling was carried out using the requisite Fmoc protected amino acids (10 eq.), *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU; 9.5 eq.), and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA; 20 eq.) with shaking for 1 h. Phosphorylated amino acids were double coupled (2 × 3 h), using protected phospho-amino acids (5 eq.), *N*-[(dimethylamino)-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5-*b*]pyridin-1-ylmethylene]-*N*-methylmethanaminium hexafluorophosphate *N*-oxide (HATU) (4.9 eq.), and DIPEA (15 eq.).

**Peptide Purification/Analysis.** RP-HPLC was performed using a Waters 1525 binary pump system with a Waters 2487 dual-wavelength absorbance detector and UV detection at 220 nm. Solvent A was 0.1% TFA in water, and solvent B was 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN. Analytical RP-HPLC was performed using a Higgins Analytical Proto200 C18 3  $\mu$ M column (4.6 × 100 mm), at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> with a gradient of 5–20% B in 10 min. Preparative RP-HPLC was performed using an Xbridge C18 5  $\mu$ M (19 × 50 mm) column with a flow rate of 10 mL·min<sup>-1</sup>, using the appropriate gradient. MALDI-TOF mass spectrometry analyses were performed in the ion-positive reflector mode on an ABI Voyager DE-Pro MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems), using as matrix a saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O:CF<sub>3</sub>COOH (50:50:0.1).

**Production of <sup>15</sup>N- and <sup>13</sup>C-Labeled Tau441 and TauF8 Fragment in *Escherichia coli*.** The Tau441 (residues 1–441 of human MAPT) and TauF8 fragments (residues 192–324) in their WT or mutant forms (G207Y or S262A) were produced in the *Escherichia coli* BL21 DE3 strain carrying the pET15b recombinant plasmid (Novagen). Cells were grown at 37 °C in M9 minimal medium containing 2 g/L <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose, 1 g/L <sup>15</sup>N-ammonium chloride, 0.5 g/L <sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C-Isogro (Sigma), 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, MEM vitamins mixture (Sigma), and ampicillin (100 mg/L). When the OD at 600 nm reached 0.8, the induction phase was initiated by the addition of 0.5 mM IPTG and continued for 3 h at 37 °C. Cells were harvested by centrifugation at 4,000 × *g* for 25 min, and the pellet was resuspended in 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6.2), 2.5 mM EDTA, 2 mM DTT, and 0.5% triton ×100 complemented with a protease mixture inhibitor (Complete, Roche). The lysate was obtained by homogenization of this suspension with a high-pressure homogenizer (Emulsiflex, Avestin), followed by centrifugation at 30,000 × *g* for 30 min. The soluble extract was incubated at 75 °C for 15 min. The soluble proteins were isolated by centrifugation at 30,000 × *g* for 30 min and purified by cation exchange chromatography (HiTrap SP HP 1 mL; GE Healthcare). Lyophilized proteins were kept at –20 °C until further use.

**In Vitro Phosphorylation of Tau and TauF8 Fragments by ERK2.** Next, 100  $\mu$ M <sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C Tau or TauF8 (WT or mutant forms) was mixed with 1  $\mu$ M ERK2 and about 0.1  $\mu$ M MEK R<sub>4</sub>F (MEK3), the constitutively active mutated form of MEK3. The mixture was incubated at 37 °C overnight in 400  $\mu$ L phosphorylation buffer (50 mM Hepes KOH at pH 8.0, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 12.5 mM ATP). Enzymatic reaction was stopped by heating the reaction mixture at 75 °C for 15 min, followed by centrifugation at 16,000 × *g* for 20 min. Then, the supernatant was buffer-exchanged in 50 mM ammonium bicarbonate before lyophilization. Before further analyses, a gel shift of protein band on SDS/PAGE (T = 10% for *p*-Tau441 and T = 12% for *p*-TauF8) allowed a qualitative control of protein phosphorylation. A control experiment was performed under the same conditions in which ERK2 was omitted. Each set of phosphorylation experiments was independently repeated three times with new batches of Tau proteins and kinases.

**In Vitro Phosphorylation of Tau and TauF8 Fragments by RBE.** RBE was prepared from adult rat Sprague-Dawley rats by homogenizing a brain (about 2 g) in 5 mL homogenizing buffer [10 mM Tris at pH 7.4, 5 mM EGTA, 2 mM DTT, 1  $\mu$ M okadaic acid (Sigma)] supplemented with 20  $\mu$ g/mL leupeptin and 40 mM Pefabloc (Sigma-Aldrich). Ultracentrifugation was performed at 100,000 × *g* at 4 °C for 1 h. The supernatant was directly used for its kinase activity. Total protein concentration was estimated at 11 mg/mL by BCA colorimetric assay (Pierce). The <sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C Tau and TauF8 fragments, in their WT or mutant forms, were dissolved, respectively, at 10 and 25  $\mu$ M in 2.5 mL phosphorylation buffer (40 mM Hepes at pH 7.3, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 2 mM DTT, 2 mM ATP, and 1  $\mu$ M okadaic acid) complemented with a protease inhibitor mixture (Complete, Roche). The phosphorylation reaction was performed at 37 °C for 24 h with 500  $\mu$ L brain extract. Enzymatic reaction was stopped by heating the mixture at 75 °C for 15 min and centrifugation at 16,000 × *g* for 20 min. Then, the supernatant was buffer-exchanged in 50 mM ammonium bicarbonate before lyophilization. Qualitative control of protein phosphorylation was performed by SDS/PAGE before NMR analyses and aggregation assays. Each set of phosphorylation experiment was independently repeated three times with new batches of Tau proteins and fresh RBE.

**NMR Spectroscopy.** NMR of peptides was performed on 800- or 900-MHz Bruker spectrometers equipped with a triple resonance cryogenic probe head. Homonuclear nuclear Overhauser (NOESY) and total correlation (TOCSY) spectra were acquired at 293 K with standard pulse programs on 2-mM peptide samples in a phosphate buffer (50 mM phosphate buffer at pH 6.4, 25 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, and 5% D<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra were acquired at natural abundance, with 128 scans per increment and 2,048 × 256 complex points in the direct and indirect dimensions, respectively. For protein NMR experiments, Tau proteins were dissolved at a concentration of 200–300  $\mu$ M in NMR sample buffer (50 mM phosphate buffer at pH 6.4, 25 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 mM DTT, and 10% D<sub>2</sub>O). To estimate phosphorylation levels at each site, the ratio of the peak integral corresponding to phosphorylated forms over the sum of peak integrals corresponding to nonphosphorylated and phosphorylated forms were calculated.

**In Vitro Aggregation Assay and TEM.** Tau aggregation assays were performed at 10  $\mu$ M Tau441 WT or S262A phosphorylated by RBE in aggregation buffer (100 mM Mes buffer at pH 6.9, 2 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.33 mM DTT, and 50  $\mu$ M ThT). Lyophilized proteins were resuspended in the aggregation

buffer at the desired concentration, and 50,  $\mu$ M ThT was added. Aggregation kinetics were followed by ThT emission at 490 nm, using a plate reader (PHERAStar, BMG Labtech). In parallel, aggregation experiments were performed under the same conditions in 1.5-mL tubes. Mixtures were incubated for 5 d at 37 °C without agitation. At the end of incubation, 10  $\mu$ L samples from 1.5-mL tubes and plates were withdrawn and applied on 400-mesh hexagonal formvar-coated grids for 90 s. The sample-loaded grids were washed three times with ultrapure water and drained. The grids were next negatively stained with 2% uranyl-acetate solution for 90 s and washed two times with ultrapure water. TEM was performed with a HITACHI H7500 microscope at 80 kV.

**Immunogold TEM.** For immunogold labeling of the fibrils, 10  $\mu$ L of the aggregation sample was adsorbed on carbon-coated EM grids (Electron Microscopy Science) for 20 min. Excess fibrils were removed by placing the EM grids three times on drops of fresh PBS buffer without drying. After blocking in 1% (wt/vol) BSA in PBS for 60 min, grids were incubated with primary anti-Tau antibody (Human PHF-TAU clone AT8) diluted 1:100 in 1% BSA for 1 h. After further washing the grids five times in PBS, they were incubated with the gold-labeled secondary antibody [6 nm-Glod donkey IGG anti-mouseIgG]

diluted 1:20 in 1% BSA for 60 min, followed by five washes in PBS. Before staining, the sample was washed 10 times in water to avoid precipitation of uranyl-acetate in PBS. The sample was negatively stained by incubation in 2% (wt/vol) uranyl-acetate in water for 8 min, followed by four washing/drying steps in water. TEM was performed with a HITACHI H7500 microscope at 80 kV.

**ACKNOWLEDGMENTS.** The NMR facilities were funded by the Région Hauts-de-France, CNRS, Pasteur Institute of Lille, European Community [Fonds européen de développement régional (FEDER)], French Research Ministry, and the University of Lille. We acknowledge support from the TGE RMN THC (Très Grands Equipements Résonance Magnétique Nucléaire Très Hauts Champs, FR-3050, France), FRABio (Fédération de Recherche "Biochimie Structurale & Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires," FR 3688, France), and from MetaToul (Toulouse metabolomics & fluxomics facilities, [www.metatoul.fr](http://www.metatoul.fr)), which is part of the French National Infrastructure for Metabolomics and Fluxomics MetaboHUB-AR-11-INBS-0010 ([www.metabohub.fr](http://www.metabohub.fr)). Our research is supported by grants from the LabEx (Laboratory of Excellence) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease).

- Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314: 777–781.
- Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885–890.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4044–4048.
- Grundke-Iqbal I, et al. (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084–6089.
- Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4040–4043.
- Grundke-Iqbal I, et al. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4913–4917.
- Lindwall G, Cole RD (1984) The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of tau in brain. *J Biol Chem* 259:12241–12245.
- Baudier J, Cole RD (1987) Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *J Biol Chem* 262:17577–17583.
- Godemann R, Biernat J, Mandelkow E, Mandelkow EM (1999) Phosphorylation of tau protein by recombinant GSK-3 $\beta$ : Pronounced phosphorylation at select Ser/Thr-Pro motifs but no phosphorylation at Ser262 in the repeat domain. *FEBS Lett* 454: 157–164.
- Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K (2006) Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* 112:389–404.
- Biernat J, et al. (1992) The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J* 11:1593–1597.
- Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E (1995) Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* 189:167–169.
- Porzig R, Singer D, Hoffmann R (2007) Epitope mapping of mAbs AT8 and Tau5 directed against hyperphosphorylated regions of the human tau protein. *Biochem Biophys Res Commun* 358:644–649.
- Gandhi NS, et al. (2015) A phosphorylation-induced turn defines the Alzheimer's disease AT8 antibody epitope on the tau protein. *Angew Chem Int Ed Engl* 54:6819–6823.
- Malia TJ, et al. (2016) Epitope mapping and structural basis for the recognition of phosphorylated tau by the anti-tau antibody AT8. *Proteins* 84:427–434.
- Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6923–6928.
- Wischik CM, Edwards PC, Lai RY, Roth M, Harrington CR (1996) Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11213–11218.
- Wischik CM, Harrington CR, Storey JMD (2014) Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 88:529–539.
- Goedert M, et al. (1996) Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383:550–553.
- Pérez M, Valpuesta JM, Medina M, Montejó de Garcini E, Avila J (1996) Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: The minimal sequence required for tau-tau interaction. *J Neurochem* 67:1183–1190.
- Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197:192–193.
- Morozova OA, March ZM, Robinson AS, Colby DW (2013) Conformational features of tau fibrils from Alzheimer's disease brain are faithfully propagated by unmodified recombinant protein. *Biochemistry* 52:6960–6967.
- Meyer V, Dinkel PD, Rickman Hager E, Margittai M (2014) Amplification of Tau fibrils from minute quantities of seeds. *Biochemistry* 53:5804–5809.
- Clavaguera F, et al. (2013) Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:9535–9540.
- Falcon B, et al. (2015) Conformation determines the seeding potencies of native and recombinant Tau aggregates. *J Biol Chem* 290:1049–1065.
- Guo JL, et al. (2016) Unique pathological tau conformers from Alzheimer's brains transmit tau pathology in nontransgenic mice. *J Exp Med* 213:2635–2654.
- Schneider A, Biernat J, von Bergen M, Mandelkow E, Mandelkow EM (1999) Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 38: 3549–3558.
- Bah A, et al. (2015) Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature* 519:106–109.
- Fauquant C, et al. (2011) Systematic identification of tubulin-interacting fragments of the microtubule-associated protein Tau leads to a highly efficient promoter of microtubule assembly. *J Biol Chem* 286:33358–33368.
- Gigant B, et al. (2014) Mechanism of Tau-promoted microtubule assembly as probed by NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 136:12615–12623.
- Qi H, et al. (2016) Characterization of neuronal Tau protein as a target of extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* 291:7742–7753.
- Friedhoff P, Schneider A, Mandelkow EM, Mandelkow E (1998) Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry* 37:10223–10230.
- Abraha A, et al. (2000) C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci* 113:3737–3745.
- Gamblin TC, Berry RW, Binder LI (2003) Tau polymerization: Role of the amino terminus. *Biochemistry* 42:2252–2257.
- Sillen A, et al. (2005) Regions of tau implicated in the paired helical fragment core as defined by NMR. *ChemBioChem* 6:1849–1856.
- Sillen A, et al. (2005) High-resolution magic angle spinning NMR of the neuronal tau protein integrated in Alzheimer's-like paired helical fragments. *J Am Chem Soc* 127: 10138–10139.
- Theillet F-X, et al. (2012) Cell signaling, post-translational protein modifications and NMR spectroscopy. *J Biomol NMR* 54:217–236.
- Wille H, Dreyes G, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1992) Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *J Cell Biol* 118:573–584.
- Tepper K, et al. (2014) Oligomer formation of tau protein hyperphosphorylated in cells. *J Biol Chem* 289:34389–34407.
- Morris M, et al. (2015) Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 18:1183–1189.
- Mair W, et al. (2016) FLEXITau: Quantifying post-translational modifications of Tau protein in vitro and in human disease. *Anal Chem* 88:3704–3714.
- Iltner A, et al. (2016) Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid- $\beta$  toxicity in Alzheimer's mice. *Science* 354:904–908.
- Crowther T, Goedert M, Wischik CM (1989) The repeat region of microtubule-associated protein tau forms part of the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. *Ann Med* 21:127–132.
- Hanger DP, Anderton BH, Noble W (2009) Tau phosphorylation: The therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 15:112–119.
- Smet-Nocca C, et al. (2011) Identification of O-GlcNAc sites within peptides of the Tau protein and their impact on phosphorylation. *Mol Biosyst* 7:1420–1429.
- Taniguchi S, et al. (2005) Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J Biol Chem* 280:7614–7623.
- Bulic B, et al. (2009) Development of tau aggregation inhibitors for Alzheimer's disease. *Angew Chem Int Ed Engl* 48:1740–1752.
- Brunden KR, et al. (2010) Tau-directed drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies: A focus on tau assembly inhibitors. *Exp Neurol* 223:304–310.
- Daccache A, et al. (2011) Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochem Int* 58:700–707.

# Supplementary Materials for

Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation.

Clément Despres, Cillian Byrne, Haoling Qi, François-Xavier Cantrelle, Isabelle Huvent,  
Béatrice Chambraud, Etienne-Emile Baulieu\*, Yves Jacquot, Isabelle Landrieu, Guy  
Lippens,\* Caroline Smet-Nocca\*

correspondence to: [glippens@insa-toulouse.fr](mailto:glippens@insa-toulouse.fr); [etienne.baulieu@inserm.fr](mailto:etienne.baulieu@inserm.fr);  
[caroline.smet@univ-lille1.fr](mailto:caroline.smet@univ-lille1.fr)

## **This PDF file includes:**

Materials and Methods  
Figs. S1 to S14

## Material and Methods

### Peptide synthesis and purification

Peptides were synthesized manually using standard Fmoc-SPPS protocols, in a fritted syringe on a 0.1 mmol scale, using Rink amide resin ( $0.4 - 0.7 \text{ mmol.g}^{-1}$ ). Coupling was carried out using the requisite Fmoc protected amino-acids (10 eq.), O-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU; 9.5 eq.), and *N,N*-Diisopropylethylamine (DIPEA; 20 eq.) with shaking for 1 h. Phosphorylated amino acids were double coupled (2 x 3 h) using protected phospho-amino acids (5 eq.), *N*-[[Dimethylamino]-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5-*b*]pyridin-1-ylmethylene]-*N*-methanaminium hexafluorophosphate *N*-oxide (HATU; 4.9 eq.) and DIPEA (15 eq.). After coupling, the resin was washed five times with NMP. Fmoc deprotection was carried out using 20 % piperidine in NMP (1 x 1 min, followed by 1 x 10 min.). After deprotection, the peptides were washed five times with NMP. Acetylation of the completed peptides was achieved using DIPEA (2 eq.) and (Ac)<sub>2</sub>O (15 eq.) in NMP. The completed peptides were washed successively in NMP (x 3), DCM (x3) and MeOH (x3), and then dried *in vacuo*. Concomitant cleavage from the resin and peptide deprotection was carried out using the cocktail TFA – *i*Pr<sub>3</sub>SiH (TIPS) – H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5), approximately 10 mL.g<sup>-1</sup> of peptide resin, for 2 h. The suspension was filtered, the filtrate was evaporated to dryness *in vacuo*, and the residual material was triturated with ice-cold ether, centrifuged and the supernatant discarded (x 3), to furnish a white solid. The crude peptide products were dissolved in Milli-Q water and lyophilized before analysis and purification by Preparative RP-HPLC.

#### *Peptide Purification/Analysis:*

RP-HPLC was performed using a Waters 1525 binary pump system with a Waters 2487 dual wavelength absorbance detector and UV detection at 220 nm. Solvent A: 0.1% TFA in water and solvent B: 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN. Analytical RP-HPLC was performed using a Higgins Analytical Proto200 C18 3 μM column (4.6 x 100 mm), at a flow rate of 1.0 mL.min<sup>-1</sup> with a gradient of 5 – 20% B in 10 min. Preparative RP-HPLC was performed using an Xbridge C18 5 μM (19 x 50 mm) column with a flow rate of 10 mL min<sup>-1</sup> using the appropriate gradient. MALDI-TOF mass spectrometry analyses were performed in the ion positive reflector mode on an ABI Voyager DE-Pro MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems) using as matrix a saturated solution of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O:CF<sub>3</sub>COOH (50:50:0.1).



The synthesis of peptides **0P-AT8** and **2P-AT8** has been described previously.<sup>1</sup>

Ac-GDRSGYSSPGSPGTPGSRRT-NH<sub>2</sub>.(3TFA) **Peptide 0P-AT8**

Ac-GDRSGYSSPG(pS)PG(pT)PGSRRT-NH<sub>2</sub>.(3TFA) **Peptide 2P-AT8**

Ac-GDRSGYSSPGSPGTPVSRRT-NH<sub>2</sub>.(3TFA) **Peptide 0P-AT8-G207V**

Preparative HPLC (Xbridge C<sub>18</sub> 9-15%B over 10 min) RT = 7.32 min. Analytical HPLC (PROTO200 C<sub>18</sub> 5-20% B over 10 min) RT = 9.69 min. MALDI-TOF [M+H]<sup>+</sup> *m/z* : 2149.1996 (calc. 2149.0386).

Ac-GDRSGYSSPG(pS)PG(pT)PVSRRT-NH<sub>2</sub>.(3TFA) **Peptide 2P-AT8-G207V**

Preparative HPLC (Xbridge C<sub>18</sub> 7-17%B over 10 min) RT = 7.20 min. Analytical HPLC (PROTO200 C<sub>18</sub> 5-20% B over 10 min) RT = 8.32 min. MALDI-TOF [M+H]<sup>+</sup> *m/z* : 2309.1191 (calc. 2308.97).

Ac-GDRSGYSSPG(pS)PG(pT)PG(pS)RSRT-NH<sub>2</sub>.(3TFA) **Peptide 3P-AT8**

Preparative HPLC (Xbridge C<sub>18</sub> 5-20%B over 10 min) RT = 5.43 min. Analytical HPLC (PROTO200 C<sub>18</sub> 5-20% B over 10 min) RT = 6.95 min. MALDI-TOF [M+H]<sup>+</sup> *m/z* : 2346.45 (calc. 2346.89).

### **Production of <sup>15</sup>N- and <sup>13</sup>C-labeled Tau441 and TauF8 fragment in *Escherichia Coli***

The Tau441 (residues 1-441 of human MAPT) and TauF8 fragments (residues 192-324) in their wild-type or mutant forms (G207V or S262A) were produced in the *E. coli* BL21 DE3 strain carrying in the pET15b recombinant plasmid (Novagen). Cells were grown at 37°C in M9 minimal medium containing 2g/l <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose, 1g/l <sup>15</sup>N-ammonium chloride, 0,5 g/l <sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C-Isogro® (Sigma), 1mM MgSO<sub>4</sub>, 100µM CaCl<sub>2</sub>, MEM vitamins cocktail (Sigma) and ampicillin (100mg/l). When the OD at 600nm reached 0.8, the induction phase was initiated by addition of 0.5mM IPTG and continued for 3h at 37°C. Cells were harvested by centrifugation at 4000×g for 25 min and the pellet was resuspended in 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6.2), 2.5mM EDTA, 2mM DTT and 0.5% triton X100 complemented with a protease cocktail inhibitor (Complete™, Roche). The lysate was obtained by homogenization of this suspension with a high-pressure homogenizer (Emulsiflex, Avestin) followed by centrifugation at 30,000×g for 30 min. The soluble extract was incubated at 75°C for 15 min. The soluble proteins were isolated by centrifugation at 30,000×g for 30 min and purified by cation exchange chromatography (HiTrap SP HP 1ml, GE Healthcare). Then, fractions were checked by SDS-PAGE (T=12% for full length Tau and 15% for TauF8) and pooled for buffer-exchange in

50mM ammonium bicarbonate prior to lyophilization. Lyophilized proteins were kept at -20°C until further use.

### ***In vitro* phosphorylation of Tau and TauF8 fragments by ERK2**

100µM of <sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C Tau or TauF8 (wild type or mutant forms) was mixed with 1µM of ERK2 and about 0.1µM of MEK R<sub>4</sub>F (MEK3), the constitutively active mutated form of MEK3. The mixture was incubated at 37°C overnight in 400µl of phosphorylation buffer (50mM Hepes.KOH pH8.0, 12.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM NaCl, 2mM EDTA, 1mM DTT, 1mM EGTA, 12.5mM ATP). Enzymatic reaction was stopped by heating the reaction mixture at 75°C for 15 min followed by centrifugation 16,000×g for 20 min. Then, the supernatant was buffer-exchanged in 50mM ammonium bicarbonate prior to lyophilization. Prior to further analyses, a gel shift of protein band on SDS-PAGE (T=10% for *p*-Tau441 and T=12% for *p*-TauF8) allowed a qualitative control of protein phosphorylation. A control experiment was performed under the same conditions in which ERK2 was omitted. The absence of phosphorylation detected by NMR indicates that MEK R<sub>4</sub>F does not directly phosphorylate Tau. Each set of phosphorylation experiment was independently repeated three times with new batches of Tau proteins and kinases.

### ***In vitro* phosphorylation of Tau and TauF8 fragments by rat brain extract (RBE)**

The rat brain extract (RBE) was prepared from adult rat Sprague-Dawley by homogenizing a brain (about 2g) in 5ml of homogenizing buffer (10mM Tris pH7.4, 5mM EGTA, 2mM DTT, 1µM okadaic acid (Sigma)) supplemented with 20µg/ml Leupeptin and 40mM Pefabloc. Ultracentrifugation was performed at 100,000×g at 4°C for 1hr. The supernatant was directly used for its kinase activity. Total protein concentration was estimated at 11mg/ml by BCA colorimetric assay (Pierce). The <sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C Tau and TauF8 fragments, in their wild type or mutants forms, were dissolved respectively at 10 and 25µM in 2.5ml of phosphorylation buffer (40mM Hepes pH7.3, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EGTA, 2mM DTT, 2mM ATP and 1 µM okadaic acid) complemented with a protease inhibitor cocktail (Complete<sup>TM</sup>, Roche). The phosphorylation reaction was performed at 37°C for 24hr with 500µl of brain extract. Enzymatic reaction was stopped by heating the mixture at 75°C for 15 min and centrifugation at 16,000×g for 20 min. Then, the supernatant was buffer-exchanged in 50mM ammonium bicarbonate prior to lyophilization. Qualitative control of protein phosphorylation was performed by SDS-PAGE prior to NMR analyses and aggregation assays. Each set of phosphorylation experiment was independently repeated three times with new batches of Tau proteins and fresh rat brain extract.

### **NMR spectroscopy**

NMR of peptides was performed on 800 or 900MHz Bruker spectrometers equipped with a triple resonance cryogenic probe head. Homonuclear Nuclear Overhauser (NOESY) and Total Correlation (TOCSY) spectra were acquired at 293K with standard pulse programs on 2mM peptide samples in a phosphate buffer (50mM phosphate buffer pH 6.4, 25mM NaCl, 2,5mM

EDTA, and 5% D<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N Heteronuclear Single Quantum (HSQC) spectra were acquired at natural abundance, with 128scans per increment and 2048x256 complex points in the t<sub>2</sub> and t<sub>1</sub> directions, respectively. Peptide NMR spectra were processed in Topspin3.0, and manually assigned.

For protein NMR experiments, 5mm closed SHIGEMI tubes were used. All spectra were acquired at 293K on a Bruker 900MHz spectrometer equipped with a triple resonance cryogenic probehead. Tau proteins were dissolved at a concentration of 200-300μM in NMR sample buffer (50mM phosphate buffer pH 6.4, 25mM NaCl, 2.5mM EDTA, 1mM DTT and 10% D<sub>2</sub>O). The proton frequency was calibrated with 1mM TMSP as a reference. <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC were recorded on <sup>15</sup>N- and <sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C-labeled samples with 64 scans per increment, and 3072 and 512 points in proton and nitrogen dimensions, respectively (experiment time 11.25hr).

For TauF8 and *p*-TauF8 wild-type assignment, <sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C-labeled proteins were used and 3D experiments HN(CO)CACB and HNCACB experiments were performed with 16 scans per increment. Spectral widths were 16.0, 23.0 and 61.0 ppm in <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C dimensions, respectively, with 2048, 64 and 120 sample points.

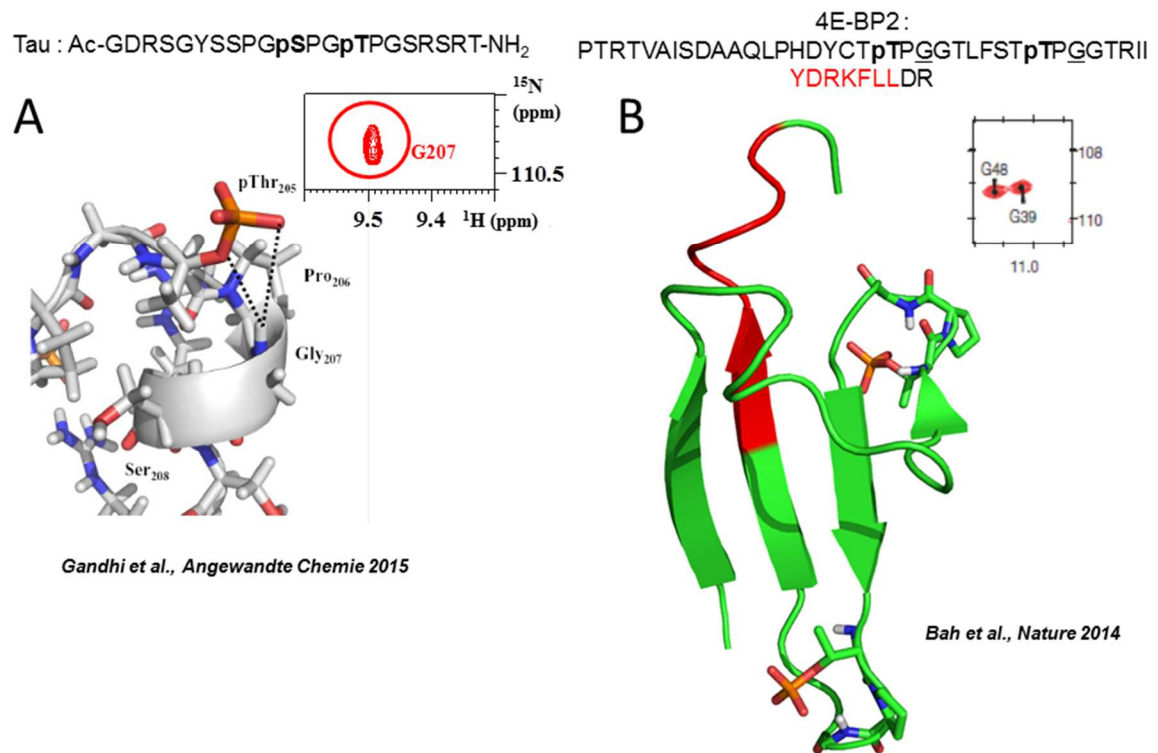
Spectra were processed with Bruker Topspin 3.5pl2 software. Data analysis, peak picking and calculation of peak volumes were done with the computer program NMRFAM-SPARKY (<https://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky>). To estimate phosphorylation levels at each site, the ratio of the peak integral corresponding to phosphorylated forms over the sum of peak integrals corresponding to non-phosphorylated and phosphorylated forms were calculated.

### ***In vitro* aggregation assay and transmission electron microscopy (TEM)**

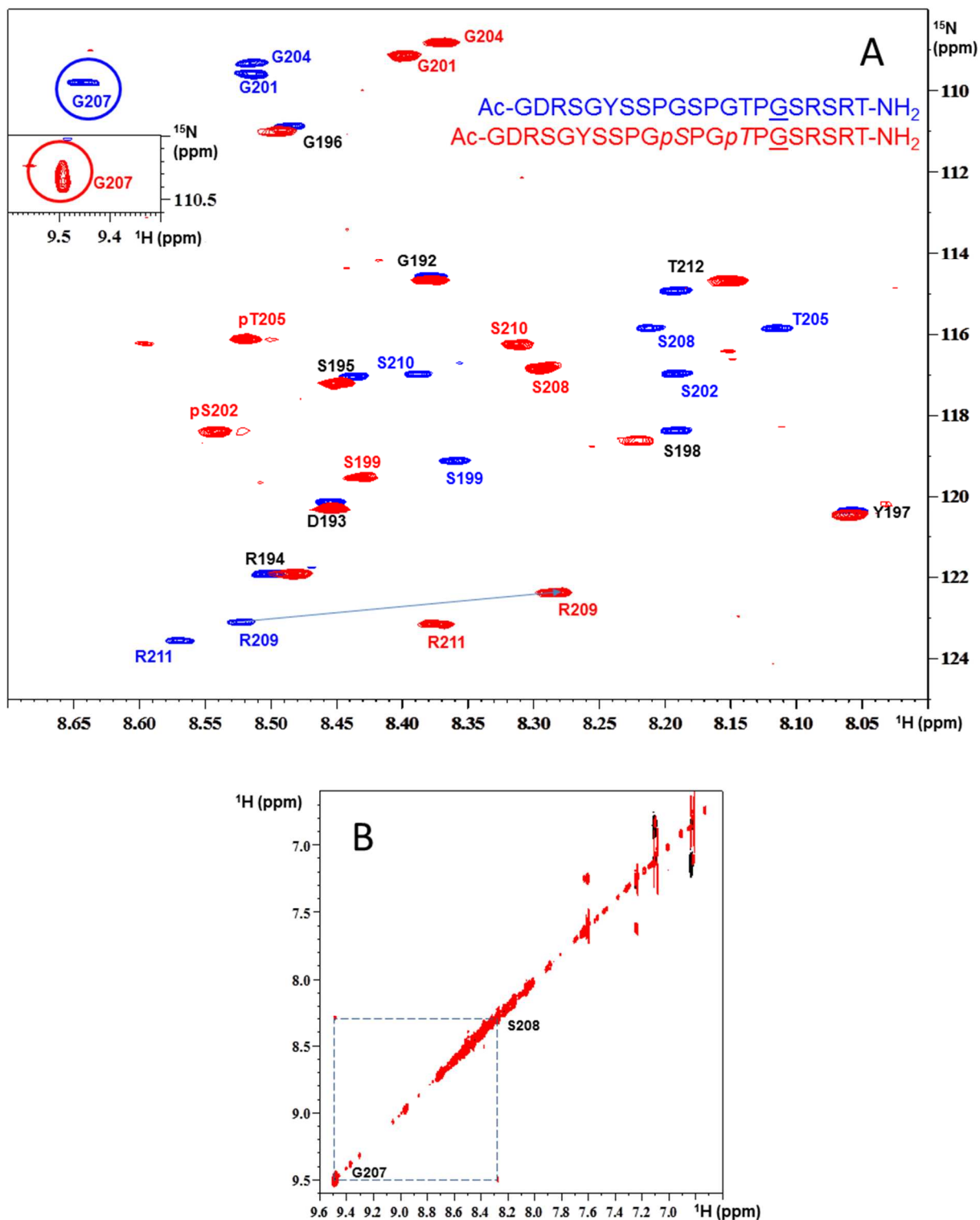
Tau aggregation assays were performed at 10μM of Tau441 wild-type or S262A phosphorylated by rat brain extract in aggregation buffer (100mM MES buffer pH6.9, 2mM EGTA, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.33mM DTT and 50μM Thioflavin T). Lyophilized proteins were resuspended in the aggregation buffer at the desired concentration and 50μM ThT was added. Aggregation kinetics were followed by ThT emission at 490nm using a plate reader (PHERAStar, BMG Labtech). In parallel, aggregation experiments were performed under the same conditions in 1.5ml tubes. Mixtures were incubated for 5 days at 37°C without agitation. At the end of incubation, 10μl samples from 1.5ml tubes and plates were withdrawn and applied on 400-mesh hexagonal formvar-coated grids for 90 sec. The sample-loaded grids were washed three times with ultrapure water and drained. The grids were next negatively stained with 2% uranyl-acetate solution for 90 sec and washed two times with ultrapure water. Transmission electron microscopy was performed with a HITACHI H7500 microscope at 80kV.

**Immunogold TEM.** For immunogold labeling of the fibrils, 10 μL of the aggregation sample was adsorbed on carbon-coated EM grids (Electron Microscopy Science) for 20 min. Excess fibrils were removed by placing the EM grids three times on drops of fresh PBS buffer without drying. After blocking in 1% (wt/vol) BSA in PBS for 60 min, grids were incubated with primary anti-Tau antibody (Human PHF-TAU clone AT8 or anti-Tau (4-repeat isoform RD4), clone 1E1/A6) diluted 1:100 in 1% BSA for 1 h. After further washing the grids five times in PBS, they were incubated with the gold-labeled secondary antibody (6nm-Glod donkey IGG

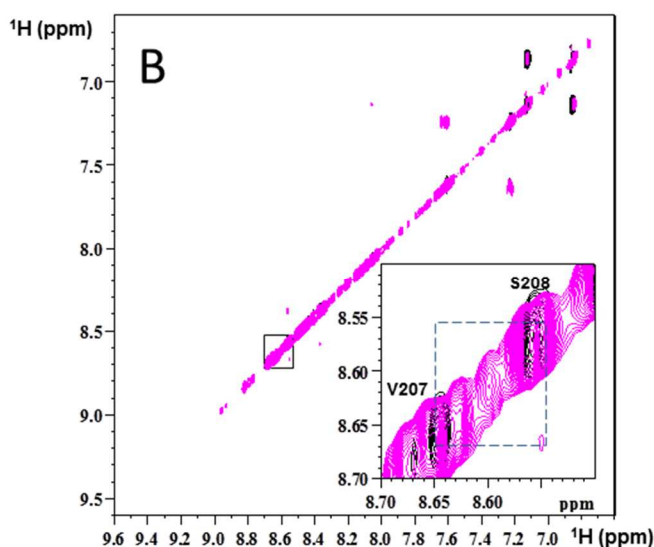
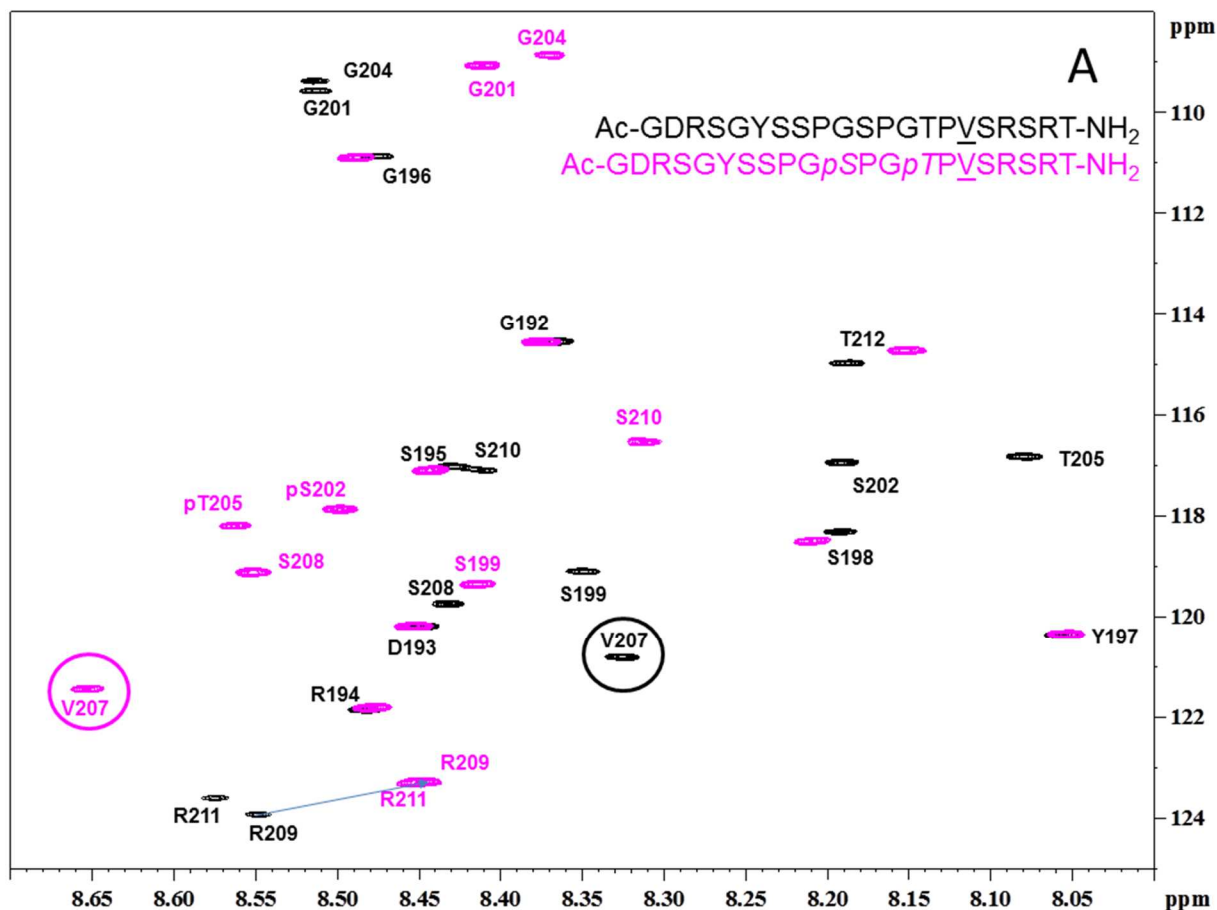
anti-mouse IGG (H+L)) diluted 1:20 in 1% BSA for 60 min, followed by five washes in PBS. Before staining, the sample was washed 10 times in water to avoid precipitation of uranyl-acetate in PBS. The sample was negatively stained by incubation in 2% (wt/ vol) uranyl-acetate in water for 8 min, followed by 4 washing/drying steps in water. Transmission electron microscopy was performed with a HITACHI H7500 microscope at 80kV.



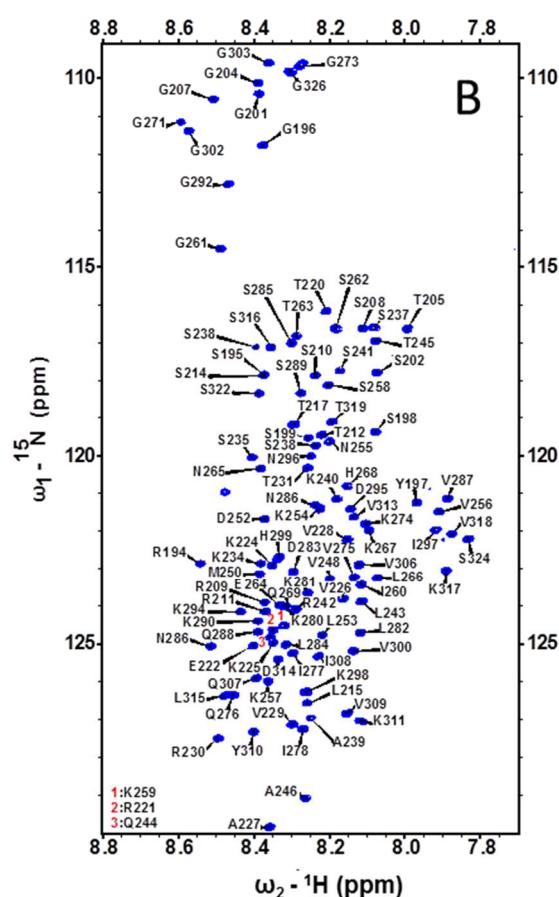
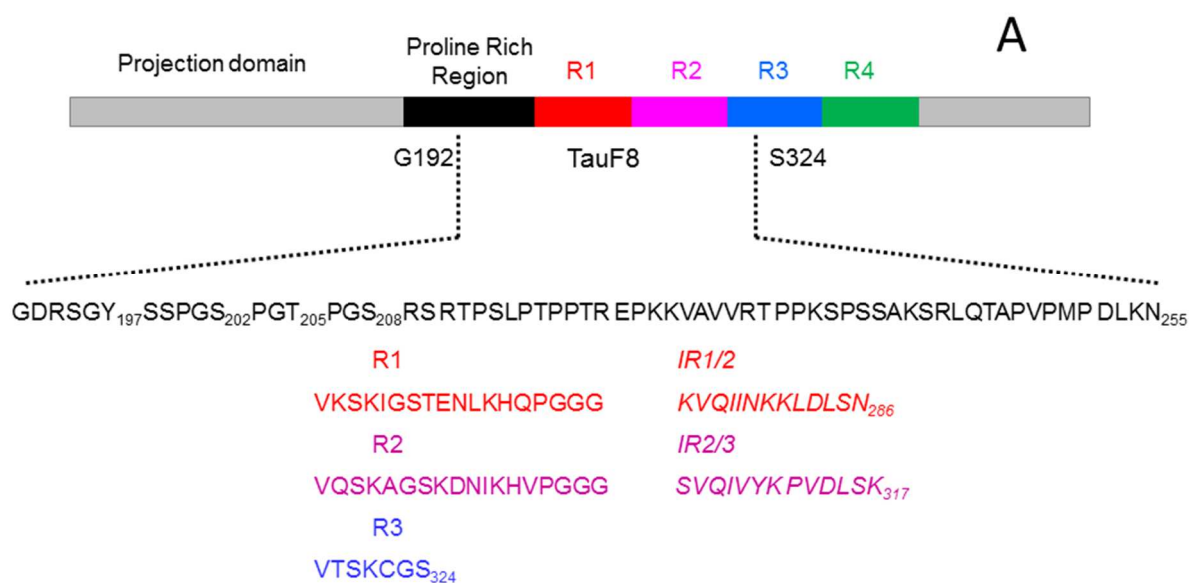
**Figure S1 :** (A) The helical turn induced by the phosphorylation of Ser202 and Thr205 in the 2P-AT8 peptide is populated half of the time, and leads to a chemical shift of 9.5ppm for the amide proton of Gly207 (1). (B) In contrast, the phosphorylation-induced TPG turns in 4E-BP2 (at pT37/pT46) lead to a stable folding of the latter into a four-stranded  $\beta$ -sheet with concomitant amide proton chemical shift values of 11ppm for Gly39 and Gly48 (2). The  $\beta$ -sheet hides the eIF4E interacting peptide (in red) in a first example of anti-structural biology (3).



**Figure S2 :** (A)  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of the non-phosphorylated (OP-AT8; blue) and doubly phosphorylated (2P-AT8; red) peptides of Tau. Phosphorylation of Ser202 and Thr205 in the latter causes a 0.9ppm chemical shift for the amide proton of Gly207, and substantial shifts for the amide protons of Arg209 and Arg211. (B) Zoom of the amide proton region of the NOESY spectrum of the 2P-AT8 peptide, showing the  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\text{N}$  cross peak between the amide protons of Gly207 and Ser208, indicative of the turn conformation (*I*).

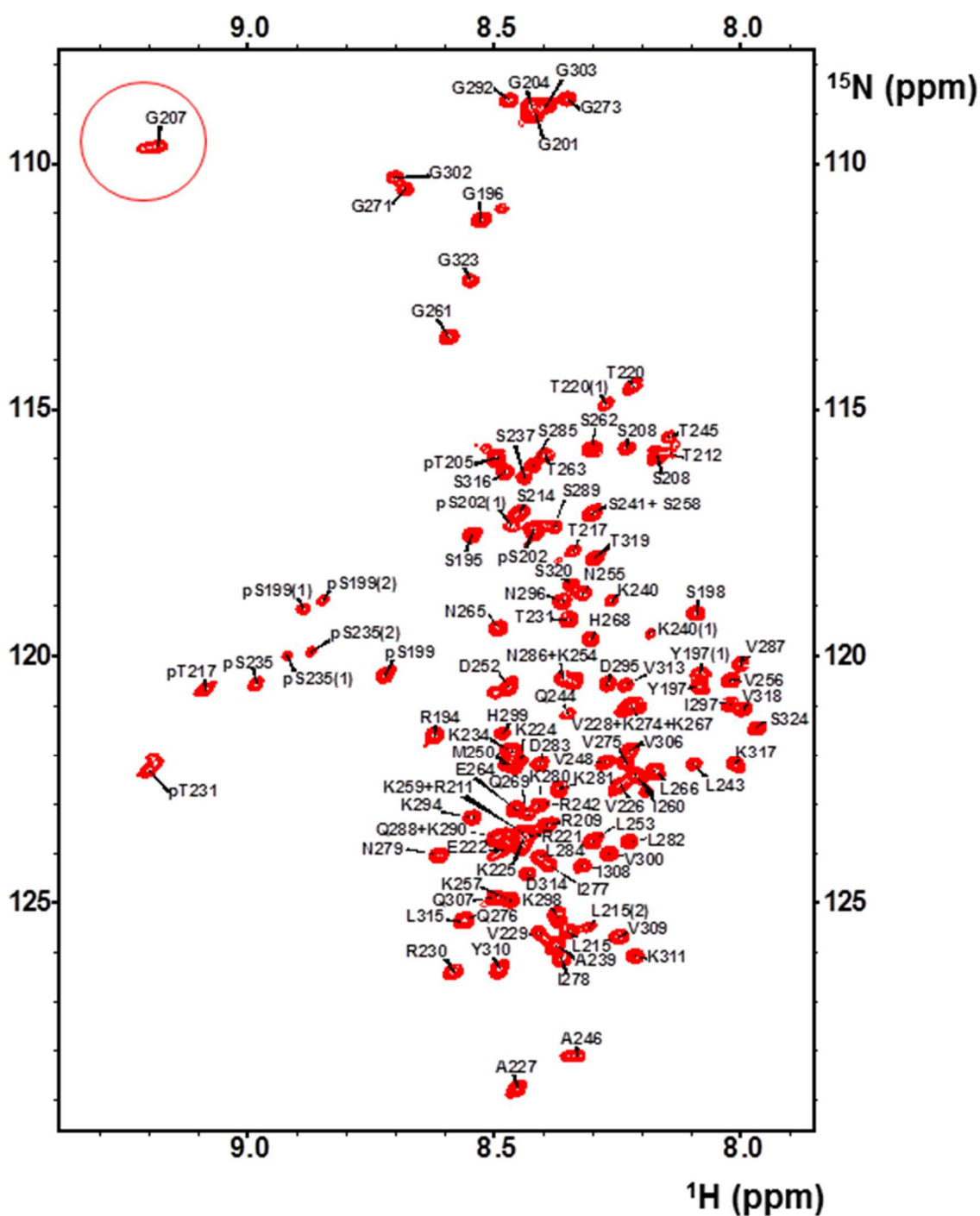


**Figure S3 :** (A)  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of the non-phosphorylated (OP-AT8-G207V; black) and doubly phosphorylated (2P-AT8-G207V; magenta) peptides of Tau carrying the Gly207Val substitution. Phosphorylation of Ser202 and Thr205 in the latter has more limited consequences than for the 2P-AT8 peptide, with a mere 0.3ppm chemical shift for the amide proton of Val207, and reduced shifts for the amide protons of Arg209 and Arg211. (B) Zoom of the amide proton region of the NOESY spectrum of the 2P-AT8-G207V peptide, showing the absence of a  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\text{N}$  cross peak between the amide protons of Val207 and Ser208. As in 4E-BP2 (2), the Gly-to-Val substitution hinders the helical turn conformation.

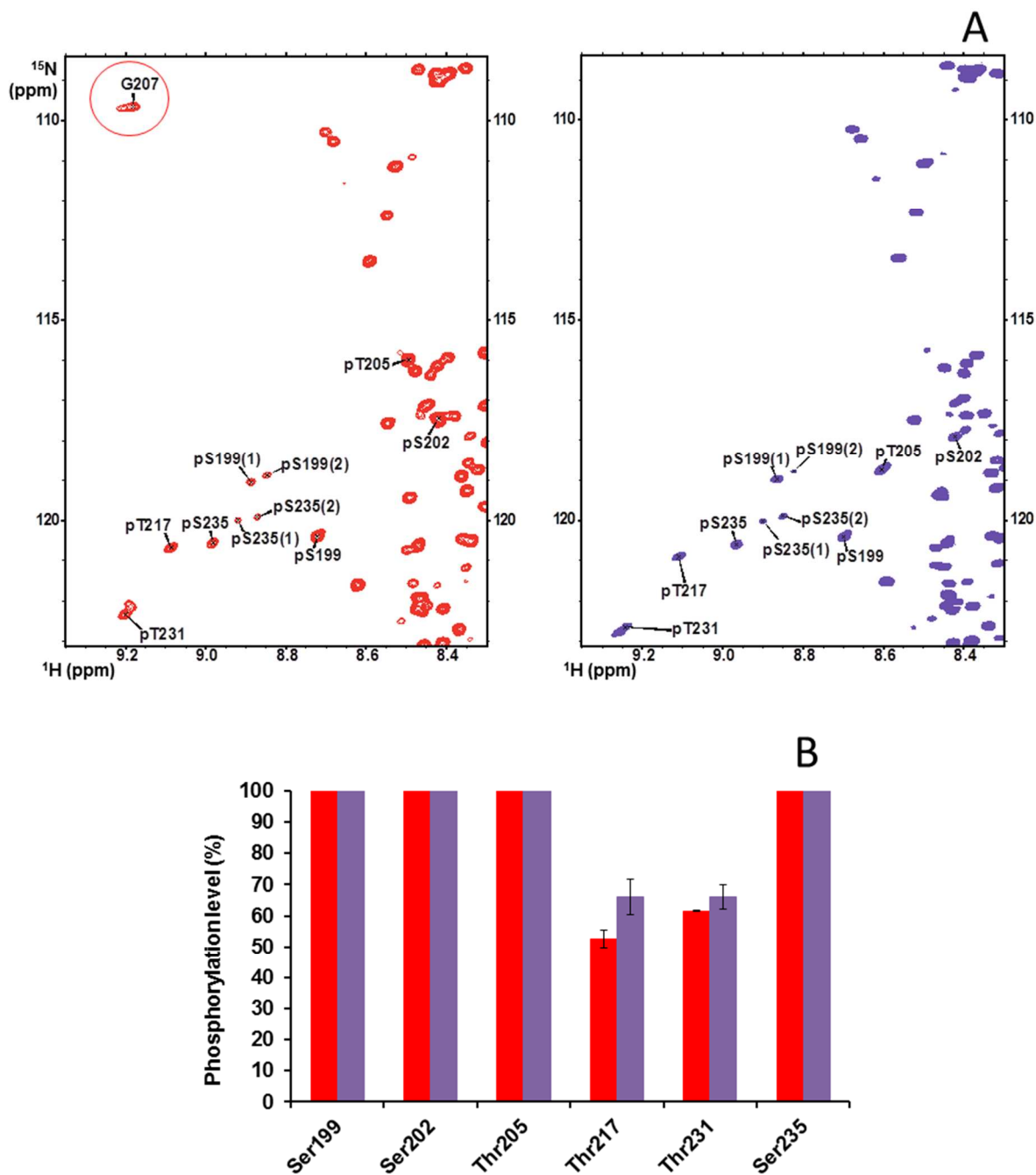


**Figure S4 :** (A) Primary sequence of TauF8, spanning the sequence of Gly192 to Ser324 of the longest Tau441 isoform. TauF8 carries the C291A mutation, leaving a single cysteine residue at position 322. (B) Assigned  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC spectra of TauF8.

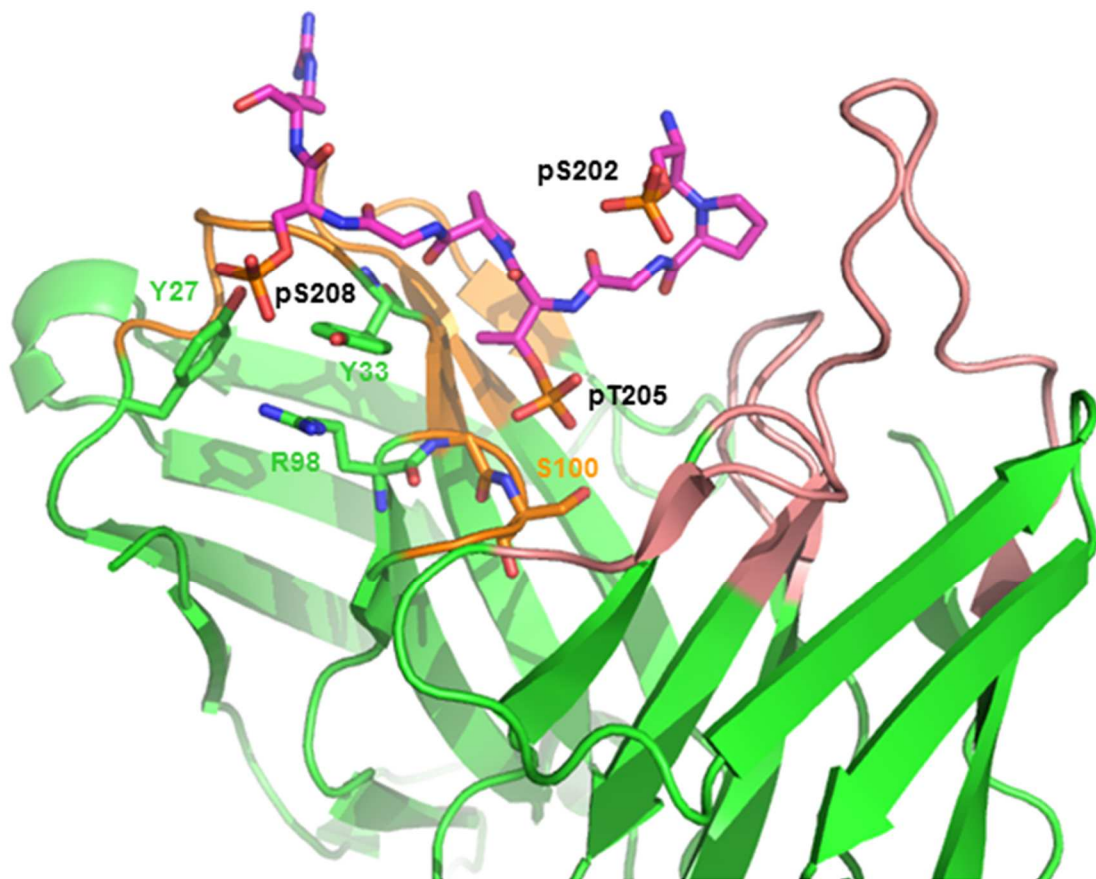




**Figure S5 :**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of TauF8 phosphorylated by ERK2. Assignment of the ERK2-phosphorylated TauF8-C291A fragment was performed by using classical 3D NMR experiments, HNCACB and HN(CO)CACB, on  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -labeled sample at 900MHz. Six phosphorylated Thr/Ser-Pro motifs (pS199, pS202, pThr205, pThr217, pThr231, pSer235) are identified in the region from 8.7 to 9.3ppm ( $^1\text{H}$ ) which is empty in the spectrum of the non-phosphorylated fragment. Downfield shift of the Gly207 amide proton indicates that phosphorylation by ERK2 induces the turn-like structure of the AT8 epitope (I).



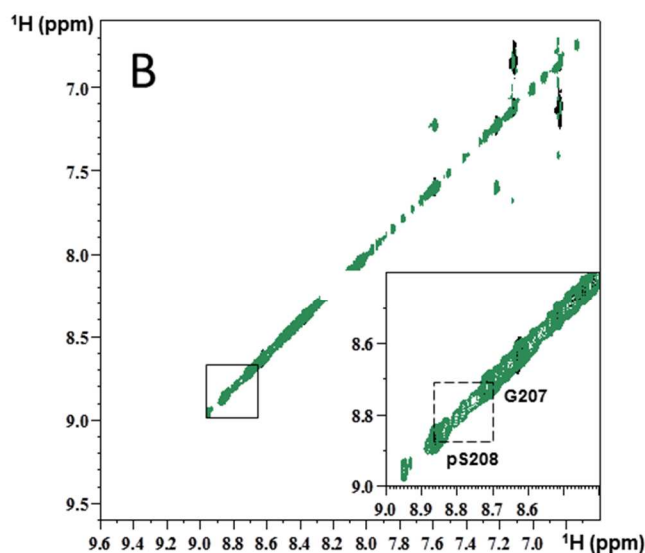
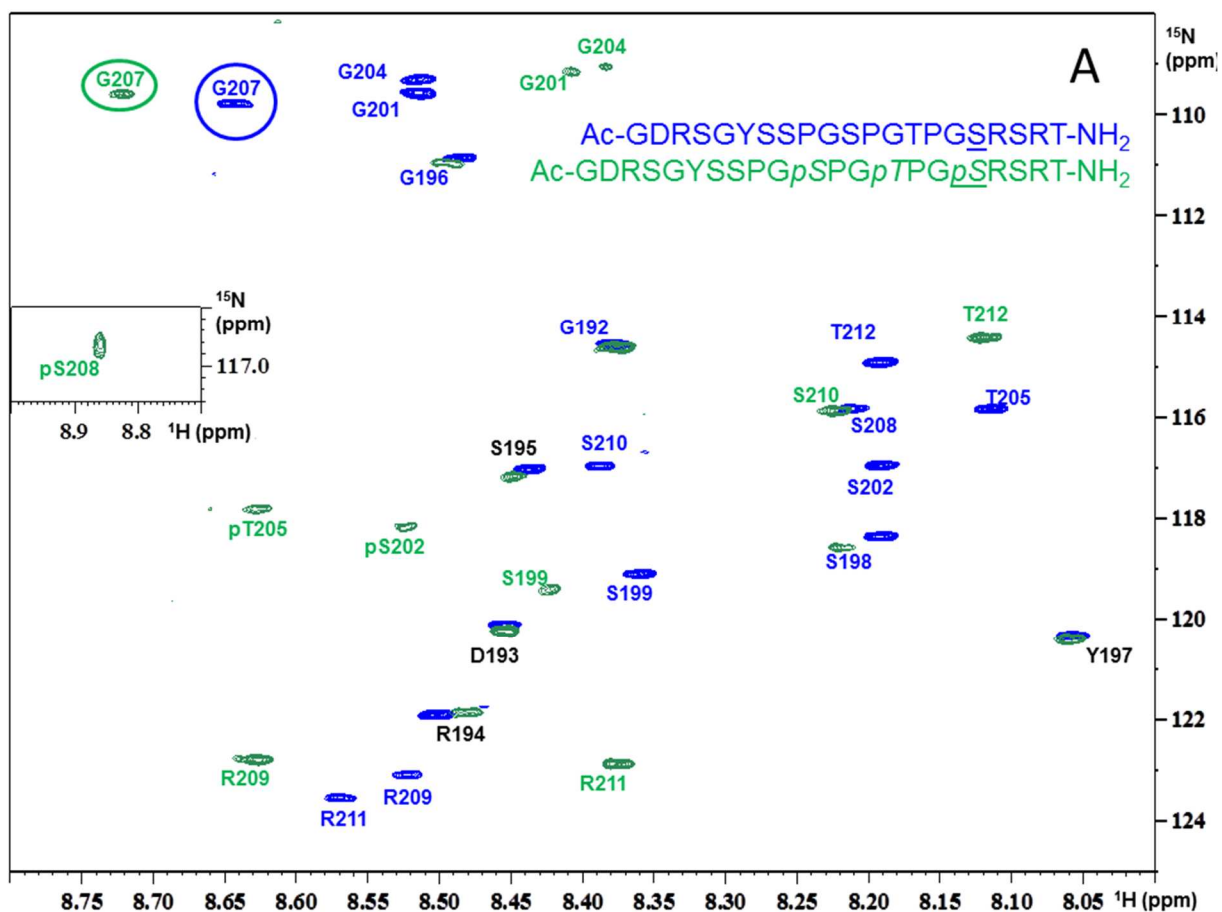
**Figure S6 :** (A) Zoom of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra centered on the resonances of the phosphorylated residues of TauF8 (red) or TauF8-G207V (purple) phosphorylated by ERK2. The G207V mutation in TauF8 does not change qualitatively the phosphorylation pattern as assessed by NMR. We note that pThr205 is more downfield shifted in the ERK2 phosphorylated TauF8-G207V sample pointing towards a more pronounced intra-residue hydrogen bonding between the phosphate group and its own amide proton. (B) Measurement of phosphorylation levels at each site in both samples confirms that phosphorylation patterns are also quantitatively similar. Ser202 and Thr205 were quantitatively phosphorylated in both samples. Phosphorylation by ERK2 was independently repeated three times, standard deviation around average value is shown by error bars. Levels of phosphorylation are estimated based on the integrals of resonance peaks as described in methods (NMR spectroscopy).



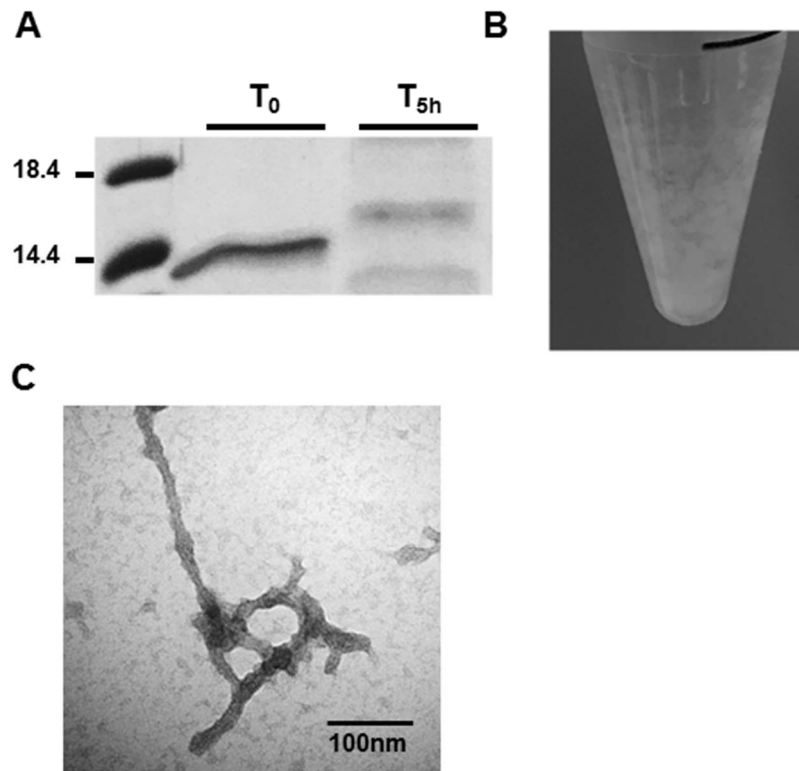
*Malia et al., Proteins 2016*

Ac-GDRSGYSSPGpS<sub>202</sub>PGpT<sub>205</sub>PGpS<sub>208</sub>RSRT-NH<sub>2</sub>

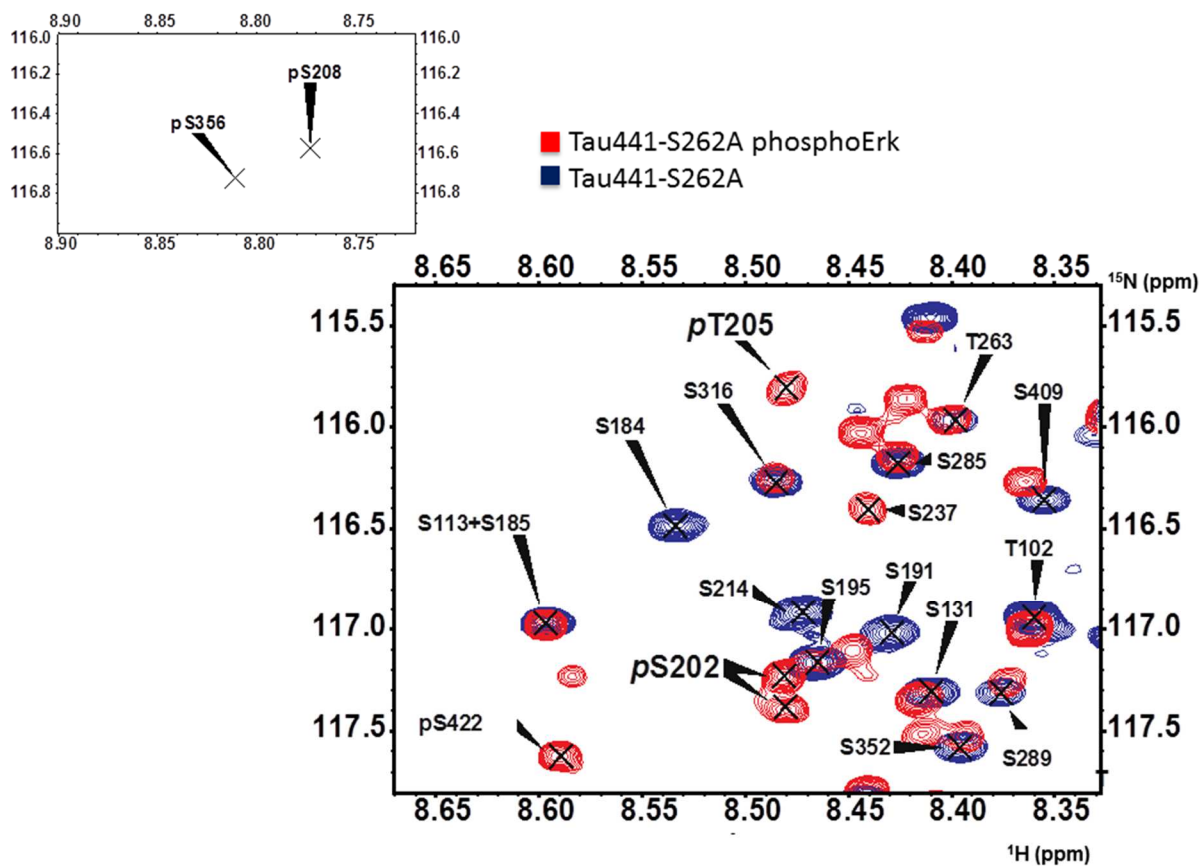
**Figure S7 :** Crystal structure of the AT8 Fab fragment in complex with a triply phosphorylated Tau peptide (PDB ID: 5E2W) The peptide binds to the clinical antibody in an extended conformation, and the additional phosphorylation of Ser208 leads to a tenfold improvement in binding affinity (4).



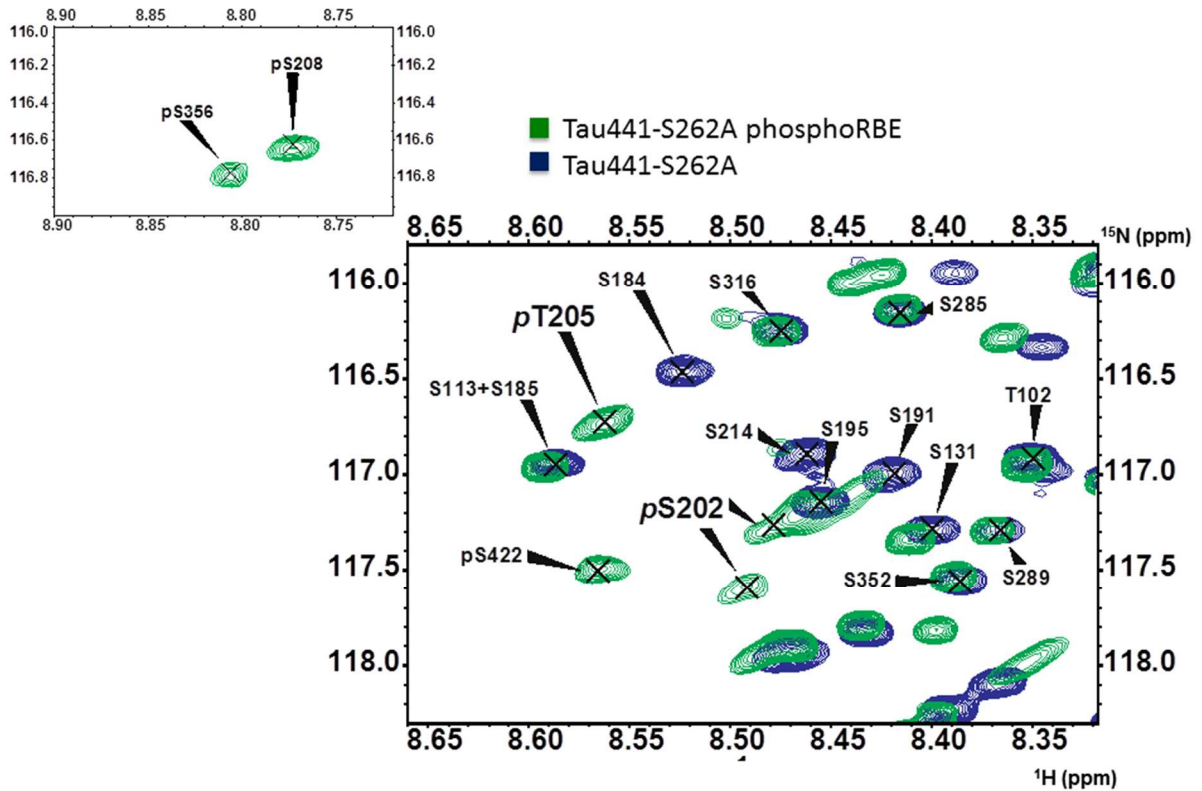
**Figure S8 :** (A)  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of the non-phosphorylated (OP-AT8; blue) and triply phosphorylated (3P-AT8; green) peptides of Tau. Additional phosphorylation of Ser208 (on top of the phosphorylation of Ser202 and Thr205 already present in 2P-AT8) eliminates the 0.9ppm chemical shift perturbation of Gly207 seen in 2P-AT8, and equally inverts the shift for the amide proton of Arg209. (B) Zoom of the amide proton region of the NOESY spectrum of the 3P-AT8 peptide, showing the absence of a  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\text{N}$  cross peak between the amide protons of Gly207 and Ser208. As for the Gly-to-Val substitution, the additional phosphorylation of Ser208 hinders the helical turn conformation.



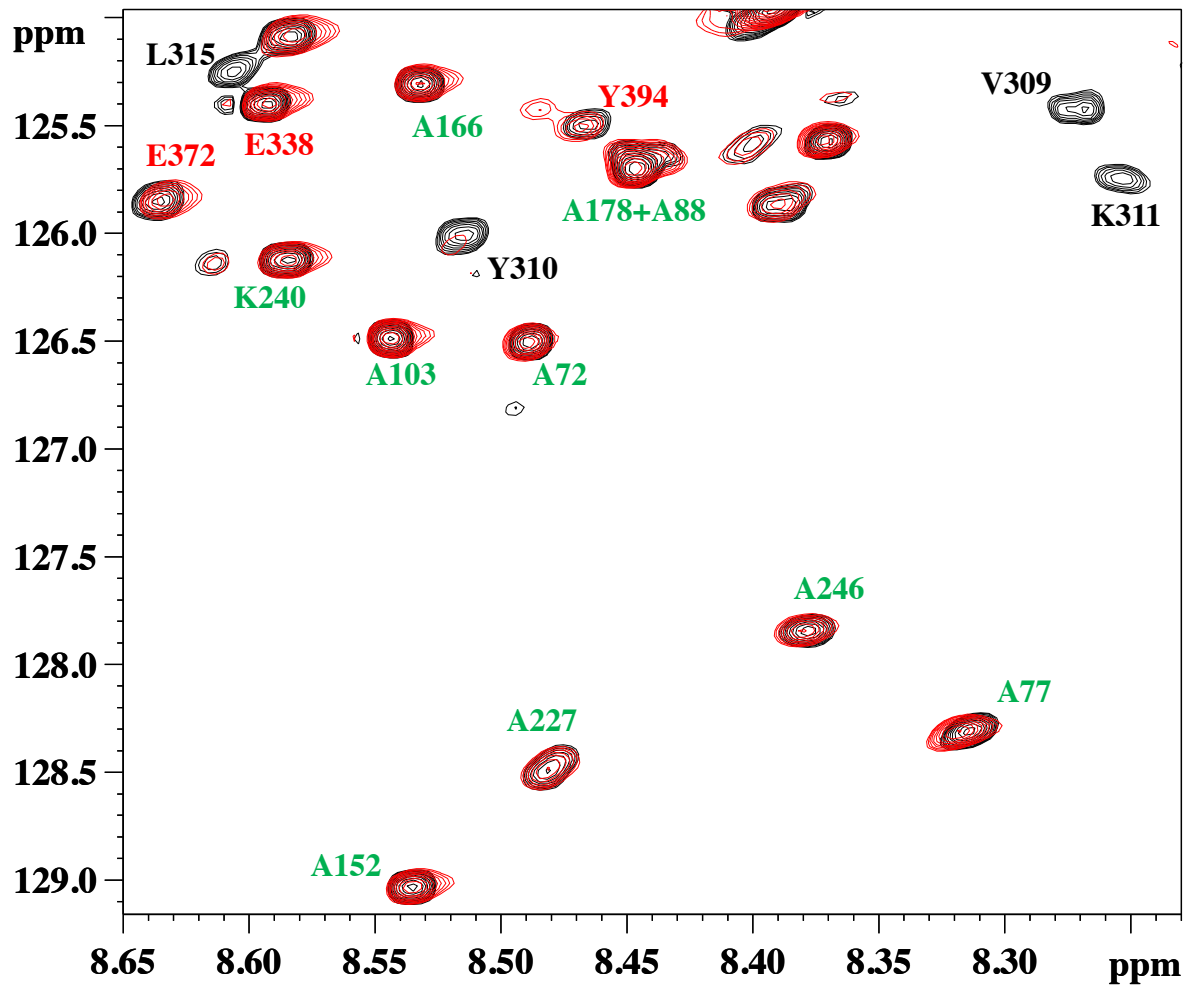
**Figure S9 :** Aggregation of TauF8-S262A during the RBE catalyzed phosphorylation reaction. **(A)** SDS-PAGE analysis (T=12%) of TauF8-S262A before and after 5h of reaction with RBE. After 5h of incubation, we observe a quasi-total loss of the soluble fraction. **(B)** Pellet observed after 5h of incubation in a 15ml tube. **(C)** Negative-staining Electron Microscopy (EM) of the pellet after 5h of incubation with RBE confirms the aggregation of TauF8-S262A during the phosphorylation reaction with RBE.



**Figure S10 :** Overlay of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of Tau441-S262A before (blue) or after (red) phosphorylation by ERK2. Both Ser202 and Thr205 are fully phosphorylated by the activated ERK2 kinase. As ERK2 is a proline directed kinase, the region where we would expect resonances for phosphorylated Ser356 and Ser208 (see Figure S11) is empty.

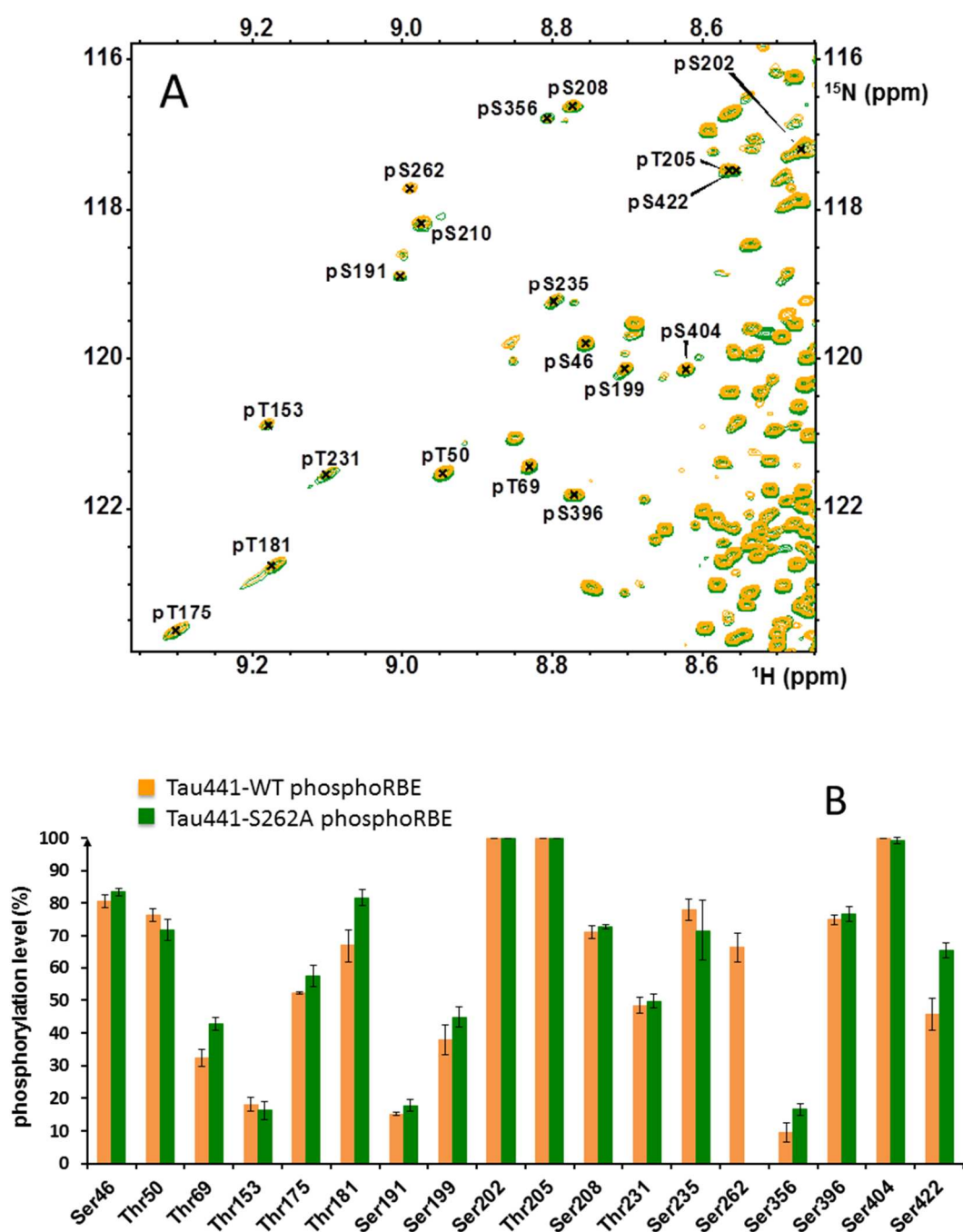


**Figure S11 :** Overlay of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of Tau441-S262A before (blue) or after (green) phosphorylation by the RBE. Both Ser202 and Thr205 are fully phosphorylated by the kinase activity of the RBE. However, the RBE does contain additional non-proline directed kinase(s), so we can observe phosphorylated Ser356 and Ser208 resonances.

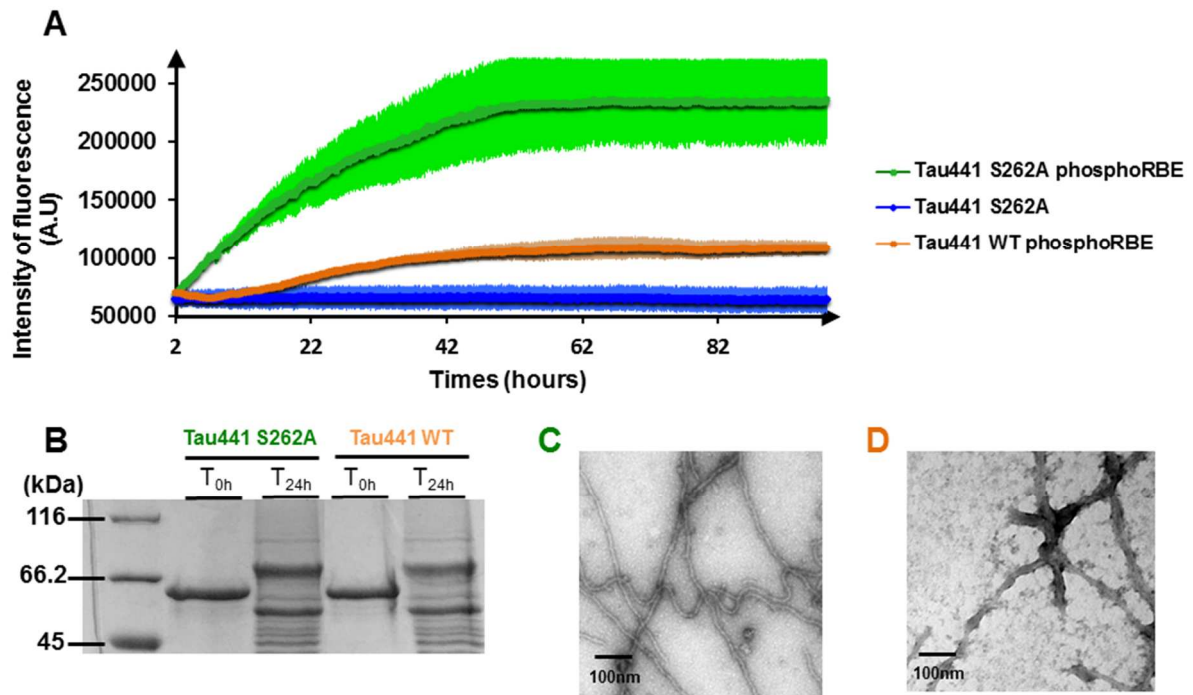


**Figure S12 :** Overlay of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of Tau441-S262A phosphorylated by RBE before (black) or after (red) aggregation for 7 days at 37°C. The spectra are recorded at 20°C but directly in the MES aggregation buffer. Signals of residues in the repeat region, and notably the PHF6 peptide (annotated in black) lose intensity as they are integrated in the rigid core of the fibers, whereas signals of residues in the N- (green annotations) and C-termini (red annotations) of Tau maintain significant intensity because of their residual mobility.





**Figure S13 :** (A) Zoom of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra centered on the resonances of the phosphorylated residues of Tau441-S262A (green) or wt Tau441 (orange) phosphorylated by the RBE. The S262A mutation in Tau441 does not change qualitatively the phosphorylation pattern as assessed by NMR. (B) Measurement in both samples of the levels of phosphorylation at each site confirms that phosphorylation patterns are also quantitatively similar. Phosphorylation of the Ser262 position in wt Tau441 is roughly 70%, whereas it is evidently absent in the Tau441 S262A mutant. Phosphorylation by fresh rat brain extract was independently repeated three times, standard deviation around average value is shown by error bars. Levels of phosphorylation are estimated based on the integrals of resonance peaks as described in methods (NMR spectroscopy).



**Figure S14 :** Confirmation of the inhibitory role of Ser262 phosphorylation in a heparin-free aggregation assay. **(A)** Aggregation of Tau441-S262A (blue), Tau441-S262A phosphorylated by RBE (green) and Tau441-wt phosphorylated by RBE (orange) as followed by ThT emission at 490nm. A robust increase of ThT emission at 490nm is observed for the phosphorylated Tau441-S262A sample, but we equally observe a weaker signal for RBE-phosphorylated wt Tau441. We tentatively assign this signal to the 30% fraction of wt Tau441 that was not phosphorylated at Ser262 after incubation with RBE (see Figure S12). **(B)** SDS-PAGE (T=10%) analysis of wt Tau441 and Tau441-S262A before (T<sub>0h</sub>) and after phosphorylation by RBE (T<sub>24h</sub>). After 24h of incubation with RBE, both samples display the characteristic gel shift. **(C, D)** Negative-staining EM at the end point of the aggregation assay of Tau441-S262A and wt Tau441, both phosphorylated by RBE. The amount of fibers observed for the RBE-phosphorylated Tau441-S262A was superior to that observed for the RBE-phosphorylated wt Tau441. Aggregation assay was independently repeated three times, standard deviation around average value is shown by error bars. For each experiment, triplicate analysis was done.

1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKEAPLQA 50  
 51 PTEDGSEEPG SETSDAKSAP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG 100  
 101 TTAAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK 150  
 151 IAAPRGAAPP GQKQGQANATR IPAKAPPAPK APPSSGEPPK AGDRSGYSAP 200  
 201 GSPGTPGSRS RTPSLPAPPT REPKKVAVVR APPKAPSSAK SRLQTAPVPM 250  
 251 PDLKNVKSKI GATENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV 300  
 301 PGGGSVQIVY KVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV 350  
 351 QSKIGALDNI THVPGGGNKK IETHKLFRE NAKAKTDHGA EIVYKAPVVS 400  
 401 GDTAPRHLSN VSSTGSIDMV DAPQLATLAD EVSASLAKQG L 441

**Figure S15 :** Primary sequence of the Tau441-AT8 protein. The RBE phosphorylated residues as identified by NMR analysis of the phosphorylated Tau441 sample (Figure S12) were all mutated to Ala, except for the Ser202/Thr205/Ser208 residues corresponding to the 3P-AT8 epitope.

## References

1. N. S. Gandhi *et al.*, A Phosphorylation-Induced Turn Defines the Alzheimer's Disease AT8 Antibody Epitope on the Tau Protein. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2015), doi:10.1002/anie.201501898.
2. A. Bah *et al.*, Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature*. **519**, 106–109 (2015).
3. G. Bouvignies, M. Blackledge, Structural biology turned on its head. *Chembiochem*. **16**, 1033–1034 (2015).
4. T. J. Malia *et al.*, Epitope mapping and structural basis for the recognition of phosphorylated tau by the anti-tau antibody AT8. *Proteins* (2016), doi:10.1002/prot.24988.

# Chapter 11

## **The Study of Posttranslational Modifications of Tau Protein by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Phosphorylation of Tau Protein by ERK2 Recombinant Kinase and Rat Brain Extract, and Acetylation by Recombinant Creb-Binding Protein**

**Haoling Qi, Clément Despres, Sudhakaran Prabakaran, François-Xavier Cantrelle, Béatrice Chambraud, Jeremy Gunawardena, Guy Lippens, Caroline Smet-Nocca, and Isabelle Landrieu**

### **Abstract**

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy can be used as an analytical tool to investigate posttranslational modifications of protein. NMR is a valuable tool to map the interaction regions of protein partners. Here, we present protocols that have been developed in the course of our studies of the neuronal Tau protein. Tau is found aggregated in the neurons of Alzheimer's disease patients. Development of the disease is accompanied by increased, abnormal phosphorylation and acetylation of Tau. We have used NMR to investigate how these posttranslational modifications of Tau affect the interactions with its partners. We present here detailed protocols of *in vitro* phosphorylation of Tau by recombinant kinase, ERK2, or kinase activity of rat brain extracts, and acetylation by recombinant Creb-binding protein (CBP) acetyltransferase. The analytical characterization of the modified Tau by NMR spectroscopy is additionally described.

**Key words** Phosphorylation, Acetylation, ERK kinase, Creb-binding protein, Acetyltransferase, NMR spectroscopy, Recombinant proteins

---

## **1 Introduction**

Tau protein is hyperphosphorylated in the paired helical filaments (PHF) found in neurons in brain affected by Alzheimer's disease. The longest Tau protein isoform (441-residue) has 80 Threonine (T) and Serine (S) residues exposed since Tau is an intrinsically disordered protein with all these sites prone to modification by numerous kinases [1]. In the PHF-Tau, up to about 45

phosphorylation sites can be modified [2, 3] while 15–30 Tau phosphorylation sites were identified by mass spectrometry in Tau extracted from both normal mice and a mouse AD disease model [4] or cognitively normal human brain. Most of them correspond to proline-directed sites located mainly in the proline-rich region of Tau. Given the number and the proximity of these phosphorylation sites, to identify the phosphorylation sites in a phosphorylated Tau sample and to evaluate the level of modification for each of these sites are difficult [4]. Recently, acetylation of Tau protein was shown to be associated with Tauopathies [5, 6]. In this case, the lysine residues are modified by an acetyl group on the NH<sub>3</sub> moiety of the side chain, neutralizing the positive charge of the lysine and modifying the steric characteristics of the side chain. Mass spectrometry analysis revealed 14 lysine residues were acetylated in Tau samples purified from mice, and these were mainly located in the microtubule binding region of Tau [4].

In addition, these posttranslational modifications affect the binding of Tau to several molecular partners, an aspect of interest to study by NMR spectroscopy [7]. The need for *in vitro* modified Tau for these NMR experiments has led us to develop protocols to generate the required amount of modified protein. In addition, we have used NMR spectroscopy to characterize enzymatically modified Tau samples with success [8–12]. Given the improvement of the probe sensitivity, we can now work with samples in the 10  $\mu$ M range, in volumes that can be limited to 200  $\mu$ l. A typical good sample of Tau would be 1 mg in 200  $\mu$ l or 100  $\mu$ M of Tau protein. This still is a lot of material compared to most of the applications of biochemistry, such as the immunodetection for the phosphorylation characterization or the GST pull-down for the interaction investigations. Yet compared to these methods we can obtain information at the molecular level and define the interaction sites up to the residue. Hence, the drawback of the material quantity is compensated by the resolution of the results.

We will here first describe the preparation of isotopically labeled Tau for NMR investigation. The *in vitro* phosphorylated samples of Tau by rat brain extract have been used for years as a model of hyperphosphorylated Tau [13–15]. Phosphorylation by rat brain extract has been described in Goedert et al. 1993 [14]. The protocol here presented is an adaptation to the need of biophysical analysis requiring the preparation of sufficient quantity of protein. In the course of our investigation, we also observed that a Tau protein phosphorylated by ERK2 is modified on numerous sites described as pathological sites of phosphorylation, and thus represents an interesting model of hyperphosphorylated Tau. ERK2 is activated by phosphorylation by MEK [16–18]. The acetylation of Tau is obtained *in vitro* by a fragment of the CBP protein, a histone acetyltransferase [12]. In addition to the modified, isotopically labeled Tau protein preparation, we describe the NMR strategy used for the identification of the PTMs.

## 2 Materials

Prepare all solutions using ultrapure water and analytical grade reagents. Media and stock solutions for bacterial culture, and all buffers are sterilized.

### 2.1 Preparation of Recombinant $^{15}\text{N}$ -Tau, $^{15}\text{N}$ , $^{13}\text{C}$ -Tau and $^{15}\text{N}_2$ -Lysine/ $^{13}\text{C}$ -Tau

1. TaupET15b recombinant T7 expression plasmid (Novagen).
2. BL21(DE3) transformation competent *E. coli* bacteria (New England Biolabs).
3. Autoclaved LB Broth, Lennox (DIFCO).
4. M9 buffer: 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g NaCl per liter; dissolve in water and autoclave.
5. 1 M  $\text{MgSO}_4$ : prepare in ultrapure water and autoclave.
6. 100 mM  $\text{CaCl}_2$ : prepare in ultrapure water and autoclave.
7. MEM vitamin complements 100 $\times$  (Sigma; *see Note 1*).
8. 100 mg/ml stock solution of ampicillin antibiotics: prepare in ultrapure water and store 1 ml aliquots at  $-20^\circ\text{C}$ .
9. 1 M stock solution of IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside): prepare in ultrapure water, 0.2  $\mu\text{M}$  filter-sterilize and store 1 ml-aliquots at  $-20^\circ\text{C}$ .
10.  $^{15}\text{N}$ - $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Isotec) or  $^{14}\text{N}$ - $\text{NH}_4\text{Cl}$ .
11.  $^{13}\text{C}_6$ -Glucose (Isotec).
12.  $^{12}\text{C}_6$ -Glucose.
13.  $^{15}\text{N}_2/^{13}\text{C}_6$ -L-Lysine hydrochloride (Isotec).
14.  $^{15}\text{N}$ -ISOGRO complete medium powder (Isotec) (*see Note 1*).
15.  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -ISOGRO complete medium powder (Isotec) (*see Note 1*).
16. The M9 medium is reconstituted by addition of 1 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$ , 1 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$  (*see Note 2*), 10 ml 100 $\times$  MEM vitamin complement (Sigma), 1 ml 100 mg/ml Ampicillin to 1 L of M9 buffer. In addition, depending on the isotope labeling scheme, the components 17, 18, and 19 are dissolved in 10 ml of M9 buffer and directly 0.2  $\mu\text{M}$  filter-sterilized into the M9 medium (*see Note 3*).
17. For the  $^{15}\text{N}$  uniform labeling: 300 mg  $^{15}\text{N}$ -ISOGRO complete medium, 1 g  $^{15}\text{N}$ - $\text{NH}_4\text{Cl}$ , and 4 g  $^{12}\text{C}_6$ -glucose.
18. For the  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  uniform labeling: 300 mg  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -ISOGRO complete medium, 1 g  $^{15}\text{N}$ - $\text{NH}_4\text{Cl}$ , and 2 g  $^{13}\text{C}_6$ -glucose (*see Note 4*).
19. For the selective  $^{15}\text{N}$ -Lysine and uniform  $^{13}\text{C}$ -labeling: 1 g  $^{14}\text{N}$ - $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 g  $^{13}\text{C}_6$ -glucose and 20 min before induction 150 mg of  $^{15}\text{N}_2/^{13}\text{C}_6$ -L-Lysine hydrochloride.

20. Cation-exchange chromatography (CEX) A buffer (*see Note 5*): 50 mM phosphate buffer pH6.5, 1 mM EDTA; autoclave.
21. Extraction buffer: CEX A buffer supplemented with Protease inhibitors 1× (1 pellet for 50 ml, Roche) and 2000 U DNaseI for 50 ml (20,000 U/ml, EUROMEDEX).
22. Cation-exchange chromatography CEX B buffer: CEX A buffer with 1 M NaCl; autoclave.
23. SP sepharose FF 5 ml column (GE Healthcare).
24. HiPrep 26/10 desalting column (GE healthcare).
25. Lyophilization buffer: 50 mM Ammonium Bicarbonate.
26. Emulsiflex-C3 homogenizer (Avestin).
27. Lyophilizer.

## **2.2 Preparation of Recombinant ERK2**

1. His-ERK recombinant T7 expression plasmid.
2. BL21(DE3) transformation competent *E. coli* bacteria (New England Biolabs).
3. Autoclaved LB broth Lennox (Difco).
4. 100 mg/ml stock solution of ampicillin antibiotics.
5. 1 M stock solution of IPTG.
6. PBS: phosphate buffer saline.
7. Extraction buffer: 50 mM phosphate buffer pH7.6, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, Protease inhibitor 1× (1 tablet for 50 ml, EDTA-free; Roche), 2000 U DNaseI for 50 ml (20,000 U/ml, EUROMEDEX).
8. Ni-NTA chromatography cartridge 1 ml (Thermo Science).
9. Wash buffer: 50 mM phosphate buffer pH7.6, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole; autoclave.
10. Elution buffer: 50 mM phosphate buffer pH7.6, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole (*see Note 6*).
11. Dialysis bags (12–14 kDa cutoff, 0.32 ml/cm; Spectrum Laboratories).
12. Centrifugal concentration devices (10 kDa cutoff, 2 ml; Sartorius).
13. 12% SDS Polyacrylamide precast gels (Pierce).
14. Activation buffer: 10 mM Hepes.KOH, pH7.3, 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, and 10% Glycerol.
15. Conservation buffer: 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EGTA, 20% Glycerol.
16. Emulsiflex-C3 homogenizer (Avestin).

## **2.3 Preparation of Recombinant GST-MEK1 R4F**

1. GST-MEK1 R4F recombinant pGEX expression plasmid [19].
2. BL21(DE3) transformation competent *E. coli* bacteria (New England Biolabs).



3. Autoclaved LB broth Lennox (Difco).
4. 100 mg/ml stock solution of ampicillin antibiotics.
5. 1 M stock solution of IPTG.
6. PBS: phosphate buffer saline.
7. Extraction buffer: 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM EDTA, 300 mM NaCl, Protease inhibitor 1× (1 tablet for 50 ml, EDTA-free; Roche), 2000 U DNaseI for 50 ml (20,000 U/ml, EUROMEDEX).
8. Glutathione Agarose 4B chromatography cartridge 5 ml (Protino, Macherey Nagel).
9. Wash buffer: 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM EDTA, 300 mM NaCl.
10. Elution buffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM Glutathione reduced, pH7.5 (*see Note 6*).
11. Dialysis bags (12–14 kDa cutoff, 0.32 ml/cm; Spectrum Laboratories).
12. Centrifugal concentration devices (10 kDa cutoff, 2 ml; Sartorius).
13. Activation buffer: 10 mM Hepes.KOH, pH7.3, 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl and 10% Glycerol.
14. Conservation buffer: 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EGTA, 20% Glycerol.
15. Emulsiflex-C3 homogenizer (Avestin).

#### **2.4 Recombinant ERK2 Activation**

1. GST-MEK1 R4F recombinant protein (Subheadings 3.5 and 3.6) or commercial activated-MEK1 (Millipore 14-429).
2. Recombinant His-ERK2 protein in activation buffer or conservation buffer (Subheadings 3.3 and 3.4).
3. Activation buffer: 10 mM Hepes.KOH, pH7.3, 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl.
4. PD-10 G25 resin desalting column (GE-Healthcare).
5. Centrifugal concentration devices (10 kDa cutoff, 2 ml, Sartorius).
6. Glutathione Agarose 4B beads (Protino).

#### **2.5 Phosphorylation of Tau by Activated ERK2**

1. 1 mg of <sup>15</sup>N and 5 mg of <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C lyophilized recombinant full-length Tau (Subheadings 3.1 and 3.2).
2. Activated His-ERK2 in activation buffer (Subheading 3.7).
3. Phosphorylation buffer 5×: 250 mM Hepes.KOH, pH8.0, 62.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl.
4. Protease inhibitor 40× (1 tablet in 1 ml Phosphorylation buffer, EDTA-free; Roche).
5. PD MidiTrap G25 resin desalting column (GE-Healthcare).

6. Lyophilization buffer: 50 mM Ammonium Bicarbonate.
7. NMR buffer: 50 mM deuterated *d11*-Tris-HCl (Isotec), pH6.5, 30 mM NaCl, 2.5 mM EDTA.
8. 12% SDS Polyacrylamide precast gels (Pierce).
9. Lyophilizer.

### **2.6 Phosphorylation of Tau by Rat Brain Extract**

1. 1 mg of <sup>15</sup>N-labeled recombinant full-length Tau per phosphorylation assay (Subheadings 3.1 and 3.2).
2. 100 μM okadaic acid (Sigma).
3. Homogenizing buffer H: 10 mM Tris-HCl pH7.4, 5 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 μM okadaic acid (Sigma) supplemented with 20 μg/ml Leupeptin and 40 mM Pefabloc.
4. HMED buffer 5×: 200 mM Hepes.KOH, pH7.3, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM EGTA, 10 mM DTT.
5. PD-10 G25 resin desalting column (GE-Healthcare).
6. Lyophilization buffer: 50 mM Ammonium Bicarbonate.
7. 12% SDS Polyacrylamide precast gels (Pierce).
8. NMR buffer: 50 mM deuterated *d11*-Tris-HCl (Isotec), pH6.5, 30 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% D<sub>2</sub>O, and 1 mM TMSP.
9. Lyophilizer.
10. Ultracentrifuge and type 50 Ti rotor (Beckman Coulter).

### **2.7 Preparation of Recombinant CBP**

1. GST-CBP[1202-1848] recombinant T7 expression plasmid (pGEX-6P-1).
2. BL21(DE3) transformation competent *E. coli* bacteria (New England Biolabs).
3. Autoclaved LB Broth, Lennox (DIFCO).
4. 100 mg/ml stock solution of ampicillin antibiotics.
5. 1 M stock solution of IPTG.
6. PBS 10×: phosphate buffer saline.
7. Extraction buffer: PBS 1× pH7.6, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 10 mM EDTA, 2 mM DTT, Protease inhibitor 1× (1 tablet for 50 ml; Roche), 2000 UDNaseI for 50 ml (20,000 U/ml, EUROMEDEX).
8. Glutathione sepharose resin beads (GE Healthcare): 20 μl of resin beads/mL of soluble extract.
9. Wash buffer: PBS 1× pH7.6, 10% glycerol, 1% Triton X100, 10 mM EDTA, 2 mM DTT.
10. Conservation buffer: 25 mM Hepes.KOH pH7.8, 0.1 mM EDTA, 1 mM THP (Tris (3-hydroxypropyl) phosphine), 50% glycerol (i.e., acetylation buffer with 50% glycerol).

11. 10% SDS Polyacrylamide gels.
12. Acetylation buffer: 25 mM Hepes.KOH pH7.8, 0.1 mM EDTA, 1 mM THP.
13. Stock solution of acetyl-coenzyme A (AcCoA) at 20 mM: 25 mg of AcCoA trisodium salt (FW 875; Sigma) are dissolved in 1.423 ml acetylation buffer and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
14. Stock solution of CBP peptide substrate (Ac-QPVEPKKPVES KKSQKSAKSKEKQ-NH<sub>2</sub>, 8 TFA) at 10 mM: 18 mg of peptide was dissolved in 0.5 ml of deionized water. The pH was adjusted to 7.0 with a solution of NaOH 10 M.
15. C18 Zorbax 300SB analytical column 4.6×150 mm (Agilent).
16. 10% TFA (v/v).
17. Ultrasonic bath.
18. Buffers for reverse-phase chromatography: Buffer A (equilibration): 0.1% TFA (10 ml of the 10% TFA solution per liter), 2% acetonitrile in water; Buffer B (elution): 0.1% TFA: 80% acetonitrile in water; both buffers are degassed in an ultrasonic bath for 15 min at room temperature.
19. Emulsiflex-C3 homogenizer (Avestin).

### **2.8 Acetylation of Tau by CBP**

1. Acetylation buffer: 25 mM Hepes.KOH pH7.8, 0.1 mM EDTA, 1 mM THP.
2. Stock solution of acetyl-coenzyme A (AcCoA) at 20 mM: 25 mg of AcCoA trisodium salt (Sigma) is dissolved in 1.423 ml acetylation buffer and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
3. Recombinant GST-CBP[1202-1848] fragment (Subheadings 3.11 and 3.12).
4. <sup>15</sup>N-labeled or <sup>15</sup>N-Lysine-labeled recombinant Tau protein (Subheadings 3.1 and 3.2).
5. C8 Zorbax 300SB semi-preparative column 9.4×250 mm (Agilent).
6. 10% TFA (v/v).
7. Ultrasonic bath.
8. Buffers for reverse-phase chromatography: Buffer A (equilibration): 0.1% TFA (10 ml of the 10% TFA solution per liter), 2% acetonitrile in water; Buffer B (elution): 0.1% TFA: 80% acetonitrile in water; both buffers are degassed in an ultrasonic bath for 15 min at room temperature.
9. HiPrep 26/10 desalting column (GE Healthcare).
10. Lyophilization buffer: 50 mM Ammonium Bicarbonate.
11. NMR buffer: 50 mM phosphate buffer pH6.4, 25 mM NaCl, 2.5 mM EDTA.
12. Lyophilizer.

### 3 Methods

#### 3.1 Production of Recombinant

##### <sup>15</sup>N-Tau, <sup>15</sup>N-Lysine,<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Tau or <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C-Tau

##### 3.1.1 Day 1: Bacterial Transformation

Bacterial fermentations have to be performed following the best practices of sterile manipulations.

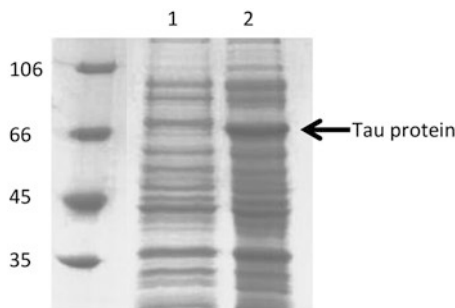
1. Transform Tau pET15b recombinant T7 expression plasmid (Novagen) into BL21(DE3) competent bacterial cells.
2. Mix 50 µl of competent BL21(DE3) bacteria with 100 ng of the plasmid DNA in a 1.5 ml plastic tube.
3. Incubate the mixture on ice for 30 min, followed by heat shock for 30 s at 42 °C. Place back the tube on ice for 5 min.
4. Add 1 ml of LB medium at room temperature and incubate the bacterial suspension at 37 °C for 30 min.
5. Spread 100 µl of the suspension at the surface of a LB plate containing 100 µg/ml of ampicillin antibiotics to select for the colonies having integrated the plasmid.
6. Incubate the plate overnight at 37 °C.

##### 3.1.2 Day 2: Bacterial Growth

1. Start a small scale bacterial culture of 20 ml by using few colonies from the selection plate as inoculum.
2. Grow the Tau pET15b bacteria at 37 °C for 6 h in LB medium supplemented with 100 µg/ml of ampicillin, to reach saturation corresponding to an approximate OD600 of 4.0.
3. Meanwhile, reconstitute 1 L of M9 medium by the addition of the supplements and isotopes following one of the labeling schemes indicated in Subheading 2.1.
4. Start a large scale culture of 1 L by inoculating 20 ml of the LB saturated culture into 1 L of M9 medium supplemented with 100 µg/ml of ampicillin. Perform the culture in 2 L Erlenmeyer culture plastic baffled-flasks placed in an incubator programmed at 10 °C and 50 rpm for 14 h for the uniform <sup>15</sup>N or <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C-labeling or for 12 h for the <sup>15</sup>N-Lysine, <sup>13</sup>C-labeling considering that the growth phase will be slower due to the absence of complete medium for the later (*see* **Notes 7** and **8**).
5. Program the incubator to switch to 200 rpm and 37 °C after this period.

##### 3.1.3 Day 3: Induction Phase

1. Check the bacterial growth by measuring the OD at 600 nm of an aliquot of 1 ml of the culture.
2. For the uniform <sup>15</sup>N or <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C-labeling, induce the protein production by the addition of 400 µM IPTG when bacterial culture arrives at an OD600 of 0.8–1.0. Alternatively, for the <sup>15</sup>N-Lysine, <sup>13</sup>C-labeling, add 150 mg of <sup>15</sup>N<sub>2</sub>/<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-L-Lysine hydrochloride when bacterial culture reaches an OD600 of



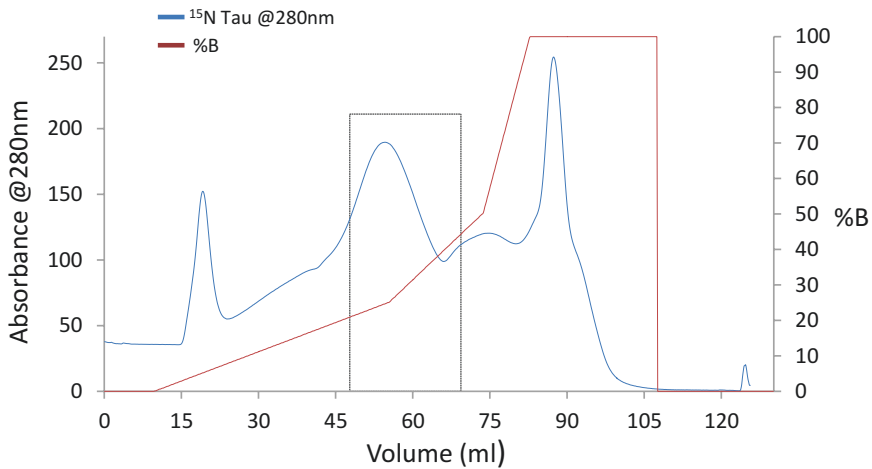
**Fig. 1** Induction of recombinant Tau expression in BL21(DE3) bacteria. Lane 1: BL21(DE3) bacteria before the expression induction by IPTG. Lane 2: BL21(DE3) bacteria 4 h after induction. The band of recombinant Tau protein is shown by *black arrow* around 66 kDa

0.6–0.7, and continue the culture for 20 min. Then, induce the protein production by the addition of 400  $\mu$ M IPTG.

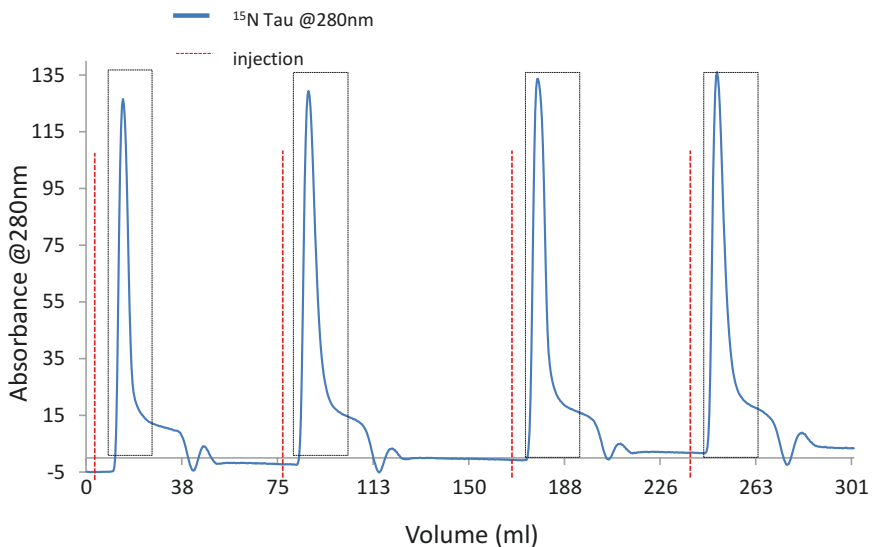
3. Continue the bacterial culture for 4 h at 37 °C and 200 rpm.
4. Collect bacterial pellet by centrifugation for 20 min at 5500  $\times g$  in 1 L bottles.
5. Suspend the bacterial pellet in 50 ml of PBS buffer and centrifuge in 50 ml plastic tubes at 4000  $\times g$ .
6. Remove the supernatant solution and freeze the pellet at  $-20$  °C until further use (Fig. 1).

### 3.2 Purification of $^{15}\text{N}$ -Tau, $^{15}\text{N}$ -Lysine, $^{13}\text{C}_\alpha$ -Tau or $^{15}\text{N}$ , $^{13}\text{C}$ -Tau

1. Unfreeze the bacterial pellet at room temperature and thoroughly suspend in 45 ml of extraction buffer.
2. Homogenize and lysate bacterial suspension with a high-pressure homogenizer.
3. Remove the insoluble material by centrifugation at 20,000  $\times g$  for 30 min.
4. Heat the bacterial protein extract for 15 min at 75 °C as a first purification step. The Tau protein is recovered in the soluble fraction after centrifugation at 15,000  $\times g$  for 30 min.
5. Perform purification of the  $^{15}\text{N}$ -Tau,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Tau,  $^{15}\text{N}$ -Lysine,  $^{13}\text{C}$ -Tau protein by cation exchange chromatography on a 5 ml Hitrap SP sepharose FF column. After loading the sample on the column, wash the resin with CEX A buffer. Elute the protein by a three-step NaCl gradient with CEX B buffer. The first step corresponds to ten volumes of column to reach 250 mM NaCl, followed by a second step with five volumes of column to reach 500 mM NaCl, and the third step to two volumes of the column to reach 1 M NaCl (Fig. 2).



**Fig. 2** Cation exchange chromatography purification step of the  $^{15}\text{N}$ -Tau. The chromatogram shows the absorbance at 280 nm in milli-absorption units (graph in *blue*) and the percentage of CEX buffer B (graph in *marron*). The peak corresponding to  $^{15}\text{N}$ -Tau is boxed in *black*



**Fig. 3** Desalting of  $^{15}\text{N}$ -Tau into ammonium bicarbonate buffer from the previous purification step of cation exchange chromatography (Fig. 2). The protein elution is monitored at 280 nm. Four injections of 5 ml  $^{15}\text{N}$ -Tau are performed for one CEX chromatography. *Red lines* correspond to injections (5 ml loop). Collected  $^{15}\text{N}$ -Tau fractions are shown in *black dotted box*

6. Transfer the pooled fractions from the chromatography purification step (corresponding to the box in Fig. 2, between 45 and 65 ml) on a 26/10 HiPrep Desalting column equilibrated in lyophilization buffer. Proteins elute in the void volume of about 12 ml. Collect the eluate and lyophilize the desalted fractions (*see Notes 9 and 10*). Injections of 5 ml are repeated four to five times, depending on the volume of the cation exchange pool (Fig. 3).

7. Suspend the lyophilized protein in a buffer suitable for further protein modification (phosphorylation or acetylation).

### 3.3 Production of Recombinant ERK2

#### 3.3.1 Day 1: Bacterial Transformation

Bacterial fermentations have to be performed following the best practices of sterile manipulations.

1. Transform His6-tagged p42 MAP kinase from *Xenopus laevis* (His-ERK2) recombinant T7 expression plasmid into BL21(DE3) competent bacterial cells based on chemical transformation following the same procedure as described in Subheading 3.1.1.

#### 3.3.2 Day 2: Bacterial Growth

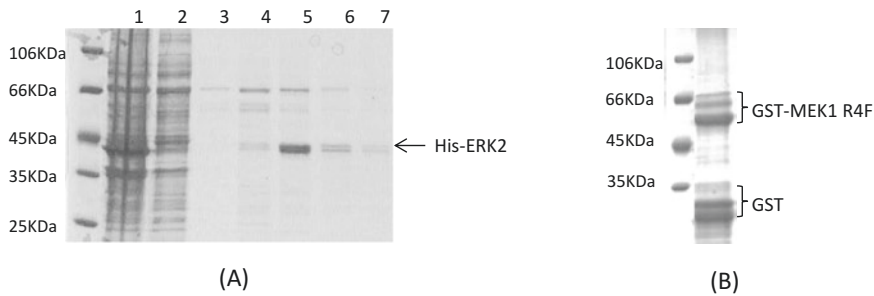
1. Start a small scale bacterial culture of 10 ml with few colonies from the selection plate as inoculum.
2. Grow the His-ERK pET BL21(DE3) bacteria overnight in LB medium supplemented with 100 µg/ml of ampicillin to reach saturation corresponding to an approximate OD600 of 4.0.

#### 3.3.3 Day 3: Induction Phase

1. Start a large scale culture of 1 L by inoculating 10 ml of the overnight culture into 1 L of LB medium supplemented with 100 µg/ml of ampicillin. Perform the culture in 2 L Erlenmeyer culture plastic baffled flasks placed in an incubator at 37 °C and shake at 200 rpm.
2. Check growth by measuring the OD at 600 nm of an aliquot of 1 ml of the culture.
3. When bacterial culture arrives at 0.8–1.0 of OD600, induce the protein production by the addition of 700 µM IPTG. Continue the bacterial culture during 4 h, at 30 °C and 200 rpm.
4. Collect bacterial pellet by centrifugation for 20 min at 5500 × g in 1 L bottles.
5. Suspend the bacterial pellet in 50 ml of PBS buffer and centrifuge in 50 ml plastic tubes at 4000 × g.
6. Remove the supernatant solution and freeze the pellet at -20 °C until further use.

### 3.4 Purification of Recombinant ERK2

1. Unfreeze the bacterial pellet at room temperature.
2. Suspend thoroughly in 45 ml extraction buffer.
3. Homogenize and lysate bacterial suspension with a high-pressure homogenizer.
4. Remove the insoluble material by centrifugation at 20,000 × g for 30 min.
5. Load the soluble bacterial lysate containing the His-ERK2 recombinant kinase (Fig. 4a) on a Ni-NTA resin equilibrated in wash buffer.
6. Wash the resin with wash buffer followed by 5 % elution buffer to remove residual lysate.



**Fig. 4 (a)** SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) is run to monitor the preparation steps of His-ERK2. 5–10  $\mu$ l of samples collected from the purification steps are run through 12% SDS-Polyacrylamide Gel. Line 1: bacterial lysate; Line 2: soluble extract; Lines 3 and 4: washing fractions collected with 5% elution buffer. Lines 5–7: purified sample fractions. Eluted His-ERK2 corresponds to the band appearing at 42 kDa in Line 5. A number of contaminating proteins are removed by washing the resin with 5% elution buffer (*see* Lines 3 and 4). **(b)** Analysis of purified GST-MEK1 R4F by SDS-PAGE. 5  $\mu$ l collected from the elution step is run through 12% SDS-Polyacrylamide Gel. GST-MEK1 R4F fusion protein (*up*) and GST (*bottom*) are labeled. The GST tag is expected at 26 kDa and the GST-MEK1 R4F at 68 kDa. The multiple bands correspond to degradation products of the fusion protein

7. Elute His-ERK2 by equilibration of the resin into 100% elution buffer. Collect the eluted fractions by 1 ml aliquots which are analyzed by SDS-PAGE before pooling homogeneous fractions. His-ERK2 is obtained in about 5 ml of pooled fractions at 1.0–1.2 mg/ml concentration. The yield is approximately 5 mg of His-ERK2 per liter of LB broth.
8. Dialyze His-ERK2 against the activation buffer or the conservation buffer.
9. Concentrate His-ERK2 in the activation buffer up to 3 mg/ml using centrifugal devices. At this step, His-ERK2 (*see Note 11*) is ready for the activation step (Subheading 3.7). Freeze His-ERK2 in conservation buffer in liquid nitrogen and keep at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use.

### 3.5 Production of Recombinant GST-MEK1 R4F

#### 3.5.1 Day 1: Bacterial Transformation

Bacterial fermentations have to be performed following the best practices of sterile manipulations.

1. Transform the pGEX plasmid containing the cDNA sequence of recombinant GST-MEK1 R4F MAPK kinase into BL21(DE3) competent bacterial cells based on chemical transformation following the same procedure as described in Subheading 3.1.1.

#### 3.5.2 Day 2: Bacterial Growth

1. Start a small scale bacterial culture of 20 ml with few colonies from the selection plate as inoculum in LB medium supplemented with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of ampicillin to reach saturation corresponding to an approximate OD600 of 4.0.



### 3.5.3 Day 3: Induction Phase

1. Start 2 L of BL21(DE3) bacterial culture in LB medium supplemented by 100 µg/ml ampicillin antibiotics by adding the 20 ml overnight saturated bacterial culture to the fresh medium. Perform the culture in a 2 L Erlenmeyer culture plastic baffled flask placed in an incubator at 37 °C and shake at 200 rpm.
2. Check growth by measuring the OD at 600 nm of an aliquot of 1 ml of the culture.
3. When bacterial culture arrives at 0.8–1.0 of OD<sub>600</sub>, induce the protein production by the addition of 700 µM IPTG.
4. Continue the bacterial culture during 4 h at 30 °C and 200 rpm.
5. Collect bacterial pellet by centrifugation for 20 min at 5500 × *g* in 1 L bottles.
6. Suspend the bacterial pellet in 50 ml of PBS buffer and centrifuge in 50 ml plastic tubes at 4000 × *g*.
7. Remove the supernatant solution and freeze the pellet at –20 °C until further use.

### 3.6 Purification of Recombinant GST-MEK1 R4F

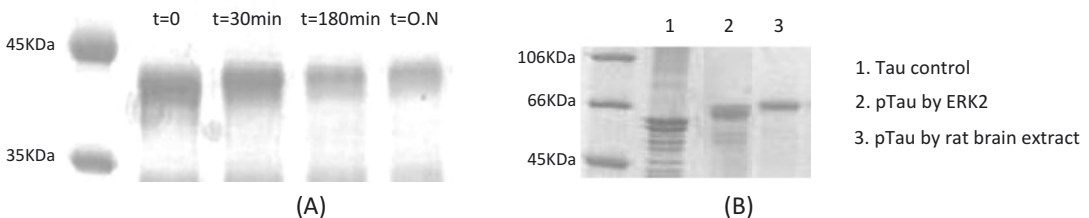
1. Unfreeze the bacterial pellets from 2 L bacterial culture at room temperature and then suspend bacteria thoroughly in extraction buffer.
2. Homogenize and lyse the suspension using a high-pressure homogenizer.
3. Remove the insoluble material by centrifugation at 20,000 × *g* for 30 min.
4. Load the soluble bacterial lysate containing the recombinant GST-MEK1 R4F kinase on a Glutathione Agarose 4B chromatography column equilibrated with wash buffer at a slow flow rate of 0.3–0.5 ml/min.
5. Rinse the loaded resin with wash buffer until the baseline at 280 nm is stabilized.
6. Collect the GST-MEK1 R4F protein into elution buffer by 1 ml aliquots.
7. Analyze aliquots by SDS-PAGE to choose the fractions to pool. The pooled fractions (Fig. 4b) correspond to about 6 ml at 1 mg/ml.
8. Dialyze GST-MEK1 R4F protein against the activation buffer or the conservation buffer.
9. Concentrate GST-MEK1 R4F protein in activation buffer up to 3 mg/ml using centrifugal devices to be used in His-ERK2 activation step (*see* Subheading 3.7).
10. Freeze dialyzed GST-MEK1 R4F in conservation buffer in liquid nitrogen and keep at –80 °C until further use.

### 3.7 Activation of Recombinant ERK2

1. Mix 1 ml of His-ERK (3 mg/ml, Subheading 3.4) with 1 ml of GST-MEK1 R4F (3 mg/ml, Subheading 3.6) in activation buffer in the presence of 5 mM ATP and protease inhibitors cocktail 1× in a 5 ml reaction volume, in 15 ml plastic tubes [20].
2. Perform the activation at 30 °C during 15 h.
3. If His-ERK or GST-MEK1 R4F is frozen in conservation buffer, dialyze the kinase solution against activation buffer. Concentrate the kinases with a centrifugal device for further reaction if needed.
4. Remove 5 µl from the reaction mixture at various time points for SDS-PAGE analysis to control the progress of the reaction. A slight delay of His-ERK2 migration is observed from 30 min of incubation. The amount of soluble His-ERK2 is decreasing during the incubation due to protein precipitation (Fig. 5a). Remove the insoluble material by centrifugation.
5. Remove GST-MEK1 R4F from the reaction mixture by using 500 µl Glutathione Agarose 4B beads equilibrated in activation buffer. Incubate the beads on a roller mixer with slow agitation (rotation of 20 rpm/min) for 1 h at 4 °C with the activation mix and finally eliminate resin beads by centrifugation at 1000×g for 10 min. The final activated His-ERK is obtained at 0.1–0.15 mg/ml (2.5–4.0 µM) in 5 ml of reaction volume.
6. Add 10% Glycerol to the activated His-ERK2 in activation buffer.
7. Freeze aliquots of 100 µl in liquid nitrogen and conserve at –80 °C until further use.

### 3.8 Phosphorylation of Tau Protein by ERK2 Recombinant Kinase

1. Mix 100 µM recombinant <sup>15</sup>N-Tau protein (1 mg lyophilized protein, Subheading 3.2) with 50 µl activated ERK2 (4 µM in activation buffer, Subheading 3.7, final concentration 1 µM, see Note 12) in the presence of 2.5 mM ATP, 1 mM DTT, and



**Fig. 5** (a) Time course of His-ERK2 *in vitro* activation by GST-MEK1R4F. 5 µl of samples is removed from the reaction mix at initial time, 30 min, 180 min, and at 16 h (*overnight*) incubation time. From 30 min of incubation, a slight migration delay of the band corresponding to His-ERK2 is observed compared to that at the initial time. The band upper shift increases until the end of reaction. The amount of soluble His-ERK2 decreases with the incubation time due to precipitation. (b) SDS-PAGE analysis of Tau phosphorylation. About 1.2 µg samples is loaded in 12% acrylamide gel. Compared to Tau control (see line 1), ERK2-phosphorylated Tau has a lower mobility resulting in a shift of the band from 52 kDa to 60 kDa (line 2) and phosphorylated Tau by rat brain extract a shift to 66 kDa (line 3)

1 mM EGTA complemented with protease inhibitors in a total sample volume of 200  $\mu$ l in the phosphorylation buffer 1 $\times$ .

2. Incubate the sample at 37 °C for 3 h. For the  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Tau protein, the reaction is scaled up to 5 mg lyophilized protein in 1 ml reaction mix.
3. After incubation, heat the samples at 75 °C for 15 min and centrifuge at 20,000  $\times g$  for 15 min to remove the ERK kinase.
4. Desalt the phosphorylated  $^{15}\text{N}$ -Tau or  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Tau (Fig. 5b) into NMR buffer and conserve at -20 °C.
5. For NMR spectroscopy analysis, complement the samples with 1 mM trimethylsilyl propionate (TMSP, which serves as internal reference), 2 mM DTT, and 10%  $\text{D}_2\text{O}$  for the purpose of NMR spectrometer field locking.

### 3.9 Preparation of Rat Brain Extract

1. Wash the rat brain (about 1.8 g) immediately after collection in an ice-cold homogenizing buffer.
2. Cut the brain crudely into pieces with dissection scissors and place in a homogenizing buffer (2.5 ml/g of brain).
3. Prepare the rat brain extract by homogenizing the brain using a Potter pestle fitted on a tissue grinder and a 10 ml glass tube.
4. Perform ultracentrifugation at 100,000  $\times g$  for 1 h in a type 50 Ti rotor. The supernatant corresponds to the rat brain extract (*see* Note 13).

### 3.10 Phosphorylation of Tau Protein with Rat Brain Extract

1. Mix 4  $\mu\text{M}$  recombinant  $^{15}\text{N}$ -labeled Tau protein (around 1 mg protein in 5 ml of total volume) with 500  $\mu\text{l}$  fresh rat brain extract in a final 5 ml reaction volume of HMED 1 $\times$  buffer. Add 1  $\mu\text{M}$  okadaic acid (phosphatase inhibitor), 2 mM ATP, and protease inhibitors 1 $\times$ .
2. Incubate the phosphorylation mix for 24 h at 37 °C.
3. Inactivate enzymes in the sample by heating at 75 °C for 15 min.
4. Centrifuge the sample at 16,000  $\times g$  for 15 min to remove out precipitated proteins.
5. Perform buffer exchange into the lyophilization buffer using a PD-10 column (G25 resin). Load 2.5 ml of the inactivated reaction mix on the column. Repeat operation to desalt the total reaction volume. The desalted sample is obtained in a final volume of 7 ml.
6. Lyophilize the phosphorylated Tau (Fig. 5b) and conserve at -20 °C.
7. To analyze by NMR spectroscopy, dissolve the lyophilized sample in 200  $\mu\text{l}$  NMR buffer complemented with 2 mM DTT, 1 mM TMSP, and 10%  $\text{D}_2\text{O}$ .

### **3.11 Production of Recombinant GST-CBP Acetyltransferase**

#### *3.11.1 Day 1: Bacterial Transformation*

Bacterial fermentations have to be performed following the best practices of sterile manipulations.

1. Transform the pGEX plasmid containing the cDNA sequence of recombinant CBP[1202-1848] fragment of mouse CBP acetyltransferase into BL21(DE3) competent bacterial cells based on chemical transformation following the same procedure as described in Subheading 3.1.1 except that plates used for colony selection are additionally supplemented with 1% glucose.

#### *3.11.2 Day 2: Bacterial Growth*

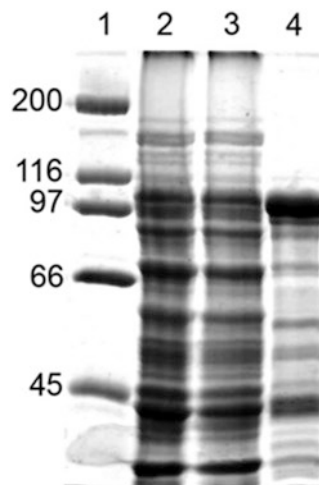
1. Start a small scale bacterial culture of 20 ml with few colonies from the selection plate as inoculum in LB medium supplemented with 1% glucose and 100 µg/ml of ampicillin to reach saturation corresponding to an approximate OD<sub>600</sub> of 4.0.

#### *3.11.3 Day 3: Induction Phase*

1. Centrifuge the bacterial culture at 4000 × *g* for 15 min and discard supernatant.
2. Start 2 L of BL21(DE3) bacterial culture in LB medium supplemented by 1% glucose and 100 µg/ml ampicillin antibiotics by suspending the bacterial pellet from the 20 ml culture to the fresh medium. Perform the culture in 2 L Erlenmeyer culture plastic baffled flask placed in an incubator at 37 °C and shake at 200 rpm.
3. Check growth by measuring the OD at 600 nm of an aliquot of 1 ml of the culture.
4. When bacterial culture arrives at 0.8–1.0 of OD<sub>600</sub>, induce the protein production by the addition of 200 µM IPTG.
5. Continue the bacterial culture for 4 h at 18 °C and 200 rpm.
6. Collect bacterial pellet by centrifugation for 20 min at 6000 × *g* in 1 L-bottles.
7. Suspend the bacterial pellet in 100 ml of PBS buffer, aliquot into four 50 ml-plastic tubes, and centrifuge at 4000 × *g*.
8. Remove the supernatant and freeze the pellets at –20 °C until further use. For prolonged storage (superior to 6 months), freeze the pellet at –80 °C.

### **3.12 Purification of Recombinant GST-CBP Acetyltransferase**

1. Unfreeze one bacterial pellet on ice (equivalent to a 0.5 L bacterial culture), then suspend thoroughly in a 20 ml extraction buffer.
2. Homogenize and lysate the suspension using a high-pressure homogenizer.
3. Remove the insoluble material by centrifugation at 25,000 × *g* for 30 min at 4 °C.



**Fig. 6** SDS-10% PAGE of the purification of GST-CBP[1202-1848] acetyltransferase on glutathione sepharose beads. Lane 1: molecular weight markers; lane 2: 5  $\mu$ l of the soluble bacterial extract; lane 3: 7.5  $\mu$ l of the pooled flow through and first wash supernatant; lane 4: 15  $\mu$ l of the final glutathione beads slurry

4. Incubate the soluble bacterial lysate containing the recombinant GST-CBP[1202-1848] acetyltransferase (Fig. 6) for 3 h at 4  $^{\circ}$ C on a roller mixer with Glutathione Sepharose resin beads pre-equilibrated in the extraction buffer.
5. Rinse the loaded resin five times with 12 ml of wash buffer then five times with 12 ml of conservation buffer. The beads are kept as 50% slurry in conservation buffer at  $-20^{\circ}$  C until further use (*see* Note 14). An aliquot of 15  $\mu$ l is analyzed by SDS-PAGE.

### 3.13 Standard Analysis of CBP Acetyltransferase Activity on a Peptide Substrate

A peptide from the human Thymine DNA Glycosylase (TDG) is used as a substrate to check the activity of every new batch of CBP enzyme. The peptide sequence is Ac-QPVEPKKPVESKKSGKSAKSKEKQ-NH<sub>2</sub> (Ac and NH<sub>2</sub> mean that the N- and C-terminus are acetylated and amidated, respectively). The underlined residues in the peptide sequence correspond to three acetylation sites that have been previously identified [21].

1. For the acetylation reaction, mix 2.5  $\mu$ l of the peptide solution at 10 mM (final concentration of 100  $\mu$ M) with 25  $\mu$ l of the stock solution of AcCoA at 20 mM (final concentration of 2 mM) or 25  $\mu$ l of acetylation buffer as a control in 212.5  $\mu$ l of acetylation buffer. Add 10  $\mu$ l of the slurry of GST-CBP on glutathione beads (for a final volume of 250  $\mu$ l).
2. Incubate the reactions overnight either at 20  $^{\circ}$ C or at 30  $^{\circ}$ C under rotative agitation.

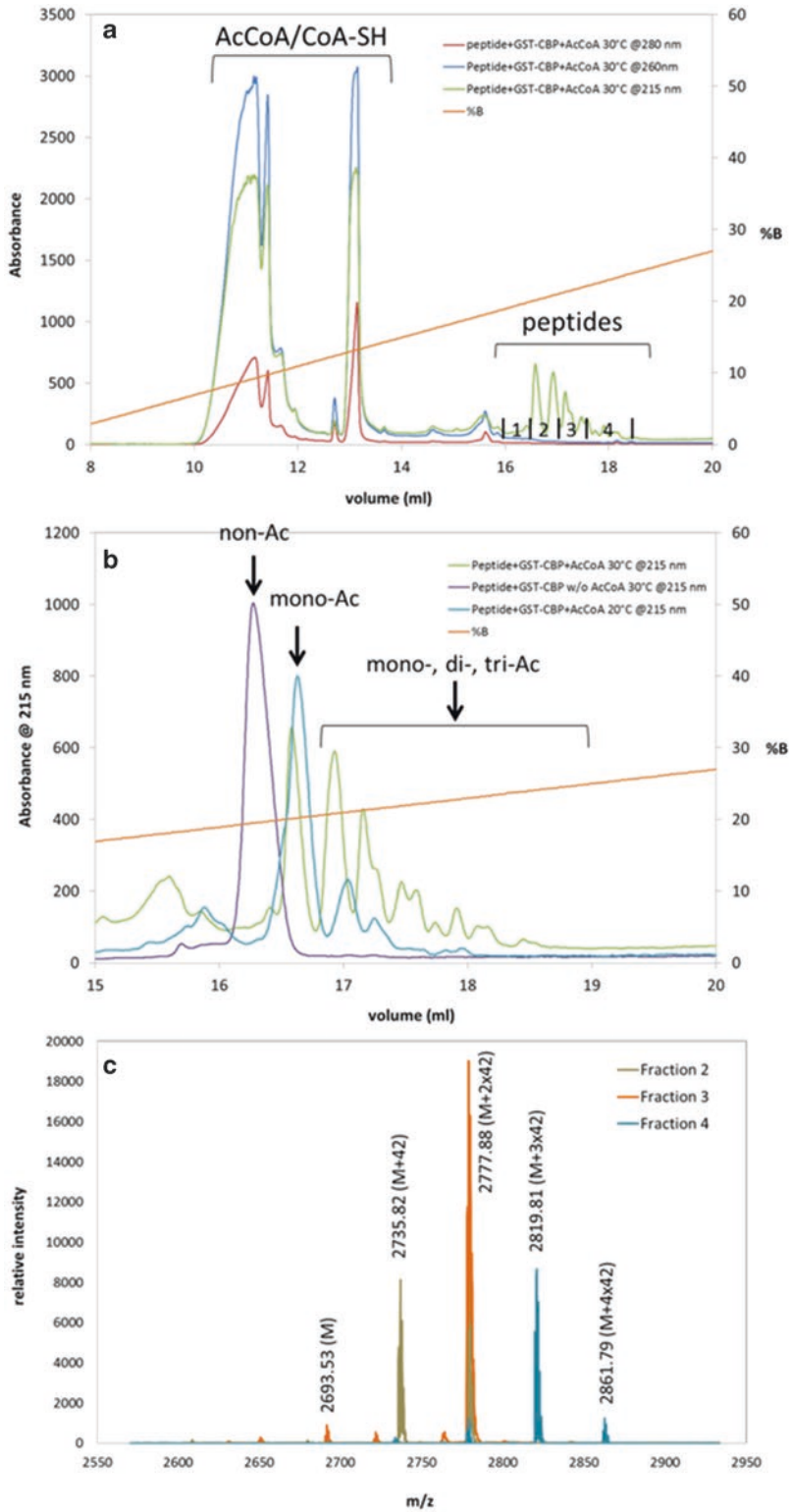
3. Centrifuge the reaction mixtures at  $16,000 \times g$  for 10 min at 4 °C and analyze each supernatant by reverse-phase chromatography on a C18 column at room temperature. Equilibrate the column at 1 ml/min in buffer A until the absorbance and conductivity are stable. Inject the total reaction volume (250  $\mu$ l) in a 1 ml injection loop for 4 ml. Then, wash the column at 1 ml/min with 2.5 ml of Buffer A. Elute peptides with a linear gradient of acetonitrile from 0% to 60% buffer B in 30 min at 1 ml/min (Fig. 7).
4. Collect fractions of 0.5 ml for MALDI-TOF mass spectrometry analysis. Mass increments of +42 Da ( $[M+H]^+$  2735.82 Da), +84 Da ( $[M+H]^+$  2777.88 Da), and +126 Da ( $[M+H]^+$  2819.81 Da) as compared to the mass of the unmodified peptide ( $[M+H]^+$  2693.53 Da) confirm the incorporation of one, two, or three acetyl moieties, respectively (Fig. 7, *see Note 15*).

### 3.14 Acetylation of Tau Protein by CBP

Perform acetylation of  $^{15}\text{N}$ - or  $^{15}\text{N}$ -Lysine,  $^{13}\text{C}$ -labeled Tau protein with minor modifications of the conditions described for the TDG peptide (Subheading 3.13).

1. Weigh 17.6 mg AcCoA and dissolve in 5 ml acetylation buffer to obtain a final concentration of 4 mM.
2. Filter the solution on a 0.22  $\mu$ -filter; this solution is sufficient for four acetylation reactions.
3. Dissolve 5 mg of Tau protein in 1.09 ml of AcCoA-containing acetylation buffer (final concentration of 100  $\mu$ M). For the negative control, omit AcCoA and dissolve directly Tau protein in acetylation buffer. Add 100  $\mu$ l of GST-CBP glutathione beads slurry per ml of reaction volume.
4. Incubate the acetylation reaction at 25 °C overnight (16 h) under rotative agitation.
5. Centrifuge the reaction mixture at  $4000 \times g$  for 5 min at 4 °C.

**Fig. 7** Reverse-phase analysis on a C18 column of the acetylation reactions on a peptide substrate with recombinant GST-CBP[1202-1848]. Due to the presence of at least three acetylation sites, a complex pattern of elution was detected at 215 nm at both 20 °C and 30 °C. **(a)** Absorbance at 280 nm (*red*), 260 nm (*blue*), and 215 nm (*green*) of the acetylation reaction performed with 2 mM AcCoA at 30 °C overnight. **(b)** Comparison of the absorbance detected at 215 nm of the acetylation reactions performed with (*green*) or without AcCoA (*violet*) at 30 °C overnight or with AcCoA at 20 °C overnight (*blue*). The linear gradient of buffer B (%B) is indicated by *orange line*. **(c)** MALDI-TOF mass spectra of the fractions 2, 3, and 4 of the analytical C18 chromatography (*see the fractions on panel a*); *m/z* values of  $[M+H]^+$  species are annotated. The “M” character indicates the mass of the unmodified peptide

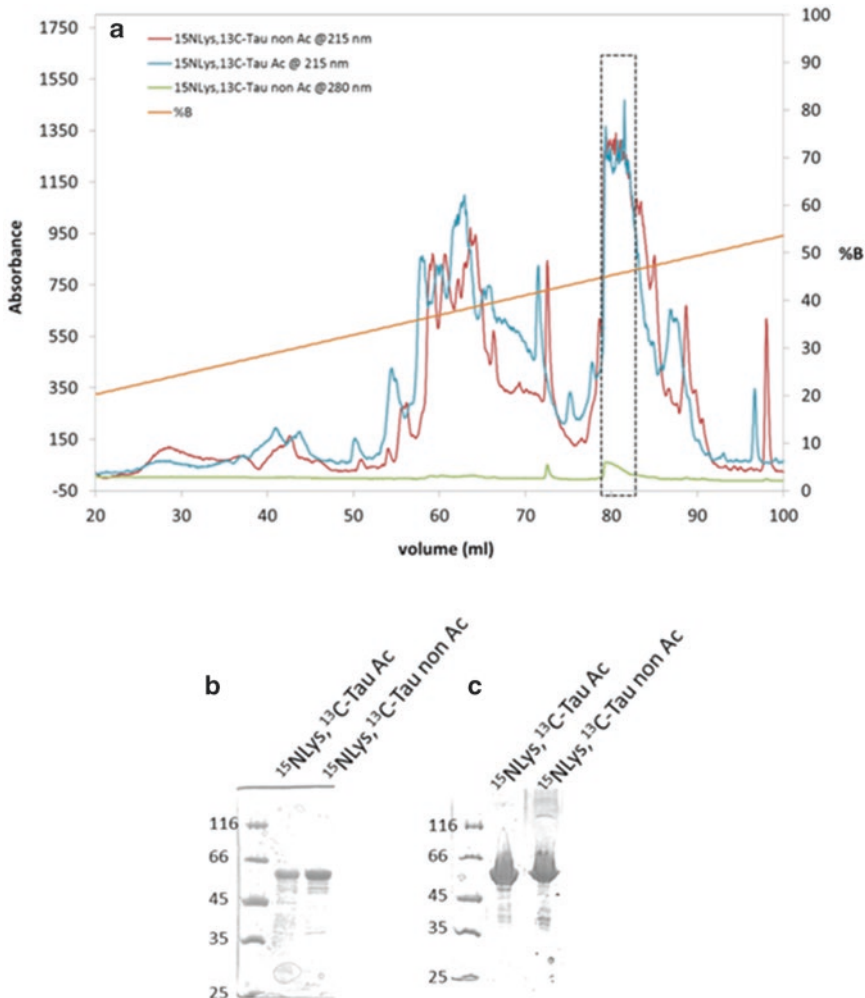


6. Withdraw the supernatant cautiously and wash resin beads twice with 0.2 ml acetylation buffer.
7. Pool the supernatants and heat at 75 °C for 10 min followed by a centrifugation at 4000 × *g* for 15 min at 4 °C to remove potential contaminant proteins that might have leaked from glutathione beads.
8. Purify the acetylation and control reactions by reverse-phase chromatography on a C8 semi-preparative column at room temperature. Equilibrate the column at 4 ml/min in 20% buffer B until the absorbance and conductivity are stable. Inject the protein solution (1.5 ml) in a 2 ml injection loop for 20 ml, elute proteins with a linear gradient of acetonitrile from 20% to 60% buffer B in 24 min at 4 ml/min (Fig. 8). Collect 4 ml-fractions.
9. Lyophilize the collected fractions and dissolve in 200 μl of lyophilization buffer for SDS PAGE analysis on 10% acrylamide gels.
10. Desalt homogeneous fractions containing a high concentration of full-length protein in lyophilization buffer on a HiPrep 26/10 desalting column (Fig. 9), as described in Subheading 3.2, step 6.
11. Lyophilize the protein fraction and store at -20 °C until further use.

### **3.15 Assignment of Resonances of the Phosphorylated Residues: Identification of the Phosphorylation Pattern**

A [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N] HSQC 2D spectrum is recorded to detect the resonances of the phosphorylated S and T residues (*see Note 16*), because they are easily visualized, located around 8.5–9.5 ppm of amide proton and 117–125 ppm of <sup>15</sup>N-amide, outside the bulk of the <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N correlations (Fig. 10). As shown in Fig. 11, phospho-residue resonance assignment is based on [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C] HNCACB 3D experiment that is recorded to link the resonances of the phosphorylated residues observed in the 2D [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N] HSQC spectrum to a specific pS or pT residue in the Tau sequence. CA and CB chemical shift values of pS and pT are typical [22] and allow the identification of the nature of the phosphorylated *i* residue. pS and pT followed by a proline residue also in addition have a typical +2 ppm shift of the CA chemical shift value [23]. The nature of the residue at the *i*-1 position is defined by the chemical shift values of the CA and CB resonances corresponding to the *i*-1 residue (weaker set of signals compared to those of the *i* residue). A few identical phosphorylated patterns possess the same residue at position *i*-1 and cannot be uniquely identified from the HNCACB experiment alone, as is the case for K-pT175-P and K-pT181-P. Another 3D experiment lifts the redundancy by providing, in addition, the chemical shift value of <sup>15</sup>N of the *i*-1 residue. For example, the resonances corresponding to pT175 and pT181 can be successfully assigned due to the

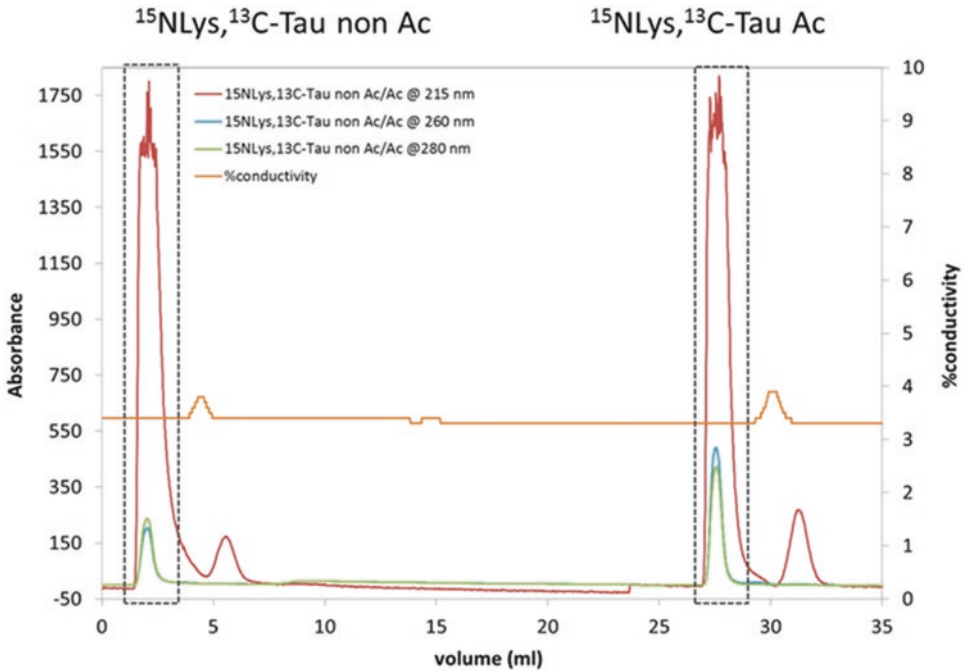




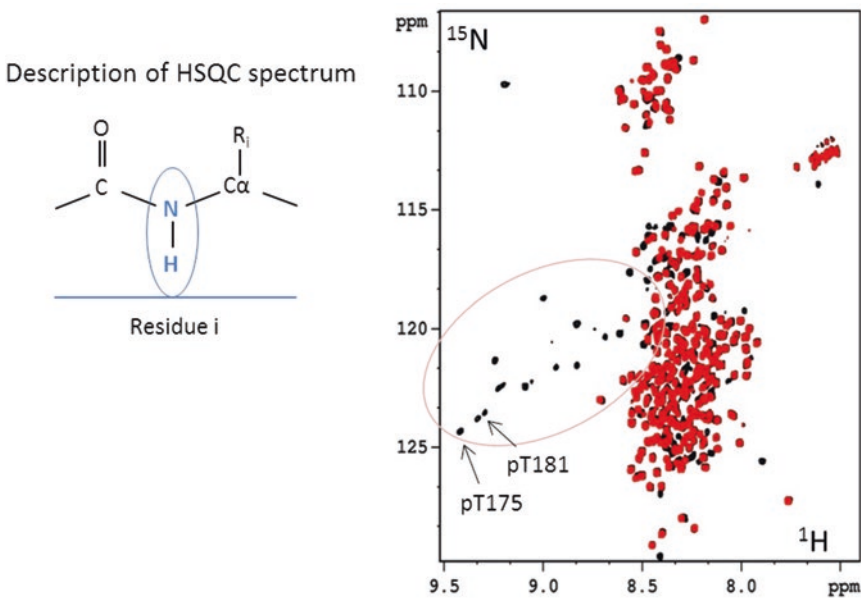
**Fig. 8** Reverse-phase purification on a C8 column of the  $^{15}\text{N}$ -Lys,  $^{13}\text{C}$ -labeled Tau protein before and after acetylation reaction with recombinant GST-CBP[1202-1848]. **(a)** Chromatogram of the purification of control and acetylated  $^{15}\text{N}$ -Lys,  $^{13}\text{C}$ -labeled-Tau on a C8 column with a linear gradient of acetonitrile (orange line) as monitored by the absorbance at 215 nm for control  $^{15}\text{N}$ -Lys,  $^{13}\text{C}$ -Tau (red curve) and acetylated  $^{15}\text{N}$ -Lys,  $^{13}\text{C}$ -Tau (blue curve) and at 280 nm (green curve, control  $^{15}\text{N}$ -Lys,  $^{13}\text{C}$ -Tau). **(b, c)** 12% acrylamide SDS gel electrophoresis of the  $^{15}\text{N}$ -Lys,  $^{13}\text{C}$ -Tau protein before and after the acetylation reaction **(b)** Fractions of non-acetylated and acetylated  $^{15}\text{N}$ -Lys,  $^{13}\text{C}$ -Tau proteins purified by cation exchange chromatography. 2  $\mu\text{l}$  of a 50  $\mu\text{M}$  solution of protein are loaded on the gel. **(c)** Fractions of non-acetylated and acetylated  $^{15}\text{N}$ -Lys,  $^{13}\text{C}$ -Tau proteins purified by reverse-phase chromatography. Only the fractions corresponding to the boxed region on the chromatograms in **(a)** are shown. 2.5  $\mu\text{l}$  of the lyophilized fractions dissolved in 200  $\mu\text{l}$  water is loaded on the gel

different values of  $^{15}\text{N}$  chemical shift observed for A-K174 and L-K180 (Figs. 11 and 12).

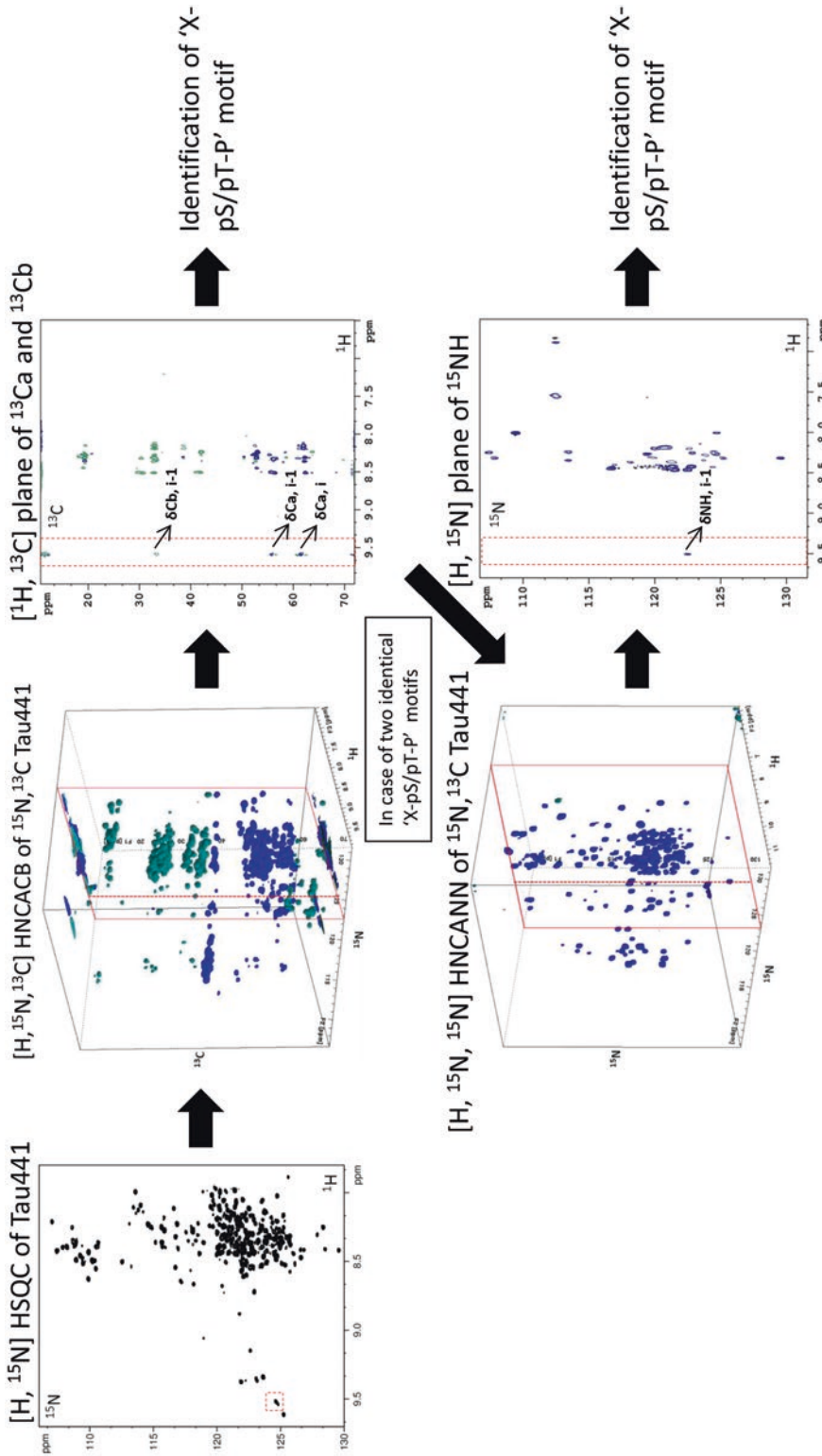
1. Dissolve 0.5–1 mg of  $^{15}\text{N}$ -Tau in 200  $\mu\text{l}$  NMR buffer (50–100  $\mu\text{M}$ ) to fill a 3 mm tube.



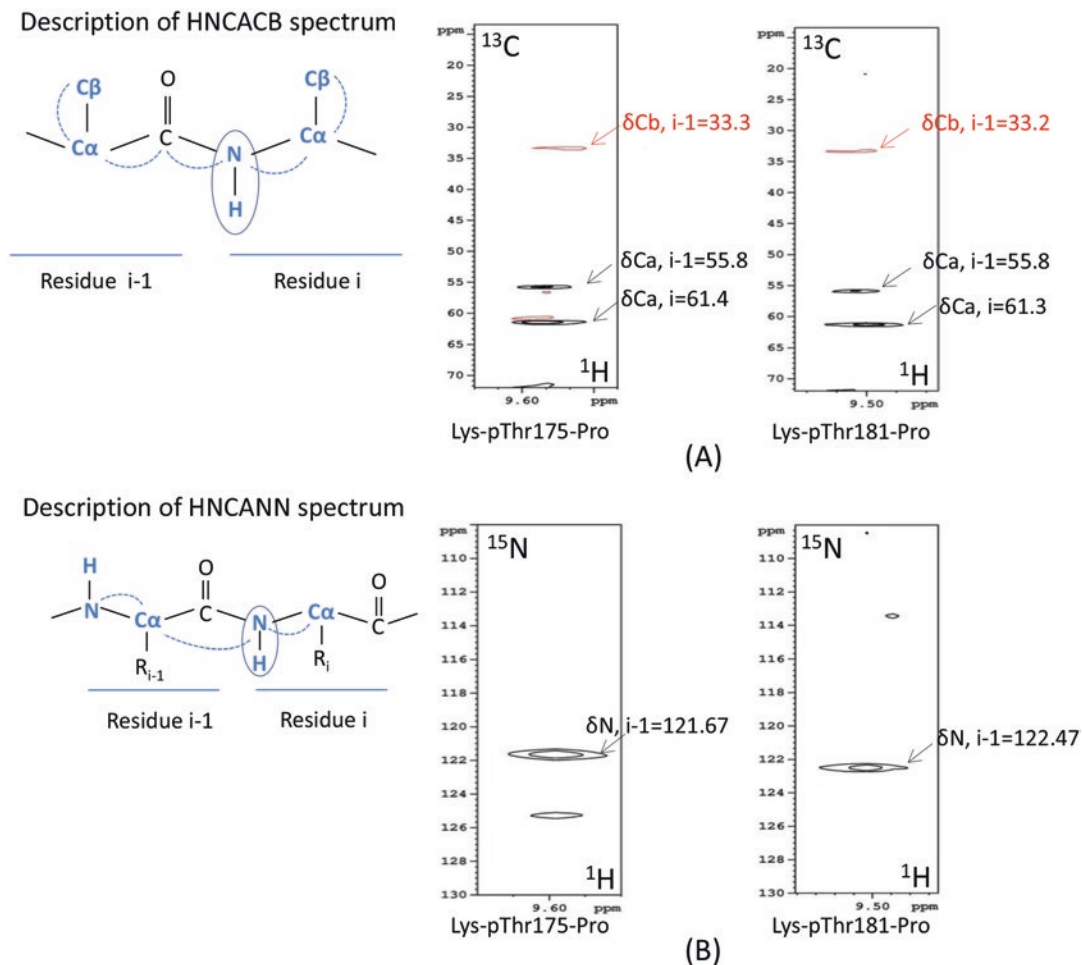
**Fig. 9** Chromatogram of desalting in 50 mM ammonium bicarbonate of the  $^{15}\text{N}$ -lysine,  $^{13}\text{C}$ -Tau protein in its non-acetylated and acetylated forms from fractions of the purification step by C8 reverse-phase chromatography



**Fig. 10** Overlaid 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$  phosphorylated Tau in *black* with  $^{15}\text{N}$ -Tau in *red*. HSQC spectrum records the J-coupling (through-bound magnetization transfer) correlation between  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$ -nuclei. Each resonance thus corresponds to an amino acid of the protein backbone. The encircled multiple additional resonances in the black spectrum, compared to the red control spectrum of  $^{15}\text{N}$ -Tau, correspond to phosphorylated residues of the Tau protein according to previous NMR studies of Tau protein [8] review in [11]



**Fig. 11** Strategy of identification of X-ps/pT-P motifs in Tau protein. Chemical shifts of CA and CB of i and i-1 residues in  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]$  HNCACB 3D experiment and chemical shift of  $^{15}\text{N}$  of the i-1 residues in  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^{15}\text{N}]$  HNCANN 3D experiment are used to assign a resonance in the  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$  2D spectrum to a specific pS-P or pT-P motif in Tau sequence



**Fig. 12 (a)** [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] 2D planes extracted from the [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] HNCACB 3D spectrum, at  $^{15}\text{N}$ -values of 125.24 ppm (*left*) and 124.76 ppm (*right*). The  $^{13}\text{C}$ -CA resonances (in *black*) in side chain of pT175 (*left panel*) and pT181 (*right panel*) are indicated.  $^{13}\text{C}$ -CB resonances for these residues are outside the spectrum window (74 ppm). This combination of CA and CB chemical shift values is typical of a pT-P dipeptide. The weaker set of signals (indicated by *arrows*) corresponds to  $^{13}\text{C}$ -CA (in *black*) and  $^{13}\text{C}$ -CB resonances (in *red*) of the prior residue. Because for both pT-P dipeptide the *i*-1 residue shows chemical shift values typical of a lysine residue (CA is 55.8 ppm, CB is 33.3 ppm), these resonances cannot be uniquely identified among the 9 pT-P motifs of Tau. **(b)** [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] 2D planes extracted from the [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HNCANN 3D spectrum, at  $^{15}\text{N}$ -values of 125.24 ppm (*left*) and 124.76 ppm (*right*). The  $^{15}\text{N}$ -resonance in the third dimension represents the chemical shifts of the  $^{15}\text{N}$  of the amide group of the K residue at position *i*-1. From the previously determined assignment of Tau [26–28], we could distinguish  $\delta\text{N}(\text{i-1})\text{K174} = 121.67$  ppm and  $\delta\text{N}(\text{i-1})\text{K180} = 122.47$  ppm, which allow discriminating the resonance of pT175 of pT181

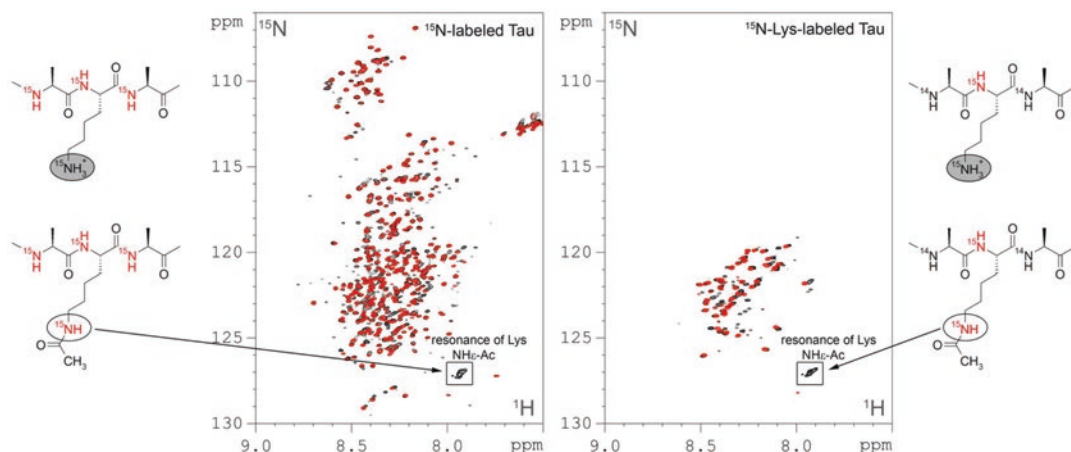
- Record a [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC 2D spectrum (hsqcetf3gpsi pulse sequence from Bruker, *see Note 17*) [24] (Fig. 10) at 293 K or 298 K on a Bruker900MHz Avance III NMR spectrometer equipped with a triple resonance cryogenic probehead (Bruker, Karlsruhe, Germany) or equivalent spectrometer,

with 3072 and 416 points for 14 and 25 ppm in the  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  dimensions, respectively. The relaxation delay is 1 s. The duration of the acquisition with 64 scans is 9 h.

3. Process the spectra with the Bruker TopSpin 3.1 software.
4. Dissolve 4 mg of  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Tau in 400  $\mu\text{l}$  NMR buffer (200  $\mu\text{M}$ ) to fill a NMR Shigemi tube.
5. Record a [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] HNCACB 3D spectrum (pulse sequence hncacbgpwg3d from Bruker, *see* **Note 18**) at 298 K on a Bruker900MHz Avance III NMR spectrometer equipped with a triple resonance cryogenic probehead (Bruker, Karlsruhe, Germany) or equivalent spectrometer, with 2048, 256, 72 points for 14, 25, 61 ppm centered on 4.7, 119, 41 ppm in the  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ , and  $^{13}\text{C}$  dimensions, respectively. The relaxation delay is 1 s. The duration of the acquisition with 16 scans is 4 days and 6 h. This experiment allows for recording the chemical shift values of CA and CB  $^{13}\text{C}$  nuclei of the *i* and *i*-1 residues for each [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] resonance.
6. Process the spectra with the Bruker TopSpin 3.1 software.
7. Extract [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] 2D planes from the [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] HNCACB 3D experiment (Fig. 12a) for each peak in the [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC. Make data analysis, peak picking and calculation of peak volumes with Sparky 3.114 software (T. D. Goddard and D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco).
8. Record an additional [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HNCANN 3D experiment (hncannhgpwg3d pulse sequence from Bruker, *see* **Note 19**) [25] to distinguish redundant phosphorylation patterns. Perform data acquisition on the same  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Tau sample in the same conditions as described in Subheading 3.15, **step 5** with 3072, 100, 100 points for 14, 21, 21 ppm centered on 4.7, 118.5, 118.5 ppm in the  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ , and  $^{15}\text{N}$  dimensions, respectively. The duration of the acquisition with 16 scans is 1 day and 22 h.
9. Extract [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] 2D planes from the [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HNCANN 3D experiment (Fig. 12b) for each ambiguous peak in the [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC (i.e., peaks that cannot be assigned with the HNCACB experiment only).  $^{15}\text{N}$ -chemical shift values in the third dimension of the recorded spectrum correspond to the  $^{15}\text{N}$  chemical shift of the residue at the *i*, *i*+1, and *i*-1 positions.

### **3.16 Assignment of Resonances of Acetylated Residues: Identification of the Acetylation Pattern**

The identification of acetylation sites involves the use of selective  $^{15}\text{N}$ -lysine labeling of Tau samples to decrease the spectral complexity. The assignment of lysine residues in the non-acetylated Tau sample is made using the previously described [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC, HNCACB, and HNCANN experiments (*see* Subheading 3.15) recorded on uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled Tau. These experiments are combined with a [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC recorded on a



**Fig. 13** Comparison of the  $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$  HSQC spectra of the non-acetylated (*red*) and acetylated (*black*) forms of uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled Tau (*left spectra*) and selectively  $^{15}\text{N}$ -lysine labeled Tau (*right spectra*)

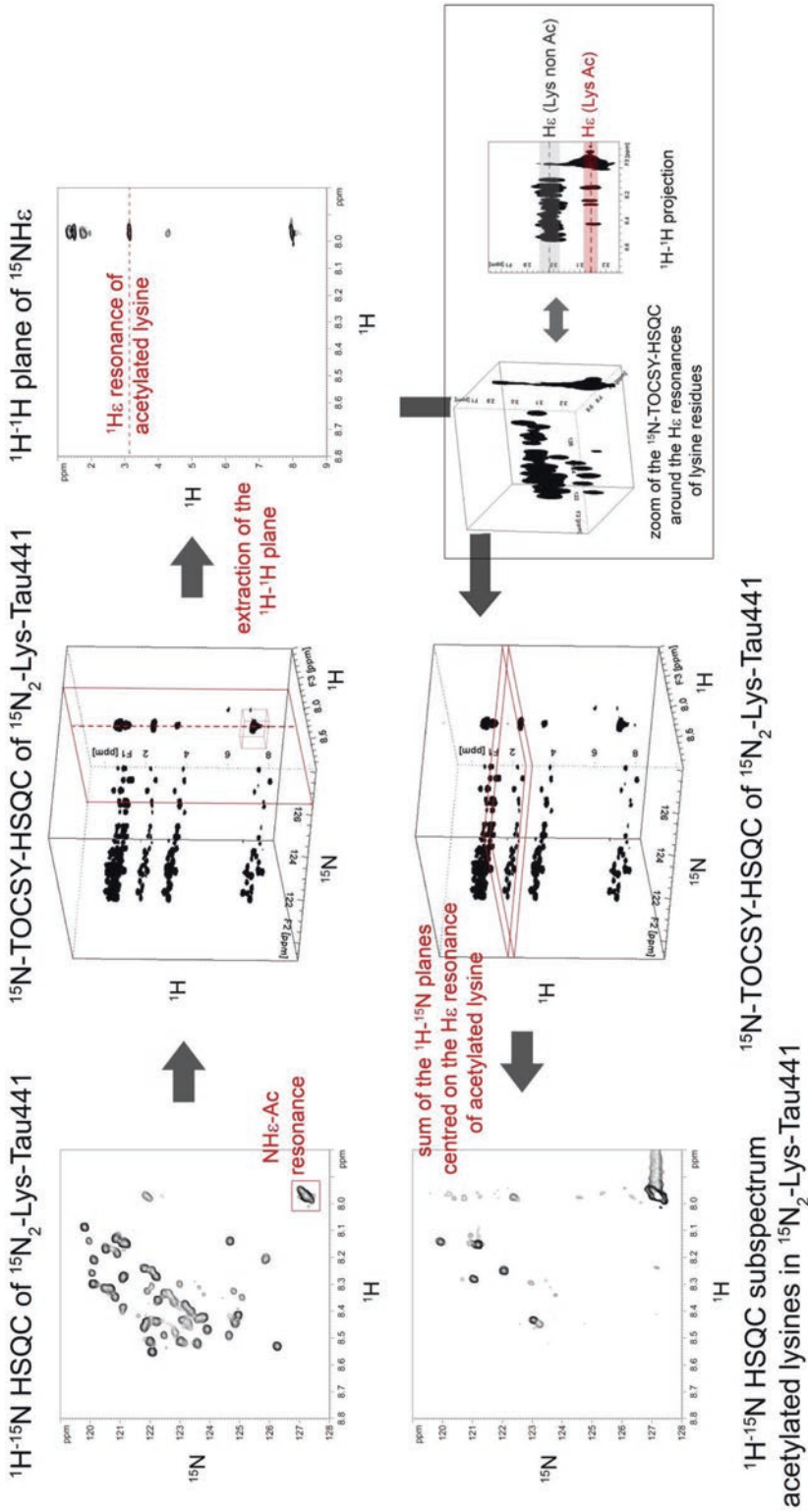
selectively  $^{15}\text{N}$ -lysine-labeled Tau sample for an easy identification of lysine resonances.

On the  $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$  HSQC of the  $^{15}\text{N}$ -lysine labeled, acetylated Tau sample, one can detect some additional backbone amide resonances as compared to the control, non-acetylated Tau together with non-resolved peaks corresponding to the NH $\epsilon$  acetamide functions of lysine side chains that are referred to as the indicator signal (Fig. 13, *see Note 20*) [11, 12]. Hence, identification of resonances corresponding to acetylated lysine residues is first required before their assignment. The resonances of acetylated lysine residues are identified in a selectively  $^{15}\text{N}$ -lysine, uniformly  $^{13}\text{C}$  labeled, acetylated Tau sample using the  $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$  HSQC-TOCSY experiment that enables the detection of proton resonances of the lysine side chain from either the backbone amide resonance or those of side chain acetamide (NH $\epsilon$ -Ac, Fig. 14). Lysine assignment is then performed with the  $[^1\text{H},^{15}\text{N},^{13}\text{C}]$  HN(CO)CACB experiment for the identification of the *i*-1 residue (Fig. 15).

1. Dissolve 1–2 mg of either uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled or selectively  $^{15}\text{N}$ -lysine-labeled Tau in 200  $\mu\text{l}$  NMR buffer (100–200  $\mu\text{M}$ ) to fill a 3 mm tube.
2. Record a  $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$  HSQC 2D spectrum (dipsihsqcf3gpsi3d pulse sequence from Bruker, *see Note 17*) [24] (Fig. 13) at 293 K on a Bruker900MHz Avance III NMR spectrometer equipped with a triple resonance cryogenic probehead (Bruker, Karlsruhe, Germany) or equivalent spectrometer.
3. For the uniformly labeled sample, acquire data with 2048 and 512 points for spectral widths of 14 and 30 ppm in the  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$ -dimensions, respectively, centered on 4.7 ppm and

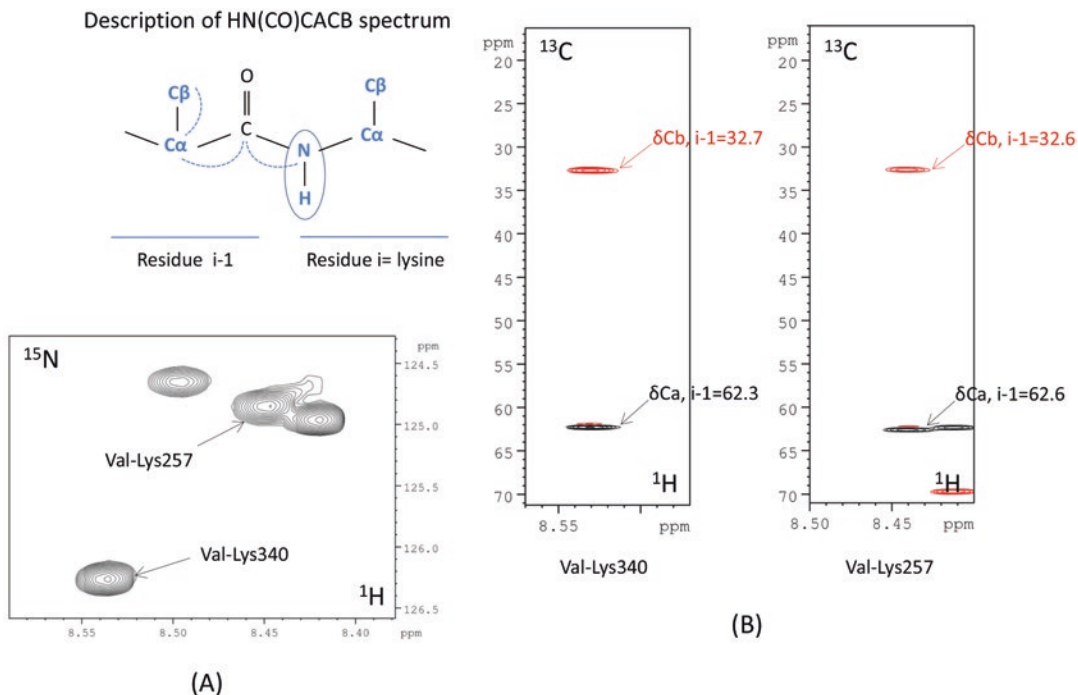
118.4 ppm. The duration of the acquisition with 32 scans is 5 h 15 min. For the selectively  $^{15}\text{N}$ -lysine-labeled sample, acquire data with 2048 and 128 points for spectral widths of 14 and 9 ppm centered on 4.7 ppm and 123.5 ppm in the  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$ -dimensions, respectively. The relaxation delay is 1 s. The duration of the acquisition with 32 scans is 80 min.

4. Process the spectra with the Bruker TopSpin 3.1 software.
5. Dissolve 11 mg of a  $^{15}\text{N}$ -lysine selectively,  $^{13}\text{C}$  uniformly labeled, acetylated Tau sample in 400  $\mu\text{l}$  NMR buffer (600  $\mu\text{M}$ ) to fill a NMR Shigemi tube.
6. Acquire the three-dimensional spectra under a nonuniform sampling mode on a Bruker900MHz Avance III NMR spectrometer equipped with a triple resonance cryogenic probehead (Bruker, Karlsruhe, Germany) at 293 K.
7. Perform data processing, peak picking and calculation of peak intensities with the Bruker TopSpin 3.1 software.
8. Record a [ $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ] HSQC-TOCSY spectrum (dipsihsqcf3gpsi3d pulse sequence from Bruker, *see* **Note 21**) with 32 scans per increment, a TOCSY mixing time of 120 ms and spectral widths of 16.0, 9.0, and 11.0 ppm in  $^1\text{H}$  (F3),  $^{15}\text{N}$  (F2), and  $^1\text{H}$  (F1) dimensions that are sampled with 3072, 78, and 416 points, respectively. The proton and nitrogen dimensions are centered on 4.7 and 123.5 ppm, respectively. The relaxation delay is 1 s. The nonuniform sampling is done with 25 % sparse sampling, 2028 hypercomplex points in indirect dimension, T2 relaxation times of 0.3 s in each  $^1\text{H}$  dimension, and 0.25 s in  $^{15}\text{N}$  dimension. The duration of the acquisition is about 3 days and 21 h.
9. Extract [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ] 2D planes from the [ $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ] HSQC-TOCSY 3days experiment for each peak in the [ $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ] HSQC.
10. Measure the chemical shift values of  $^1\text{H}$  nuclei of lysine side chain, especially the  $\text{H}_\alpha$  chemical shifts. This latter value allows for discrimination of acetylated lysines from the non-acetylated ones (Fig. 14).
11. Extract [ $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ] 2D planes from the [ $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ] HSQC-TOCSY 3D experiment at 2.98 ppm and 3.14 ppm in the F1 dimension which corresponds to the  $\text{H}_\alpha$  chemical shifts of a non-acetylated and acetylated lysine residue, respectively.
12. Superimpose each of this sub-spectrum to the [ $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ] HSQC of acetylated Tau to discriminate between resonances of non-acetylated and acetylated lysine residues.
13. Record a [ $^1\text{H},^{15}\text{N},^{13}\text{C}$ ] HN(CO)CACB 3D spectrum (hncocacbgpwg3d pulse sequence from Bruker, *see* **Note 22**) at 900 MHz and 293 K with 3072, 40, and 272 points for spectral widths of 14, 9, and 55 ppm in the  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ , and  $^{13}\text{C}$ -dimensions, respectively, centered on 4.7, 123.5, and 39.0 ppm, respec-



**Fig. 14** Strategy of acetylated lysine identification based on the  $\text{H}_\epsilon$  chemical shift of lysine side chain from the  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$  HSQC-TOCSY experiment acquired on  $^{15}\text{N}$ -lysine,  $^{13}\text{C}$ -labeled Tau protein

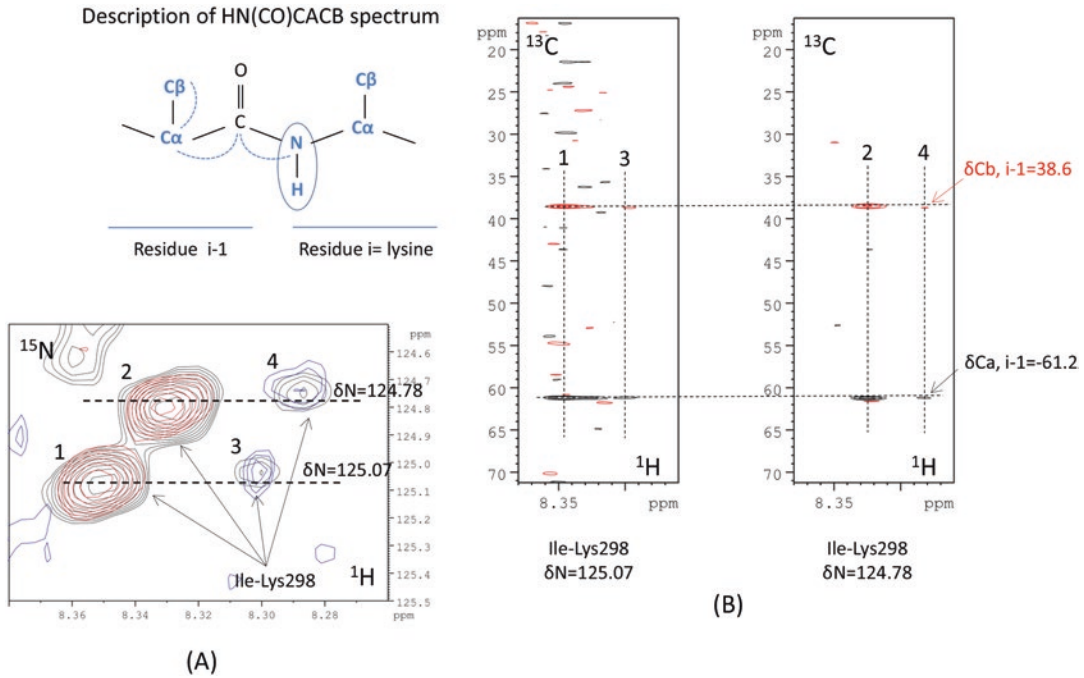




**Fig. 15** Identification of lysine resonances using the  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]$  HN(CO)CACB experiment. **(a)** Zoom of the  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$  HSQC experiment acquired on selectively  $^{15}\text{N}$ -lysine-labeled, acetylated Tau. **(b)**  $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$  2D planes extracted from the  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]$  HN(CO)CACB 3D spectrum, at  $^{15}\text{N}$ -values of 126.25 ppm (*left*) and 124.85 ppm (*right*). The  $^{13}\text{C}$ -CA (*black*) and  $^{13}\text{C}$ -CB resonances (*red*) of *i*-1 residue side chain of K340 (*left panel*) and K257 (*right panel*) are indicated. This combination of CA and CB chemical shift values is typical of a V residue. The unambiguous assignment of both V-K dipeptide has been made with a non-acetylated Tau sample and uniform  $^{15}\text{N}$ -labeling using the previously described  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]$  HNCACB and  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^{15}\text{N}]$  HNCANN three-dimensional experiments (Subheading 3.15)

tively. The relaxation delay is 1 s. The nonuniform sampling is done with 25% sparse sampling, 680 hypercomplex points in indirect dimension, T2 relaxation times of 0.3 s, 1 s, and 0.1 s in  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ , and  $^{13}\text{C}$  dimensions, respectively. The duration of the acquisition with 48 scans is 1 day and 23 h.

14. Extract  $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$  2D planes from the  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]$  HN(CO)CACB 3D experiment for each peak in the  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$  HSQC.
15. Measure the chemical shift values of “CA” and “CB”  $^{13}\text{C}$  nuclei of the *i*-1 residues for each  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$  lysine resonance enabling residue identification (Figs. 15 and 16).
16. To avoid ambiguity related to redundant X-K dipeptides (where X is any amino acid) as illustrated in Fig. 15 with the V-K340/257 dipeptides, this experiment is combined with HNCACB and HNCANN experiments acquired on  $^{15}\text{N}$ -Tau with uniform  $^{15}\text{N}$ -labeling (*see* Subheading 3.15) for full assignment of lysine residues in the control, non-acetylated Tau sample. According to this latter strategy, a full sequential



**Fig. 16** Increasing spectral complexity in the case of two close acetylation sites showing four resonances for the single I-K298 dipeptide (numbered from 1 to 4). (a) Zoom of the  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$  HSQC experiment acquired on selectively  $^{15}\text{N}$ -lysine-labeled, acetylated Tau (black). Sub-spectra of non-acetylated (red) and acetylated (blue) lysine (Subheading 3.16) are overlaid and indicate that resonances 1 and 2 correspond to non-acetylated lysine while resonances 3 and 4 correspond to acetylated lysine. (b)  $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$  2D planes extracted from the  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]$  HN(CO)CACB 3D spectrum at  $^{15}\text{N}$ -values of 125.07 ppm (for resonances 1 and 3) and 124.78 ppm (for resonances 2 and 4). According to the  $^{13}\text{C}$ -CA (black) and  $^{13}\text{C}$ -CB values (red) of the  $i-1$  residue, resonances numbered one to four are all identified as I-K dipeptide that is represented by the sole K298 along the Tau sequence. Hence, the splitting of each of non-acetylated and acetylated K298 resonance is due to the proximity of another acetylation site in the Tau sequence that has been identified as the  $i-4$  residue according to the same assignment strategy

assignment enables the identification of the  $i-1$  residue of X in each X-K dipeptide which is either E in the case of V-K340 or N in the case of V-K257.

17. Spectral complexity due to the presence of close acetylation sites is illustrated in Fig. 16 for the K298 residue. In this case, four resonances are detected for the single I-K dipeptide. Two of them come from a non-acetylated form of K298 and the two remaining from an acetylated K298 based on their respective He value (Fig. 16a), indicating the proximity of another acetylation site (identified as the K294 residue).

## 4 Notes

1. Complete medium and MEM vitamins addition are not compulsory but help to stimulate the growth and improve the

yield. MEM vitamins 100× (SIGMA) are aliquoted by 10 ml and aliquots are stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

2. Upon addition of the 100 mM  $\text{CaCl}_2$  stock a white precipitate will form.
3. The isotopes are added freshly at the time the bacterial culture is started. They are solubilized in M9 buffer and filtered sterilized at  $0.2\ \mu\text{m}$ .
4. To produce  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Tau, 300 mg of  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -complete medium, 1 g of  $^{15}\text{N}$ - $\text{NH}_4\text{Cl}$ , and 2 g of  $^{13}\text{C}$ -glucose are suspended in 10 ml of M9 buffer and are  $0.2\ \mu\text{M}$  filter-sterilized directly into the M9 medium. Glucose is the limiting factor for the bacterial growth and an OD600 of 1.4–1.6 is usually observed at the end of the fermentation.
5. Tau protein is a disordered protein sensitive to proteases. We find that sterilization ( $120^{\circ}\text{C}$  for 20 min) of buffers limits Tau degradation. The buffers are  $0.22\ \mu\text{m}$ -filtered or autoclaved and stored at  $4^{\circ}\text{C}$ .
6. pH is adjusted after addition of 250 mM imidazole in phosphate buffer and 10 mM reduced Glutathione in Tris buffer, in the elution buffers.
7. We do not reconstitute a complete medium from the Isogro® powder, given the cost of the product, but use it as a culture supplement. Generally, bacterial cultures using M9 media supplemented with 0.05% Isogro® (w/v) reach the exponential growth phase (as measured by O.D. at 600 nm) after about 4 h of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  under the conditions described to inoculate the culture. Without Isogro®, the exponential phase of growth is reached after 6 h at  $37^{\circ}\text{C}$ .
8. The bacterial growth is slow in M9 medium. We use programmable incubators to start the culture at an early morning time, so that the protein production, collection of the bacterial pellet, and analytical control of the protein production can be conveniently scheduled during the work day hours.
9. The lyophilized Tau proteins are kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
10. Tau protein concentration is difficult to define because its absorption coefficient at 280 nm is low ( $A_{280\ \text{nm}} = 0.14$  for a solution at 1 mg/ml). To define Tau concentration, we use the surface of the peak of Tau protein absorption at 280 nm in the chromatogram in the desalting step in Ammonium Bicarbonate. This is the most reliable method we have found. This method was validated by analysis of one Tau sample by total amino acid quantification.
11. The His-ERK2 preparation is contaminated with a protein of 66 kDa (Fig. 4a).

12. The activated ERK kinase in activation buffer with 10% Glycerol is directly mixed with Tau protein in phosphorylation buffer, without prior buffer exchange. In an alternative protocol, His-ERK2, GST-MEK1 R4 and  $^{15}\text{N}$ -Tau can be all mixed, to combine **steps 3.7** and **3.8**.
13. Rat brain extract can be stored at 4 °C for a few days only without loss of kinase activity.
14. Resin beads loaded with the GST-CBP[1202-1848] fragment can be stored without glycerol at 4 °C for few days. However, we have noticed a rapid decrease of acetyltransferase activity (within 2 or 3 days) in these conditions.
15. A peak with a mass increment of +168 Da ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  2861.79 Da) corresponding to the incorporation of four acetyl moieties in the CBP standard substrate from TDG protein can be detected.
16. In contrast to S/T phosphorylation, Y phosphorylation does not induce a down field backbone-amide chemical shift of the modified Y residue resonance [22], probably because the phosphorylatable Y hydroxyl group is at a more distal position compared to the one of S and T residues.
17. [ $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ ] HSQC pulse sequence from Bruker is hsqcetfpf3gpsi avance-version: HSQC 2D H-1/X correlation via double INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer) using sensitivity improvement, phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection with decoupling during acquisition using f3—channel and flip-back pulse.
18. [ $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{13}\text{C}$ ] HNCACB pulse sequence from Bruker is hncacbgpwg3d avance-version: HNCACB 3D sequence with inverse correlation for triple resonance using multiple INEPT transfer steps ( $\text{F1}(\text{H}) \rightarrow \text{F3}(\text{N}) \rightarrow \text{F2}(\text{Ca} \rightarrow \text{Cb}, \text{t1}) \rightarrow \text{F3}(\text{N}, \text{t2}) \rightarrow \text{F1}(\text{H}, \text{t3})$ ), on/off resonance CA and CO pulses using shaped pulse, phase sensitive (t1), phase sensitive (t2), using constant time in t2 and water suppression using watergate sequence.
19. [ $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{15}\text{N}$ ] HNCANN pulse sequence from Bruker is hncannhgpwg3d avance-version: (H)N(CA)NNH 3D sequence with inverse correlation for triple resonance using multiple INEPT transfer steps ( $\text{F1}(\text{H}) \rightarrow \text{F3}(\text{N}, \text{t1}) \rightarrow \text{F2}(\text{Ca}) \rightarrow \text{F3}(\text{N}, \text{t2}) \rightarrow \text{F1}(\text{H}, \text{t3})$ ), on/off resonance CA and CO pulses using shaped pulse, phase sensitive (t1), phase sensitive (t2), using semi-constant time in t1 and t2 and water suppression using watergate sequence.
20. In contrast to the phosphorylation sites that are easily identifiable due to the low field chemical shift of their backbone amide resonances (Fig. 10), the identification of acetylated lysine is not straightforward just by looking to the 2D [ $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ ] HSQC spectrum of acetylated  $^{15}\text{N}$ -labeled Tau, or even in the

$^{15}\text{N}$ -Lys-labeled Tau samples (Fig. 13). Furthermore, the CA and CB chemical shifts of lysine residues as extracted from the HNCACB experiment (Subheading 3.15, step 7) fail to inform about the lysine acetylation state. Only the extremity of the lysine side chain (from  $\text{C}\gamma$  to  $\text{C}\epsilon$  and their protons) is sensitive to the presence of an acetyl moiety [10].

21. [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC-TOCSY pulse sequence from Bruker is `dipsi-hsqcf3gpsi3d` avance-version: TOCSY-HSQC 3D sequence with homonuclear Hartman-Hahn transfer using DIPSI2 sequence for mixing, H-1/X correlation via double inept transfer using sensitivity improvement, phase sensitive (t1), phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection (t2), using trim pulses in INEPT transfer, using f3—channel.
22. [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] HN(CO)CACB pulse sequence from Bruker is `hncocacbgpwg3d` avance-version: HNCOCACB 3D sequence with inverse correlation for triple resonance using multiple INEPT transfer steps ( $\text{F1}(\text{H}) \rightarrow \text{F3}(\text{N}) \rightarrow \text{F2}(\text{C}=\text{O}) \rightarrow \text{F2}(\text{Ca} \rightarrow \text{Cb}, \text{t1}) \rightarrow \text{F2}(\text{C}=\text{O}) \rightarrow \text{F3}(\text{N}, \text{t2}) \rightarrow \text{F1}(\text{H}, \text{t3})$ ), on/off resonance CA and CO pulses using shaped pulse, phase sensitive (t1), phase sensitive (t2) using constant time in t2 and water suppression using watergate sequence.

---

## Acknowledgment

The NMR facilities were funded by the Région Nord, CNRS, Pasteur Institute of Lille, European Community (FEDER), French Research Ministry and the University of Sciences and Technologies of Lille I. We acknowledge support from the TGE RMN THC (FR-3050, France) and the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, “Structural & Functional Biochemistry of Biomolecular Assemblies”) for providing the scientific and technical environment. This study was supported by a grant from the LabEx (Laboratory of Excellence) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer’s disease), and in part by the French government funding agency Agence Nationale de la Recherche TAF. S.P. and J.G. were partially supported on NIH R01-GM08157.

## References

1. Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Yardin C, Terro F (2013) Tau protein kinases: involvement in Alzheimer’s disease. *Ageing Res Rev* 12:289–309. doi:[10.1016/j.arr.2012.06.003](https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.06.003), S1568-1637(12)00088-8 [pii]
2. Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer’s disease brain. *J Biol Chem* 267:17047–17054
3. Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y (1995) Proline-directed and non-proline-

- directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270:823–829
4. Morris M, Knudsen GM, Maeda S, Trinidad JC, Ioanoviciu A, Burlingame AL, Mucke L (2015) Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 18:1183–1189
  5. Cohen TJ, Guo JL, Hurtado DE, Kwong LK, Mills IP, Trojanowski JQ, Lee VM (2011) The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat Commun* 2:252
  6. Min SW, Cho SH, Zhou Y, Schroeder S, Haroutunian V, Seeley WW, Huang EJ, Shen Y, Masliah E, Mukherjee C, Meyers D, Cole PA, Ott M, Gan L (2010) Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron* 67:953–966. doi:[10.1016/j.neuron.2010.08.044](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.044), S0896-6273(10)00687-2 [pii]
  7. Qi H, Cantrelle F-X, Benhelli-Mokrani H, Smet-Nocca C, Buée L, Lippens G, Bonnefoy E, Galas M-C, Landrieu I (2015) Nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of interaction of Tau with DNA and its regulation by phosphorylation. *Biochemistry (Mosc)* 54:1525–1533. doi:[10.1021/bi5014613](https://doi.org/10.1021/bi5014613)
  8. Landrieu I, Lacosse L, Leroy A, Wieruszski JM, Trivelli X, Sillen A, Sibille N, Schwalbe H, Saxena K, Langer T, Lippens G (2006) NMR analysis of a Tau phosphorylation pattern. *J Am Chem Soc* 128:3575–3583. doi:[10.1021/ja054656+](https://doi.org/10.1021/ja054656+)
  9. Amniai L, Barbier P, Sillen A, Wieruszski J-M, Peyrot V, Lippens G, Landrieu I (2009) Alzheimer disease specific phosphoepitopes of Tau interfere with assembly of tubulin but not binding to microtubules. *FASEB J* 23:1146–1152
  10. Smet-Nocca C, Wieruszski JM, Melnyk O, Benecke A (2010) NMR-based detection of acetylation sites in peptides. *J Pept Sci* 16:414–423. doi:[10.1002/psc.1257](https://doi.org/10.1002/psc.1257)
  11. Theillet F-X, Smet-Nocca C, Liokatis S, Thongwichian R, Kosten J, Yoon M-K, Kriwacki RW, Landrieu I, Lippens G, Selenko P (2012) Cell signaling, post-translational protein modifications and NMR spectroscopy. *J Biomol NMR* 54:217–236. doi:[10.1007/s10858-012-9674-x](https://doi.org/10.1007/s10858-012-9674-x)
  12. Kamah A, Huvent I, Cantrelle FX, Qi H, Lippens G, Landrieu I, Smet-Nocca C (2014) Nuclear magnetic resonance analysis of the acetylation pattern of the neuronal Tau protein. *Biochemistry (Mosc)* 53:3020–3032. doi:[10.1021/bi500006v](https://doi.org/10.1021/bi500006v)
  13. Biernat J, Mandelkow EM, Schroter C, Lichtenberg-Kraag B, Steiner B, Berling B, Meyer H, Mercken M, Vandermeeren A, Goedert M et al (1992) The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J* 11:1593–1597
  14. Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Six J, Lubke U, Vandermeeren M, Cras P, Trojanowski JQ, Lee VM (1993) The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5066–5070
  15. Alonso AC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5562–5566
  16. Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249:64–67
  17. Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 343:651–653. doi:[10.1038/343651a0](https://doi.org/10.1038/343651a0)
  18. Seger R, Ahn NG, Boulton TG, Yancopoulos GD, Panayotatos N, Radziejewska E, Ericsson L, Bratlien RL, Cobb MH, Krebs EG (1991) Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6142–6146
  19. Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 265:966–970
  20. Prabakaran S, Everley RA, Landrieu I, Wieruszski JM, Lippens G, Steen H, Gunawardena J (2011) Comparative analysis of Erk phosphorylation suggests a mixed strategy for measuring phospho-form distributions. *Mol Syst Biol* 7:482. doi:[10.1038/msb.2011.15](https://doi.org/10.1038/msb.2011.15), msb201115 [pii]
  21. Tini M, Benecke A, Um SJ, Torchia J, Evans RM, Chambon P (2002) Association of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription. *Mol Cell* 9:265–277. doi:[S1097276502004537](https://doi.org/S1097276502004537) [pii]
  22. Bienkiewicz EA, Lumb KJ (1999) Random-coil chemical shifts of phosphorylated amino acids. *J Biomol NMR* 15:203–206
  23. Wishart DS, Bigam CG, Holm A, Hodges RS, Sykes BD (1995) 1H, 13C and 15N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J Biomol NMR* 5:67–81

24. Schleucher J, Schwendinger M, Sattler M, Schmidt P, Schedletzky O, Glaser SJ, Sorensen OW, Griesinger C (1994) A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J Biomol NMR* 4:301–306
25. Weisemann R, Ruterjans H, Bermel W (1993) 3D triple-resonance NMR techniques for the sequential assignment of NH and <sup>15</sup>N resonances in <sup>15</sup>N- and <sup>13</sup>C-labelled proteins. *J Biomol NMR* 3:113–120
26. Lippens G, Wieruszeski JM, Leroy A, Smet C, Sillen A, Buee L, Landrieu I (2004) Proline-directed random-coil chemical shift values as a tool for the NMR assignment of the tau phosphorylation sites. *Chembiochem* 5:73–78. doi:[10.1002/cbic.200300763](https://doi.org/10.1002/cbic.200300763)
27. Smet C, Leroy A, Sillen A, Wieruszeski JM, Landrieu I, Lippens G (2004) Accepting its random coil nature allows a partial NMR assignment of the neuronal Tau protein. *Chembiochem* 5:1639–1646. doi:[10.1002/cbic.200400145](https://doi.org/10.1002/cbic.200400145)
28. Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jeganathan S, Biernat J, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2009) Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol* 7, e34

## Video Article

# Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Identification of Multiple Phosphorylations of Intrinsically Disordered Proteins

Clément Danis<sup>1,2</sup>, Clément Despres<sup>\*1</sup>, Luiza M. Bessa<sup>1</sup>, Idir Malki<sup>1</sup>, Hamida Merzougui<sup>1</sup>, Isabelle Huvent<sup>1</sup>, Haoling Qi<sup>1</sup>, Guy Lippens<sup>1</sup>, François-Xavier Cantrelle<sup>1</sup>, Robert Schneider<sup>1</sup>, Xavier Hanouille<sup>1</sup>, Caroline Smet-Nocca<sup>1</sup>, Isabelle Landrieu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR8576, CNRS, Lille University

<sup>2</sup>UMR-S1172, INSERM CNRS, Lille University

\*These authors contributed equally

Correspondence to: Isabelle Landrieu at [isabelle.landrieu@univ-lille1.fr](mailto:isabelle.landrieu@univ-lille1.fr)

URL: <http://www.jove.com/video/55001>

DOI: [doi:10.3791/55001](https://doi.org/10.3791/55001)

Keywords: Biochemistry, Issue 118, nuclear magnetic resonance spectroscopy, isotopic labeling, intrinsically disordered protein, recombinant protein, protein purification, protein phosphorylation, NMR data acquisition, resonance assignment.

Date Published: 12/27/2016

Citation: Danis, C., Despres, C., Bessa, L.M., Malki, I., Merzougui, H., Huvent, I., Qi, H., Lippens, G., Cantrelle, F.X., Schneider, R., Hanouille, X., Smet-Nocca, C., Landrieu, I. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Identification of Multiple Phosphorylations of Intrinsically Disordered Proteins. *J. Vis. Exp.* (118), e55001, doi:10.3791/55001 (2016).

## Abstract

Aggregates of the neuronal Tau protein are found inside neurons of Alzheimer's disease patients. Development of the disease is accompanied by increased, abnormal phosphorylation of Tau. In the course of the molecular investigation of Tau functions and dysfunctions in the disease, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is used to identify the multiple phosphorylations of Tau. We present here detailed protocols of recombinant production of Tau in bacteria, with isotopic enrichment for NMR studies. Purification steps that take advantage of Tau's heat stability and high isoelectric point are described. The protocol for *in vitro* phosphorylation of Tau by recombinant activated ERK2 allows for generating multiple phosphorylations. The protein sample is ready for data acquisition at the issue of these steps. The parameter setup to start recording on the spectrometer is considered next. Finally, the strategy to identify phosphorylation sites of modified Tau, based on NMR data, is explained. The benefit of this methodology compared to other techniques used to identify phosphorylation sites, such as immuno-detection or mass spectrometry (MS), is discussed.

## Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/55001/>

## Introduction

One of the main challenges of healthcare in the 21<sup>st</sup> century are neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD). Tau is a microtubule-associated protein that stimulates microtubule (MT) formation. Tau is equally involved in several neurodegenerative disorders, so-called tauopathies, of which the best known is AD. In these disorders, Tau self-aggregates in paired helical filaments (PHFs) and is found modified on many residues by posttranslational modifications (PTMs) such as phosphorylation<sup>1</sup>. Phosphorylation of Tau protein is implicated in both regulation of its physiological function of MT stabilization and pathological loss of function that characterizes AD neurons.

Furthermore, Tau protein, when integrated in PHFs in diseased neurons, is invariably hyperphosphorylated<sup>2</sup>. Unlike normal Tau that contains 2-3 phosphate groups, the hyperphosphorylated Tau in PHFs contains 5 to 9 phosphate groups<sup>3</sup>. Hyperphosphorylation of Tau corresponds both to an increase of stoichiometry at some sites and to phosphorylation of additional sites that are called pathological sites of phosphorylation. However, overlap exists between AD and normal adult patterns of phosphorylation, despite quantitative differences in the level<sup>4</sup>. How specific phosphorylation events influence function and dysfunction of Tau remains largely unknown. We aim to decipher Tau regulation by PTMs at the molecular level.

To deepen the understanding of the molecular aspects of Tau, we have to address technical challenges. Firstly, Tau is an intrinsically disordered protein (IDP) when isolated in solution. Such proteins lack well-defined three-dimensional structure under physiological conditions and require particular biophysical methods to study their function(s) and structural properties. Tau is a paradigm for the growing class of IDPs, often found associated with pathologies such as neurodegenerative diseases, hence increasing the interest to understand the molecular parameters underlying their functions. Secondly, characterization of Tau phosphorylation is an analytical challenge, with 80 potential phosphorylation sites along the sequence of the longest 441 amino-acid Tau isoform. A number of antibodies have been developed against phosphorylated epitopes of Tau and are used for detection of pathological Tau in neurons or brain tissue. Phosphorylation events can take place on at least 20 sites targeted by proline-directed kinases, most of them in close proximity within the Proline-rich region. The qualitative (which sites?) and quantitative (what stoichiometry?) characterization is difficult even by the most recent MS techniques<sup>5</sup>.



NMR spectroscopy can be used to investigate disordered proteins that are highly dynamic systems constituted of ensembles of conformers. High-resolution NMR spectroscopy was applied to investigate both structure and function of the Tau protein. In addition, the complexity of Tau's phosphorylation profile led to the development of molecular tools and new analytical methods using NMR for the identification of phosphorylation sites<sup>6-8</sup>. NMR as an analytical method allows for the identification of Tau phosphorylation sites in a global manner, visualization of all the single-site modifications in a single experiment, and quantification of the extent of phosphate incorporation. This point is essential since although phosphorylation studies on Tau abound in the literature, most of them have been performed with antibodies, leaving a large degree of uncertainty over the complete profile of phosphorylation and thus the true impact of individual phosphorylation events. Recombinant kinases including PKA, Glycogen-synthase kinase 3 $\beta$  (Gsk3 $\beta$ ), Cyclin-dependent kinase 2/cyclin A (CDK2/CycA), Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5)/p25 activator protein, extracellular-signal-regulated kinase 2 (ERK2) and microtubule-affinity-regulating kinase (MARK), which show phosphorylation activity towards Tau, can be prepared in an active form. In addition, Tau mutants that allow for generating specific Tau protein isoforms with well-characterized phosphorylation patterns are used to decipher the phosphorylation code of Tau. NMR spectroscopy is then used to characterize enzymatically modified Tau samples<sup>6-8</sup>. Although *in vitro* phosphorylation of Tau is more challenging than pseudo-phosphorylation such as by mutation of selected Ser/Thr into glutamic acid (Glu) residues, this approach has its merits. Indeed, neither the structural impact nor interaction parameters of phosphorylation can always be mimicked by glutamic acids. An example is the turn motif observed around phosphoserine 202 (pSer202)/phosphothreonine 205 (pThr205), which is not reproduced with Glu mutations<sup>9</sup>.

Here, the preparation of isotopically labeled Tau for NMR investigations will be described first. Tau protein phosphorylated by ERK2 is modified on numerous sites described as pathological sites of phosphorylation, and thus represents an interesting model of hyperphosphorylated Tau. A detailed protocol of Tau *in vitro* phosphorylation by recombinant ERK2 kinase is presented. ERK2 is activated by phosphorylation by mitogen activated protein kinase/ERK kinase (MEK)<sup>10-12</sup>. In addition to the preparation of modified, isotopically-labeled Tau protein, the NMR strategy used for identification of the PTMs is described.

## Protocol

### 1. Production of <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C-Tau (Figure 1)

1. Transform pET15b-Tau recombinant T7 expression plasmid<sup>13,14</sup> into BL21(DE3) competent *Escherichia coli* bacterial cells<sup>15</sup>.  
NOTE: the cDNA coding for the longest (441 amino acid residues) Tau isoform is cloned between *NcoI* and *XhoI* restriction sites in the pET15b plasmid.
  1. Mix gently 50  $\mu$ l of competent BL21(DE3) cells, forming 1-5 x 10<sup>7</sup> colonies per  $\mu$ g of plasmid DNA, with 100 ng of plasmid DNA in a 1.5 ml plastic tube.  
NOTE: Codon-usage optimized bacterial strains for eukaryotic cDNA expression are not essential to produce human Tau.
  2. Place the cell mixture on ice for 30 min and then heat shock for 10 sec at 42 °C. Place the tube back on ice for 5 min and add 1 ml of room temperature LB (Luria-Bertani) medium. Incubate the bacterial suspension at 37 °C for 30 min under gentle agitation.
2. Spread using an inoculation loop 100  $\mu$ l of cell suspension evenly onto an agar plate of LB medium containing 100  $\mu$ g/ml of ampicillin antibiotic.
3. Incubate the selection plate for 15 hr at 37 °C.
4. Keep the selection plate at 4 °C until proceeding to the culture step, for a maximum of 2 weeks approximately.  
NOTE: a glycerol stock of bacterial culture (50% glycerol), stored at -80 °C, can be prepared to start the culture at a later stage.
5. Add 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, 1 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 ml 100x MEM vitamin complement, 1 ml 100 mg/ml ampicillin to 1 L of autoclaved M9 salts (6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g NaCl).  
NOTE: A white precipitate will form upon addition of the CaCl<sub>2</sub> solution to the M9 salts that quickly dissipates.
6. Solubilize 300 mg of <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C-complete medium, 1 g of <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl and 2 g of <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose in 10 ml of M9 medium. Filter-sterilize the isotope solution using a 0.2  $\mu$ m filter, directly into the M9 medium.
7. Suspend using an inoculation loop one colony of pET15b-Tau transformed bacteria from the selection plate in 20 ml of LB medium supplemented with 100  $\mu$ g/ml of ampicillin.
8. Incubate the inoculated medium at 37 °C for about 6 hr.
9. Measure optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) on 1 ml of a ten-fold dilution of bacterial culture in a plastic spectrometer cuvette.  
NOTE: Turbidity of the bacterial culture corresponding to OD<sub>600</sub> of 3.0-4.0 indicates that saturation growth phase is reached.
10. Add 20 ml of the saturated LB culture to 1 L of M9 growth medium supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/ml final concentration), in 2 L Erlenmeyer plastic baffled culture flask.
11. Place the culture flask in a programmable incubator set to 10 °C and 50 rpm. Program the incubator to switch to 200 rpm and 37 °C early in the morning of the next day.
12. Measure OD<sub>600</sub> on 1 ml of bacterial culture in a plastic spectrometer cuvette. Add 400  $\mu$ l of 1 M IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) stock solution (kept at -20 °C) when OD<sub>600</sub> reaches a value of about 1.0 to induce the expression of recombinant Tau protein.
13. Continue the incubation at 37 °C for a further 3 hr. Collect the bacterial cells by centrifugation at 5,000 x g for 20 min.
14. Freeze the bacterial pellet at -20 °C. Keep frozen until the purification step, for an extended period if needed.

### 2. Purification of <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C-Tau (Figure 2)

1. Autoclave cation-exchange (CEX) purification buffers at 121 °C under 15 psi for 20 min. Store buffers at 4 °C.
2. Thaw the bacterial cell pellet and resuspend thoroughly in 45 ml of extraction CEX A buffer (50 mM NaPi buffer pH 6.5, 1 mM EDTA) freshly supplemented with protease inhibitor cocktail 1x (1 tablet) and DNaseI (2,000 units).
3. Disrupt the bacterial cells using a high-pressure homogenizer at 20,000 psi. 3-4 passes are necessary. Centrifuge at 20,000 x g for 40 min to remove insoluble material.
4. Heat the bacterial cell extract for 15 min at 75 °C using a water bath.  
NOTE: a white precipitate is observed after a few minutes.

5. Centrifuge at 15,000 x g for 20 min and keep the supernatant containing the heat-stable Tau protein.
6. Store at -20 °C until the following purification step, if needed.
7. Perform a cation-exchange chromatography on a strong CEX resin packed as a 5 ml bed column using a fast protein liquid chromatography (FPLC) system (**Figure 3 A**).
  1. Set flow rate to 2.5 ml/min.
  2. Equilibrate the column in CEX A buffer
  3. Load the 60-70 ml heated-extract containing Tau using a sample pump, or alternatively pump A, depending on the system. Collect the flow-through for analysis to verify that Tau protein is efficiently binding to the resin (see 2.8).
  4. Wash the resin with CEX A buffer until absorbance at 280 nm is back to baseline value.
  5. Elute Tau from the column using a three-step NaCl gradient obtained by gradual increase of CEX B buffer (CEX A buffer with 1 M NaCl). Program the FPLC as follows: first step of the gradient to 25% CEX B buffer in 10 column volumes (CV) to reach 250 mM NaCl, second step to 50% CEX B buffer in 5 CV to reach 500 mM NaCl, and third step to 100% CEX B buffer in 2 CV to reach 1 M NaCl. Collect 1.5 ml fractions during the elution steps.
8. Analyze 10 µl of the fractions collected during the elution step by SDS-PAGE (12% SDS-acrylamide gel) and Coomassie staining (**Figure 3 A**)<sup>16</sup>. Check the loading step on the column as well by analyzing 10 µl of the flow-through.
9. Choose the fractions containing Tau and pool these fractions for the next step.
10. Perform a buffer exchange on Tau-containing pooled fractions (**Figure 3 B**).
  1. Equilibrate a desalting column of 53 ml G25 resin packed bed (26 x 10 cm) in 50 mM ammonium bicarbonate (volatile buffer) using a FPLC system.
  2. Set flow rate to 5 ml/min. Inject the Tau sample on the column via a 5 ml injection loop. Collect fractions corresponding to the absorption peak at 280 nm.
  3. Repeat the injection 3-4 times, depending on the volume of the initial CEX pool.
11. Calculate the amount of purified Tau protein by using the peak area of the chromatogram at 280 nm (1 mg of Tau corresponds to 140 mAU\*ml).  
NOTE: The extinction coefficient of Tau protein at 280 nm is 7,550 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Tau does not contain any Trp residues.
12. Pool all Tau fractions.
13. Aliquot the sample into tubes containing the equivalent of 1 to 5 mg of Tau. Choose these tubes so that the volume of solution is small compared to the volume of the tube (for example 5 ml of solution in a 50 ml tube).
14. Punch holes in the tube caps using a needle. Freeze Tau samples at -80 °C.
15. Lyophilize Tau samples. Lyophilized Tau protein can be kept at -20 °C for long periods of time.

### 3. In Vitro Phosphorylation of <sup>15</sup>N-Tau

1. Dissolve 5 mg of lyophilized Tau in 500 µl phosphorylation buffer (50 mM Hepes-KOH, pH 8.0, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl).
2. Add 2.5 mM ATP (25 µl of 100 mM stock solution kept at -20 °C), 1 mM DTT (1 µl of 1 M stock solution kept at -20 °C), 1 mM EGTA (2 µl of a 0.5 M stock solution), 1x protease inhibitor cocktail (25 µl of a 40x stock obtained by dissolving 1 tablet in 1 ml phosphorylation buffer) and 1 µM activated His-ERK2 (250 µl in conservation buffer 10 mM Hepes, pH 7.3, 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl and 10% glycerol, stored at -80 °C) in a total sample volume of 1 ml.  
NOTE: The activated His-ERK2 can be prepared in-house<sup>5,8</sup> by phosphorylation with the MEK kinase.
3. Incubate 3 hr at 37 °C.
4. Heat the sample at 75 °C for 15 min to inactivate ERK kinase.
5. Centrifuge at 20,000 x g for 15 min. Collect and keep the supernatant.
6. Desalt the protein sample into 50 mM ammonium bicarbonate using a column of 3.45 ml G25 resin packed bed (1.3 x 2.6 cm), which is suitable for a 1 ml sample.
7. Run a 12% SDS-PAGE<sup>16</sup> with 2.5 µl of the protein sample to check both its integrity and efficient phosphorylation (**Figure 4**).
8. Lyophilize the phosphorylated Tau sample. Store the powder at -20 °C.

### 4. Acquisition of NMR Spectra (Figure 5)

1. Solubilize 4 mg of lyophilized <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C ERK-phosphorylated-Tau in 400 µl NMR buffer (50 mM NaPi or 50 mM deuterated Tris-*d*11.Cl, pH 6.5, 30 mM NaCl, 2.5 mM EDTA and 1 mM DTT).
2. Add 5% D<sub>2</sub>O for field locking of the NMR spectrometer and 1 mM TMSP (3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d<sub>4</sub> acid sodium salt) as internal NMR signal reference. Add 10 µl of a 40x stock solution of complete protease inhibitor cocktail.
3. Transfer the sample in a 5 mm NMR tube using an electronic syringe with a long needle or Pasteur pipette. Close the NMR tube using the plunger. Remove any air bubble trapped between plunger and liquid by plunger movements.
4. Place the NMR tube in a spinner. Adjust its vertical position in the spinner with the appropriate gauge for the NMR probe head used, such that most of the sample solution will be inside the NMR coil.
5. Start the air flow: click *lift* in the magnet control system window. Carefully place the spinner with the tube in the airflow at the top of the magnet bore. Stop the air flow (click *lift*) and let the tube descend into place inside the probe head in the magnet.
6. Set temperature to 25 °C (298 K).
7. Perform semi-automatic tuning and matching of the probe head to optimize power transmission. Type *atmm* on the command line.
8. Lock the spectrometer frequency using the D<sub>2</sub>O signal of the sample recorded on the deuterium channel. Click *lock* in the magnet control system window.
9. Start the shimming procedure to optimize homogeneity of the magnetic field at the position of the sample. Type *topshim gui* on the command line to open the shim window. Click *start* in the shim window. Check the residual B0 standard variation value to verify that shims are optimal (less than 2 Hz is good).

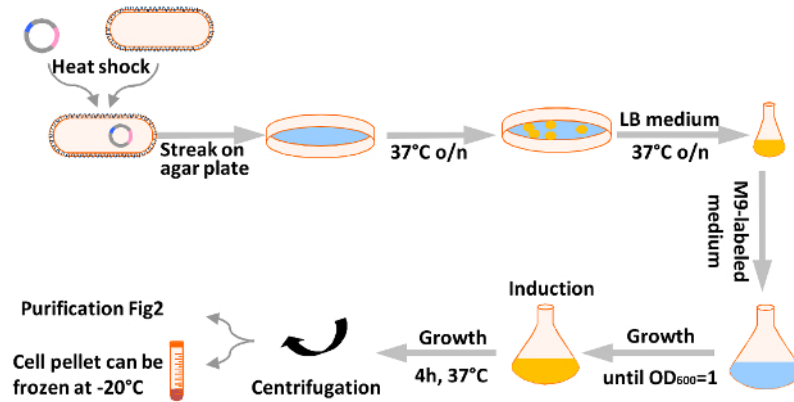
10. Calibrate the p1 parameter (length of a proton radiofrequency pulse in  $\mu\text{sec}$ ), which is necessary to obtain a  $90^\circ$  rotation of proton spins. Aim for the  $360^\circ$  pulse using a 1D spectrum of water protons (**Figure 6**).
11. Adjust the frequency offset by setting the o1 parameter (in Hz) to the proton water frequency in the 1D spectrum (**Figure 6**).
12. Start acquisition of a 1D proton spectrum (pulse sequence with watergate sequence for water signal suppression, for example zgpgw5) to verify signals from the sample (**Figure 7**). Adapt the number of scans to the relative protein concentration. Type *zg* on the command line to start the acquisition.
13. Set up additional parameters for the acquisition of a 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC spectrum (pulse sequence hsqcetf3gpsi, **Figures 8-9**).
  1. For a  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  labeled sample, decouple  $^{13}\text{C}$  during the  $^{15}\text{N}$  indirect evolution.
  2. Set the number of points and the spectral width (ppm) in the  $^1\text{H}$  (F2) and  $^{15}\text{N}$  (F1) dimensions.  
NOTE: Adapt the number of acquisition data points to the spectrometer field to keep a similar number of Hz per point and to limit decoupling times: use 3,072 points at 900 MHz and 2,048 points at 600 MHz, in the  $^1\text{H}$  dimension.
  3. Optimize additional parameters in the pulse sequences, corresponding to delays, pulse lengths, offset frequencies, power levels. Type *ased* on the command line to display all parameters relevant for the experiment.
14. Set parameters for the acquisition of a 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] HNCACB spectrum (pulse sequence hncacbgpwg3d, **Figure 10A**) at 600 MHz.
15. Set parameters for a 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HNCANNH experiment (pulse sequence hncannhgwpg3d) at 600 MHz. Set the number of points to 2048 in the  $^1\text{H}$  and, 64 and 128 points in the two  $^{15}\text{N}$  dimensions. Define the spectral widths as 14, 25, 25 parts per million (ppm) centered on 4.7, 119, 119 ppm in the  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}$  dimensions. Duration of acquisition with 16 scans is 1 day and 22 hr.

## 5. Identification of Phosphorylation Sites

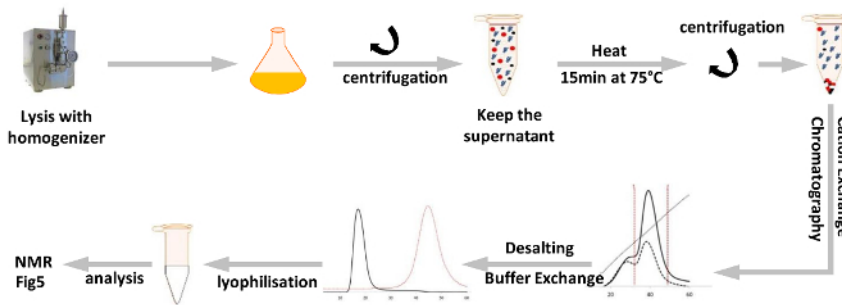
1. Process spectra using acquisition and processing NMR software.
  1. Perform a Fourier transformation of the data (**Figure 7**). Type *ft* for a 1D spectrum, *xfb* for a 2D spectrum or *ft3d* for a 3D spectrum, on the command line.
  2. Phase and reference all spectra (**Figure 7C**) using the interactive windows.
2. Identify resonances of interest in the 2D HSQC potentially corresponding to phosphorylated Ser and Thr residues (**Figure 9**, red box).
3. Extract planes (*i.e.* 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  spectra) from the 3D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  spectrum using the  $^{15}\text{N}$  chemical shifts of resonances of interest in the 2D. Use the cursor of dimension 2 (w2) to choose the  $^{15}\text{N}$  frequency corresponding to the plane (w1-w3) to be visualized (**Figure 10B**).
4. Pick the resonance frequencies of 'CA' and 'CB'  $^{13}\text{C}$  nuclei of the 'i' and 'i-1' residues (weaker set of signals compared to those of the i residue) for each [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] resonance of interest in the HNCACB 3D spectrum by clicking on the resonance, in pointer mode menu find/add peak, to add the chemical shift value in a peak list file.
  1. Identify the i residue type, pSer or pThr, by comparing the chemical shifts in the peak list to known values of CA and CB chemical shifts of pSer and pThr<sup>17</sup>.
  2. Identify the presence of a Pro residue at the i+1 position by a characteristic additional +2 ppm shift of the CA chemical shift value<sup>18</sup>.
  3. Compare the chemical shift values of the CA and CB resonances corresponding to the i-1 residue to a table of chemical shifts predicted for Tau amino acid residues<sup>19</sup> to identify the nature of the residue at the i-1 position.
5. Pick the resonance frequencies of  $^{15}\text{N}$  nuclei of the 'i' and 'i-1' residues for each [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] resonance of interest in the HNCANNH spectrum.
6. Compare the  $^{15}\text{N}$  chemical shift values to the chemical shift assignment of the Tau protein<sup>20-23</sup>.
7. Compare the identified dipeptides with the Tau sequence to define the sequence specific assignment.

## Representative Results

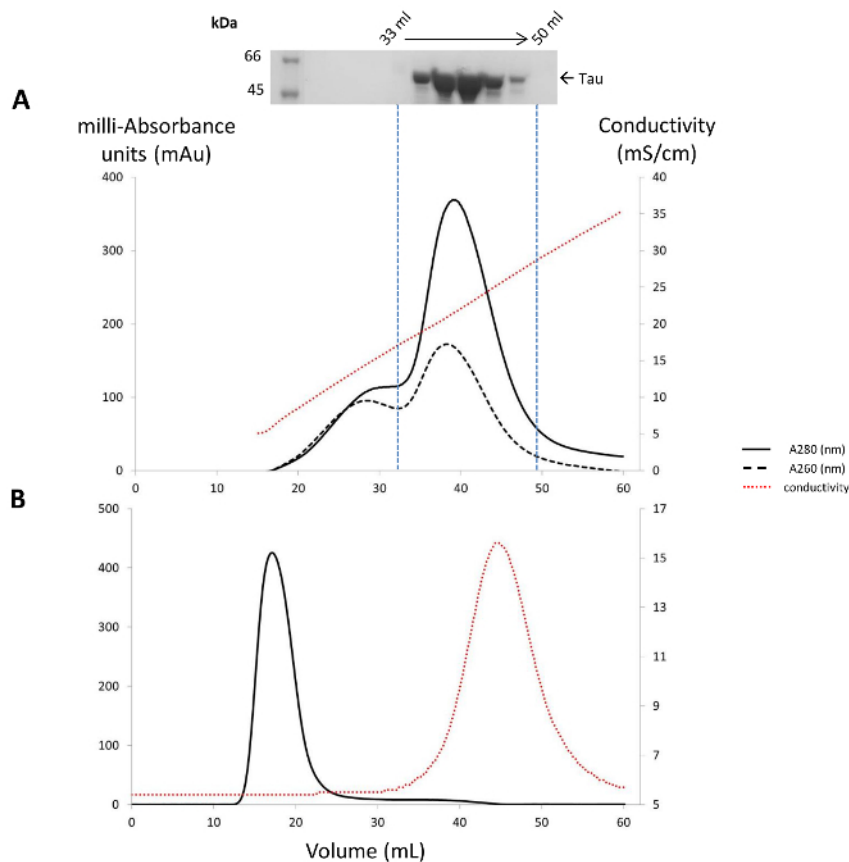
**Figure 3A** shows a major absorption peak at 280 nm observed during the elution gradient. This peak corresponds to purified Tau protein as seen on the acrylamide gel above the chromatogram. **Figure 3B** shows a well separated absorption peak at 280 nm and peak of conductivity, ensuring that desalting of the protein is efficient. **Figure 4** shows protein gel-shift observed by SDS-PAGE analysis<sup>16</sup> characteristic of multiple protein phosphorylation (compare lanes 2 and 3). **Figure 6** shows a series of proton ( $^1\text{H}$ ) 1D spectra with increasing pulse lengths (in  $\mu\text{sec}$ ). To setup the length of the pulse that will rotate  $^1\text{H}$  spin magnetization by  $90^\circ$ , a pulse corresponding to a  $360^\circ$  rotation is used in practice, as it is easier to calibrate by minimizing the signal. The signal of water protons is null when the  $360^\circ$  pulse length is adequately defined. The value corresponding to a  $360^\circ$  rotation is then divided by 4. p1 in this experiment is 10.5  $\mu\text{sec}$ . Enlarged region: The frequency of the residual signal is used to define the o1p parameter (frequency offset for  $^1\text{H}$ ). **Figure 7A**, shows a free induction decay (FID), visualized to ensure that an NMR signal is detected. **Figure 7B**, shows a 1D  $^1\text{H}$  spectrum with an incorrect phase, as seen by resonances appearing as asymmetric peaks. **Figure 7C** shows a 1D  $^1\text{H}$  spectrum with good signal to noise ratio, indicating that the basic acquisition parameters were correctly set and a signal from the protein sample can be detected. **Figure 8** shows 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of recombinant  $^{15}\text{N}$ -Tau at 900 MHz; **Figure 8A** with good sensitivity and resolution and **Figure 8B**, with detection of proteolysis in the sample, as seen by the appearance of additional peaks in the spectrum (blue box). **Figure 9** shows 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of recombinant  $^{15}\text{N}$ -Tau **Figure 9A** at 600 MHz, with good sensitivity but less resolution compared to **Figure 8A**. **Figure 9B** at 600 MHz, shows appearance of additional peaks in the spectrum corresponding to phosphorylated residues (red box). **Figure 9C** at 900 MHz, shows peaks in the spectrum corresponding to phosphorylated residues (red box). Resolution is better than in **Figure 9B**. **Figure 10A** shows projections from the 3D NMR spectrum used to evaluate a successful experiment. **Figure 10B** shows a  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  plane extracted from the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  3D spectrum with good signal intensity allowing to detect  $^{13}\text{C}$  signals from both i and i-1 residues.



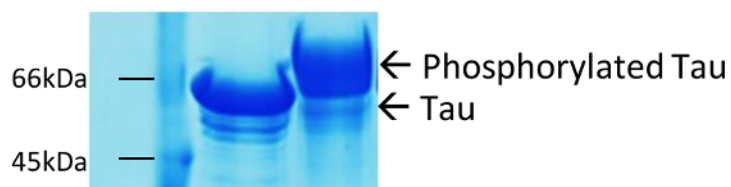
**Figure 1: Scheme of the main steps of recombinant protein production and isotopic labeling.** Steps from bacteria transformation to recombinant protein production are outlined as described in paragraph 1 of the protocol. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



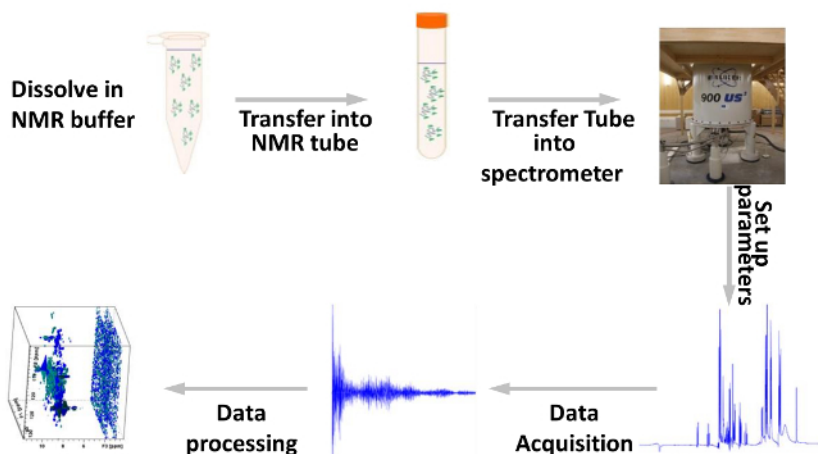
**Figure 2: Scheme of the main steps of recombinant Tau protein purification.** Steps from bacterial cells lysis to recombinant protein purification are outlined as described in paragraph 2 of the protocol. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



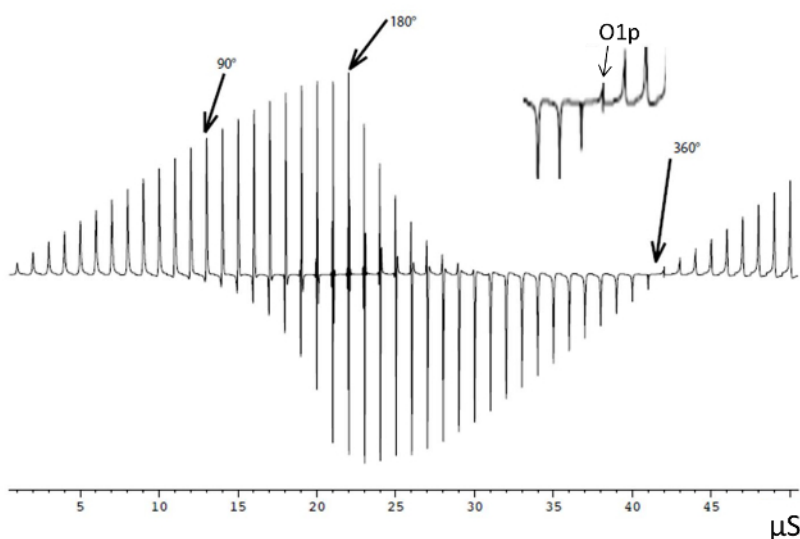
**Figure 3: Liquid chromatography steps of protocol.** (A) Cation exchange chromatography fractionation of the heated bacterial extract. The absorbance at 280 nm, 260 nm and the conductivity correspond respectively to solid and dashed black lines and dotted red line. 12% SDS-PAGE analysis of the collected fractions is shown above the chromatogram. (B) Desalting of the Tau protein into a buffer suitable for lyophilization. The amount of purified Tau protein estimated from the peak area (2,260 mAU\*ml) is 16 mg of Tau. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



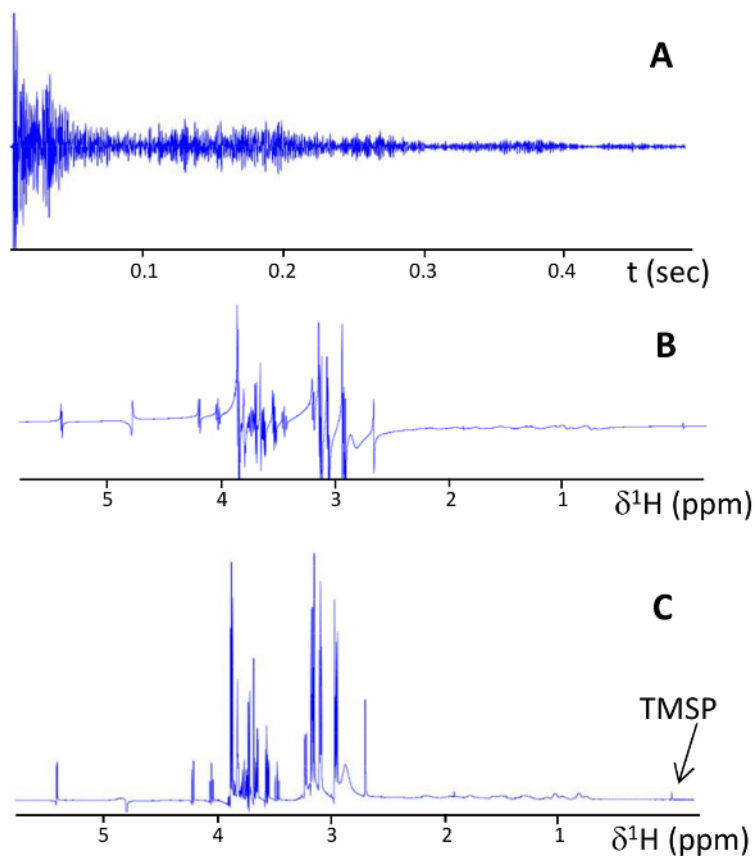
**Figure 4: 12% SDS-PAGE analysis of Tau.** Lane 1, molecular weight marker; lane 2, 10 µg of Tau; lane 3, 10 µg of ERK-phosphorylated Tau. Tau, as other IDPs, runs in an anomalous manner on SDS-PAGE, at an apparent molecular weight of about 60 kDa instead of the expected 46 kDa. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



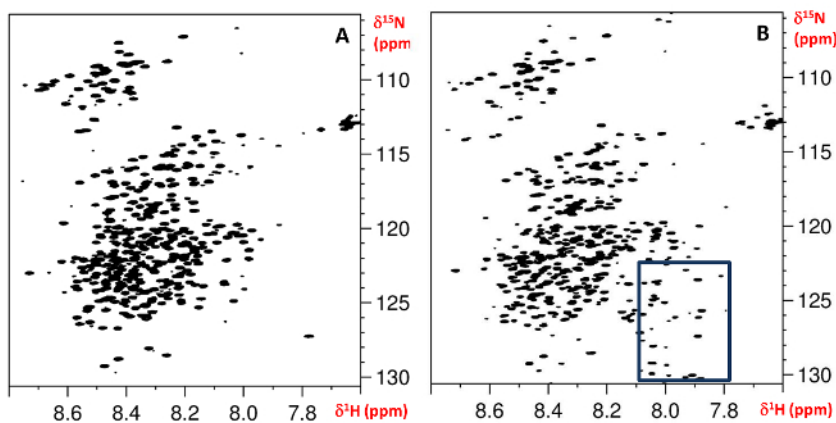
**Figure 5: Scheme of the main steps for NMR sample preparation, NMR spectroscopy data acquisition and data processing.** Steps from NMR sample preparation to data acquisition and processing are outlined as described in paragraph 4 of the protocol. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



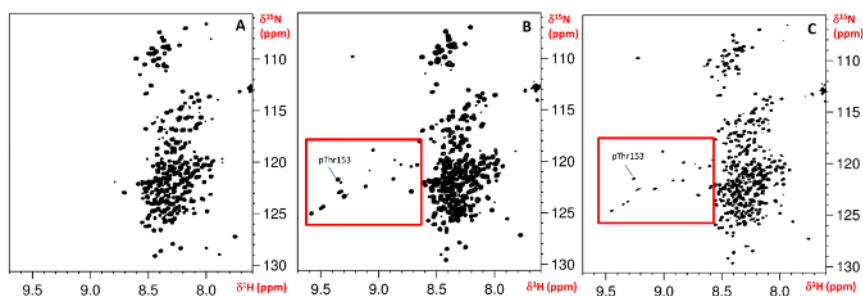
**Figure 6: Set-up of the p1 parameter for NMR data acquisition.** This parameter differs between samples and is mainly dependent on salt concentration. A standard  $^1\text{H}$  nutation curve for 80%  $\text{H}_2\text{O}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  is shown. Single-scan spectra with a recycle delay of 30 sec were collected and plotted horizontally. The pulse (p1) was varied from 1  $\mu\text{sec}$  to 55  $\mu\text{sec}$  in steps of 1  $\mu\text{sec}$ . In theory, the signal should be maximal for a  $90^\circ$  pulse and equal to zero for a  $180^\circ$  pulse. However, in practice, radiation damping causes asymmetry and phase distortion problems which make it difficult to determine the  $90^\circ$  or  $180^\circ$  pulses directly. The second null point corresponds to a  $360^\circ$  pulse duration. The enlarged region shows a residual signal for a  $360^\circ$  pulse that is used to define the o1p frequency parameter. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



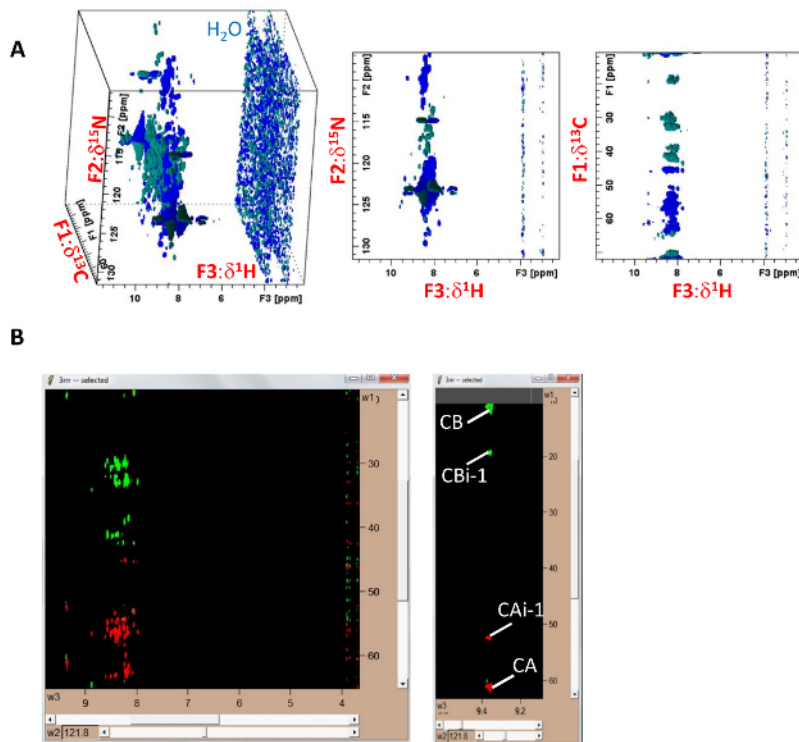
**Figure 7: NMR data processing.** (A) Free induction signal decay in the time domain. 1D proton spectra (B) resulting from Fourier transformation of the FID from panel A into the frequency domain but with incorrect phase (PHC0 -206°). (C) phased (PHC0 -113°) and referenced (TMSP signal at 0 ppm). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 8: 2D <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N HSQC spectra of recombinant <sup>15</sup>N-Tau at 900 MHz.** 3,072 and 416 acquisition data points were recorded using spectral widths of 14 and 25 ppm in the <sup>1</sup>H (F2) and <sup>15</sup>N (F1) dimensions, respectively. 16 scans were recorded per F1 increment, leading to a duration of the experiment of 4 hr 30 min. (A) good quality Tau sample (B) Tau sample showing degradation as revealed by the appearance of additional resonances in a particular region of the spectrum (high field <sup>1</sup>H, low field <sup>15</sup>N), here boxed in blue. This last sample was prepared without protease inhibitors. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 9:** 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of recombinant  $^{15}\text{N}$ -Tau. (A) unphosphorylated Tau, 600 MHz spectrum (B) phosphorylated Tau, 600 MHz spectrum and (C) phosphorylated Tau, 900 MHz spectrum. Additional resonances in a particular region of the spectrum, here boxed in red, are observed in phosphorylated Tau spectra. These resonances, which correspond to proton amide ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) correlations of pSer and pThr residues, are easily visualized in the region around 8.5 to 9.5 ppm for  $^1\text{H}$  and 117 to 125 ppm for  $^{15}\text{N}$ , outside the bulk of the  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  correlations of the unphosphorylated Tau spectrum. (A and B) correspond to spectra acquired at 600 MHz, 2,048 and 256 data points at spectral widths of 14 and 25 ppm were recorded in the  $^1\text{H}$  (F2) and  $^{15}\text{N}$  (F1) dimensions, respectively. 32 scans were used, and total duration of the acquisition was 2 hr 44 min and (C) at 900 MHz, 3,072 and 416 data points at spectral widths of 14 and 25 ppm were recorded in the  $^1\text{H}$  (F2) and  $^{15}\text{N}$  (F1) dimensions, respectively. 48 scans were used, and total duration of the acquisition was 6 hr 37 min. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 10:** 3D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum, projections and extracted 2D planes. 2,048, 72, and 256 data points were recorded in the  $^1\text{H}$  (F3),  $^{15}\text{N}$  (F2), and  $^{13}\text{C}$  (F1) dimensions, respectively. Spectral widths are 14, 25, and 61 ppm, centered on 4.7, 119, and 41 ppm in the  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  dimensions, respectively. Duration of the acquisition using 16 scans is 4 days and 6 hr. (A) Cube representation corresponding to the Fourier transformed 3D dataset of an HNCACB spectrum of ERK-phosphorylated Tau obtained at 600 MHz. The 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and the  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  planes are obtained by projection of the 3D data along the  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  dimension, respectively. Data processing and representation were done using NMR acquisition and processing software. (B) 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  plane extracted from the 3D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR dataset at a  $^{15}\text{N}$  chemical shift of 121.8 ppm. A zoom (on the right) centered on the  $^1\text{H}$  chemical shift of 9.38 ppm shows the  $^{13}\text{C}$ CA and  $^{13}\text{C}$ CB resonances of both residue i (pThr153) and i-1 (Ala152). The  $^{13}\text{C}$ CB resonance is aliased due to the width of the spectral window. Graphical representation and peak picking were performed using NMR analysis software. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

## Discussion

We have used NMR spectroscopy to characterize enzymatically modified Tau samples. The recombinant expression and purification described here for the full-length human Tau protein can similarly be used to produce mutant Tau or Tau domains. Isotopically enriched protein is needed for NMR spectroscopy, necessitating recombinant expression. Identification of phosphorylation sites requires resonance assignment and a  $^{15}\text{N}$ ,



$^{13}\text{C}$  doubly labeled protein. Given the cost of isotopes, good yield is required in the recombinant expression step. Glucose is the limiting factor for the bacterial growth in the M9 medium therefore the amount of  $^{13}\text{C}_6$ -glucose can be increased to 4 g per liter of growth medium to improve yield. Addition of complete medium and MEM vitamins are not compulsory but help to stimulate growth and improve yield. Given the high cost of the complete labeled medium, this product is only used as a growth medium supplement. Bacterial growth is slow in M9 medium. Generally, bacterial cultures using M9 media supplemented with 3% complete medium reach time of induction after about 4 hr of incubation. An  $\text{OD}_{600}$  of 1.6-1.8 is usually obtained at the end of the culture. Expected yield of recombinant Tau protein is about 15 mg per liter of bacterial culture. The use of a programmable incubator allows to conveniently schedule protein production, collection of the bacterial pellet and analytical control of protein production during working day hours.

Sample concentration is important to obtain a good quality spectrum. A typical Tau sample sufficient for a 2D spectrum would contain 1 mg in 200  $\mu\text{l}$  (*i.e.* 100  $\mu\text{M}$ ) Tau protein. For a 3D spectrum, at least 200  $\mu\text{M}$  in 300  $\mu\text{l}$  are required, provided that a cryogenic probe head is used. Access to a high-field spectrometer, such as the 900 MHz instrument used in this study will provide better signal-to-noise and reduce constraints on sample concentration (**Figure 8**). Given that Tau is a large disordered protein, its NMR spectra are characterized by considerable signal overlap, and a high-field NMR spectrometer will also be the best choice in terms of resolution (**Figure 8**). Nevertheless, the resonances corresponding to phosphorylation sites are in a distinct region of the spectrum and are easy to detect even with a 600 MHz spectrometer (Compare **Figures 9B** and **9C**). In addition, due to its disordered nature, the Tau protein is sensitive to proteolysis (**Figures 8B**).

Sterilization of buffers is advised to limit Tau degradation. Addition of protease inhibitors to the NMR sample helps to protect Tau against degradation during data acquisition periods that can last from hours to days, depending on the pulse sequence. Low pH (*i.e.* pH below 7.0) is required to avoid too fast exchange between protein protons and water protons, which leads to signal broadening. Sample pH must also be well controlled to ensure reproducibility of the spectra. Indeed, since pKa values of pSer and pThr are close to the optimal pH for NMR spectroscopy, chemical shifts of phosphorylated residues are very sensitive to pH variations. Adjustment of the pH of the NMR sample can be made directly using a pH-meter with a pH micro electrode, adapted to small volumes. Tau is a soluble protein and does not aggregate in standard conditions. Addition of polyanions, such as heparin sulfate, and incubation at 37 °C can initiate aggregation in Tau samples. In this case, given the solid nature of the aggregates, most of the resonances in the corresponding NMR spectrum broaden beyond detection. Even the phosphorylated Tau samples do not aggregate in the conditions described here for NMR data acquisition.

Compared to antibody analysis, NMR provides an overall view of PTMs. Mass spectrometry can also be used to identify the phosphorylation pattern of a protein sample. Isotopic labeling is not necessary for this technique, and required sample quantities are much smaller. However, characterization of a protein with multiple phosphorylations, such as Tau, remains challenging. Adjacent phosphorylations will produce isobaric peptides in bottom-up strategies of identification. Complete identification then needs MS/MS sequencing of the peptides obtained by sample proteolysis. An advantage of NMR consists in the intrinsic quantitative nature of the technique. The intensity of an NMR signal can be linked to the amount of the chemical group present at a specific site. We can thus define the proportion of chemical modification at each site. Most recent progress in MS applications have however shown that MS analysis of Tau multiple phosphorylation is feasible<sup>24</sup>, even in a quantitative manner after proper normalization<sup>25</sup>.

Here, we presented Tau phosphorylation by activated ERK2, but the methodology can be used for phosphorylation with other kinases as well<sup>6,7,26-28</sup>. Kinetic experiments can be performed, which can help to define kinase specificity towards a protein substrate<sup>28-31</sup>. Phosphorylation studies are not limited to recombinant kinases, and kinase activity of cell or tissue extracts can be analysed<sup>6,32,28</sup>. An interesting development is the use of *in-cell* NMR to study *in situ* modifications<sup>33,34</sup>. Conversely, NMR is also well-adapted to address phosphatase specificity, as was shown by studying the dephosphorylation of phosphorylated Tau by the PP2A phosphatase<sup>35</sup>. NMR spectroscopy can be applied to the characterization of kinase inhibitors by comparing the phosphorylation profile of the protein substrate in a 2D spectrum in presence of the inhibitor compound with the spectrum issued from a control experiment<sup>6</sup>.

The interest of using NMR spectroscopy, compared to the more sensitive MS techniques, resides in the wide range of applications exploiting the protocol described here, rather than on its analytical capacity alone. It has proven crucial to identify phosphorylation sites to be able to link specific phosphorylations with structural or functional modifications that were mainly studied using NMR. NMR spectroscopy of phosphorylated Tau samples allows to explore the structural impact of phosphorylation on both transient local secondary structures and on global rearrangement of the dynamic ensemble of modified Tau<sup>36,37</sup>. Functional aspects include the regulation of both interaction of Tau with protein partners<sup>7,38,39</sup> and aggregation by Tau phosphorylation<sup>6</sup>. The phosphorylated Tau sample characterized by NMR can be further used to decipher phospho-dependent interactions, for example with 14-3-3 proteins<sup>40</sup>, and engineered protein-protein interaction inhibitors<sup>41,42</sup>. NMR allows definition of interaction site(s) at the residue level, and of the dependence of this interaction on phosphorylation. Additionally, NMR spectroscopy of phosphorylated Tau is a key methodology to characterize the proline *cis:trans* isomerase Pin1, an important phospho-dependent enzyme involved in Tau regulation<sup>43-45</sup>. In addition, phosphorylation analysis by NMR can be applied not only to IDPs but also to globular proteins<sup>46</sup>. Finally, other types of Tau PTMs such as acetylations<sup>22,40,41</sup> can be studied by NMR. The protocols described here have proven crucial to better understand the functional and structural regulation of Tau in physiological and pathological conditions.

## Disclosures

The authors have nothing to disclose.

## Acknowledgements

The NMR facilities were funded by the Région Nord, CNRS, Pasteur Institute of Lille, European Community (FEDER), French Research Ministry and the University of Sciences and Technologies of Lille. We acknowledge support from the TGE RMN THC (FR-3050, France), FRABio (FR 3688, France) and Lille NMR and RPE Health and Biology core facility. Our research is supported by grants from the LabEx (Laboratory of Excellence) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease), EU ITN TASPPI and ANR BinAlz.

## References

- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83** (13), 4913-7 (1986).
- Hasegawa, M., Morishima-Kawashima, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K., & Ihara, Y. Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* **267** (24), 17047-54 (1992).
- Kopke, E., Tung, Y. C., Shaikh, S., Alonso, A. C., Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **268** (32), 24374-84 (1993).
- Wischik, C. M., Edwards, P. C., et al. Quantitative analysis of tau protein in paired helical filament preparations: implications for the role of tau protein phosphorylation in PHF assembly in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. **16** (3), 409-17-31 [pii] (1995).
- Prabakaran, S., Everley, R. A., et al. Comparative analysis of Erk phosphorylation suggests a mixed strategy for measuring phospho-form distributions. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 482 (2011).
- Landrieu, I., Lacoste, L., et al. NMR analysis of a Tau phosphorylation pattern. *J. Am. Chem. Soc.* **128** (11), 3575-83 (2006).
- Amniai, L., Barbier, P., et al. Alzheimer disease specific phosphoepitopes of Tau interfere with assembly of tubulin but not binding to microtubules. *FASEB J.* **23** (4), 1146-52 10.1096/fj.08-121590 (2009).
- Qi, H., Prabakaran, S., et al. Characterization of Neuronal Tau Protein as a Target of Extracellular Signal-regulated Kinase. *J. Biol. Chem.* **291** (14), 7742-7753 (2016).
- Bibow, S., Ozanne, V., Biernat, J., Blackledge, M., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. Structural impact of proline-directed pseudophosphorylation at AT8, AT100, and PHF1 epitopes on 441-residue tau. *J. Am. Chem. Soc.* **133** (40), 15842-5 (2011).
- Boulton, T. G., Yancopoulos, G. D., et al. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*. **249** (4964), 64-7 (1990).
- Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K., & Sturgill, T. W. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature*. **343** (6259), 651-3 (1990).
- Seger, R., Ahn, N. G., et al. Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88** (14), 6142-6 (1991).
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189** (1), 113-130 (1986).
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J., & Studier, F. W. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*. **56** (1), 125-135 (1987).
- Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166** (4), 557-580 (1983).
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227** (5259), 680-685 (1970).
- Bienkiewicz, E. A., & Lumb, K. J. Random-coil chemical shifts of phosphorylated amino acids. *J. Biomol. NMR*. **15** (3), 203-6 (1999).
- Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S., & Sykes, B. D. 1H, 13C and 15N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J. Biomol. NMR*. **5** (1), 67-81 (1995).
- Tamiola, K., Acar, B., & Mulder, F. A. A. Sequence-specific random coil chemical shifts of intrinsically disordered proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **132** (51), 18000-18003 (2010).
- Lippens, G., Wieruszkeski, J. M., et al. Proline-directed random-coil chemical shift values as a tool for the NMR assignment of the tau phosphorylation sites. *Chembiochem*. **5** (1), 73-8 (2004).
- Smet, C., Leroy, A., Sillen, A., Wieruszkeski, J. M., Landrieu, I., & Lippens, G. Accepting its random coil nature allows a partial NMR assignment of the neuronal Tau protein. *Chembiochem*. **5** (12), 1639-46 (2004).
- Mukrasch, M. D., Bibow, S., et al. Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol.* **7** (2), e34 10.1371/journal.pbio.1000034 (2009).
- Harbison, N. W., Bhattacharya, S., & Eliezer, D. Assigning backbone NMR resonances for full length tau isoforms: efficient compromise between manual assignments and reduced dimensionality. *PLoS One*. **7** (4), e34679 (2012).
- Morris, M., Knudsen, G. M., et al. Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat. Neurosci.* **18** (8), 1183-9 (2015).
- Mair, W., Muntel, J., et al. FLEXITau: Quantifying Post-translational Modifications of Tau Protein in Vitro and in Human Disease. *Analytical Chemistry*. **88** (7), 3704-3714 (2016).
- Leroy, A., Landrieu, I., et al. Spectroscopic studies of GSK3{beta} phosphorylation of the neuronal tau protein and its interaction with the N-terminal domain of apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* **285** (43), 33435-44 (2010).
- Theillet, F.-X., Smet-Nocca, C., et al. Cell signaling, post-translational protein modifications and NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR*. **54** (3), 217-236 (2012).
- Qi, H., Cantrelle, F.-X., et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of interaction of Tau with DNA and its regulation by phosphorylation. *Biochemistry*. **54** (7), 1525-1533 (2015).
- Cordier, F., Chaffotte, A., & Wolff, N. Quantitative and dynamic analysis of PTEN phosphorylation by NMR. *Methods*. **77-78**, 82-91 (2015).
- Thongwichian, R., Kosten, J., et al. A Multiplexed NMR-Reporter Approach to Measure Cellular Kinase and Phosphatase Activities in Real-Time. *J. Am. Chem. Soc.* **137** (20), 6468-6471 (2015).
- Smith, M. J., Marshall, C. B., Theillet, F.-X., Binolfi, A., Selenko, P., & Ikura, M. Real-time NMR monitoring of biological activities in complex physiological environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **32**, 39-47 (2015).
- Theillet, F. X., Rose, H. M., et al. Site-specific NMR mapping and time-resolved monitoring of serine and threonine phosphorylation in reconstituted kinase reactions and mammalian cell extracts. *Nat. Protoc.* **8** (7), 1416-32 nprot.2013.083 [pii] (2013).
- Bodart, J.-F., Wieruszkeski, J.-M., et al. NMR observation of Tau in *Xenopus oocytes*. *J. Magn. Reson.* **192** (2), 252-257 (2008).
- Lippens, G., Landrieu, I., & Hanouille, X. Studying posttranslational modifications by in-cell NMR. *Chem. Biol.* **15**, 311-2 (2008).
- Landrieu, I., Smet-Nocca, C., et al. Molecular implication of PP2A and Pin1 in the Alzheimer's disease specific hyperphosphorylation of Tau. *PLoS One*. **6**, e21521 PONE-D-11-05281 [pii] (2011).
- Sibille, N., Huvent, I., et al. Structural characterization by nuclear magnetic resonance of the impact of phosphorylation in the proline-rich region of the disordered Tau protein. *Proteins*. **80** (2), 454-462 (2012).

37. Schwalbe, M., Kadavath, H., *et al.* Structural Impact of Tau Phosphorylation at Threonine 231. *Structure*. **23** (8), 1448-1458 (2015).
38. Amniai, L., Lippens, G., & Landrieu, I. Characterization of the AT180 epitope of phosphorylated Tau protein by a combined nuclear magnetic resonance and fluorescence spectroscopy approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **412** (4), 743-6 (2011).
39. Sottejeau, Y., Bretteville, A., *et al.* Tau phosphorylation regulates the interaction between BIN1's SH3 domain and Tau's proline-rich domain. *Acta Neuropathol. Commun.* **3** (1), 58 (2015).
40. Joo, Y., Schumacher, B., *et al.* Involvement of 14-3-3 in tubulin instability and impaired axon development is mediated by Tau. *FASEB J.* **29** (10), 4133-44 (2015).
41. Smet, C., Duckert, J. F., *et al.* Control of protein-protein interactions: structure-based discovery of low molecular weight inhibitors of the interactions between Pin1 WW domain and phosphopeptides. *J. Med. Chem.* **48** (15), 4815-23 (2005).
42. Milroy, L.-G., Bartel, M., *et al.* Stabilizer-Guided Inhibition of Protein-Protein Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54** (52), 15720-15724 (2015).
43. Smet, C., Sambo, A. V., *et al.* The peptidyl prolyl cis/trans-isomerase Pin1 recognizes the phospho-Thr212-Pro213 site on Tau. *Biochemistry*. **43** (7), 2032-40 (2004).
44. Landrieu, I., Smet, C., *et al.* Exploring the molecular function of PIN1 by nuclear magnetic resonance. *Curr Protein Pept Sci.* **7** (3), 179-94 (2006).
45. Lippens, G., Landrieu, I., & Smet, C. Molecular mechanisms of the phospho-dependent prolyl cis/trans isomerase Pin1. *FEBS J.* **274** (20), 5211-22 (2007).
46. Smet-Nocca, C., Launay, H., Wieruszkeski, J. M., Lippens, G., & Landrieu, I. Unraveling a phosphorylation event in a folded protein by NMR spectroscopy: phosphorylation of the Pin1 WW domain by PKA. *J. Biomol. NMR.* **55**, 323-37 (2013).
47. Smet-Nocca, C., Wieruszkeski, J. M., Melnyk, O., & Benecke, A. NMR-based detection of acetylation sites in peptides. *J. Pept. Sci.* **16** (8), 414-23 (2010).
48. Kamah, A., Huvent, I., *et al.* Nuclear magnetic resonance analysis of the acetylation pattern of the neuronal Tau protein. *Biochemistry*. **53** (18), 3020-32 (2014).



# Semi-synthesis of a tag-free O-GlcNAcylated tau protein by sequential chemoselective ligation<sup>§</sup>

Sergej Schwagerus,<sup>a,b,†</sup> Oliver Reimann,<sup>a,c,‡</sup> Clement Despres,<sup>d,e</sup>  
Caroline Smet-Nocca<sup>d,e</sup> and Christian P. R. Hackenberger<sup>a,b,\*</sup>

In this paper, the first semi-synthesis of the Alzheimer-relevant tau protein carrying an O-GlcNAcylation is demonstrated by using sequential chemoselective ligation. The 52-amino acid C-terminus of tau was obtained by native chemical ligation between two synthetic peptide fragments, one carrying the O-GlcNAc moiety on Ser400, which has recently been demonstrated to inhibit tau phosphorylation and to hinder tau oligomerization, and the other equipped with a photocleavable biotin handle. After desulfurization to deliver a native alanine at the ligation junction, the N-terminal cysteine was unmasked, and the peptide was further used for expressed protein ligation to generate the full-length tau protein, which was purified by a photocleavable biotin tag. We thus provide a synthetic route to obtain a homogenous tag-free O-GlcNAcylated tau protein that can further help to elucidate the significance of posttranslational modification on the tau protein and pave the way for evaluating possible drug targets in Alzheimer's disease. Copyright © 2016 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

**Keywords:** native chemical ligation; protein synthesis; tag-free purification; tau protein; O-GlcNAc

## Introduction

The tau protein plays an important role in the regulation of tubulin polymerization, microtubule stabilization, and thus in the integrity of the neuronal network. In Alzheimer's disease (AD), tau becomes abnormally decorated by phosphate groups, as tau from normal brains contains usually two to three residues of phosphate, while tau contains threefold to fourfold amount of phosphate in patients with AD [1]. In consequence to its hyperphosphorylation, tau detaches from microtubules and gains toxicity by its aggregation to oligomers, paired helical filaments (PHFs), and further so-called neurofibrillary tangles (NFTs), a prominent molecular hallmark in AD [2,3]. In this context, several phosphorylation sites are closely related to the progression of AD [4], whereas the correlation between the numbers of NFTs in patients' brains and the severity of dementia symptoms further highlights the important role of tau pathology in AD [5].

Another important posttranslational modification (PTM) that occurs on the tau protein is the O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation), which inhibits tau phosphorylation in a site-specific manner [6]. This reciprocal relationship between tau phosphorylation and O-GlcNAcylation has been studied *in vitro* [7], *in cellulo* [8], and *in vivo* [6], focusing on the amino acid Ser400, which serves both as a glycosylation and phosphorylation site. This amino acid is located within the so-called PHF epitope 1 (PHF-1) in the C-terminal region of tau, a site often hyperphosphorylated in brains of Alzheimer patients [9]. O-GlcNAcylation of Ser400 was recently found as the unique O-GlcNAc site within endogenous tau protein in both wild-type and transgenic mice expressing human amyloid precursor protein (hAPP) indicating that tau is not extensively O-GlcNAcylated under physiological and pathological conditions

[10]. Other potential sites for O-GlcNAcylation have been identified on Ser208 and Ser238 [7] as well as on Thr123, Ser409, Ser412, and Ser413 [11], but their biological relevance and *in vivo* occurrence remains to be proven [10]. In contrast, Ser400 O-GlcNAcylation was shown to play a direct role in tau aggregation both *in vitro* and *in vivo*. Treating tau transgenic mice with an O-GlcNAc hydrolase (OGA) inhibitor prevents from tau-induced neurodegeneration and neuronal loss without modifying tau phosphorylation [12,13], while Ser400 O-GlcNAcylation reduces PHF-like aggregation *in vitro* in the presence of heparin without

\* Correspondence to: Christian P. R. Hackenberger, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Campus Berlin-Buch Robert-Roessle-Str. 10, 13125 Berlin, Germany. E-mail: hackenbe@fmp-berlin.de

† These authors contributed equally.

§ This article is dedicated to Prof. Steve Kent on the occasion of his 70th birthday.

a Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Campus Berlin-Buch Robert-Roessle-Str. 10, 13125, Berlin, Germany

b Department Chemie, Humboldt Universität zu Berlin, Brook-Taylor-Strasse 2, 12489, Berlin, Germany

c Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie, Takustrasse 3, 14195, Berlin, Germany

d UMR 8576 – UGSF, Univ. Lille, CNRS, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000, Lille, France

e CNRS, UMR 8576, F-59000, Lille, France

altering the conformation of the monomeric form of a short tau fragment (residues 353–408) [12,14]. In these studies, the method involved to provide *O*-GlcNAc-modified tau combines an enzymatic approach with the coexpression of tau and *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase (OGT) proteins in *Escherichia coli* (*E. coli*) to an extensive purification procedure. However, whereas this approach affords an *O*-GlcNAc-modified, enriched tau protein to near stoichiometric amounts, the sample exhibits an *O*-GlcNAc distribution centered on two *O*-GlcNAc moieties [11,14].

*O*-linked  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminylation is a non-template-driven PTM installed by a single enzyme, namely, OGT. Homogeneously glycosylated proteins to study the effects of this PTM cannot easily be accessed by enzymatic approaches [15]. OGT can modify several hydroxyl-containing amino acids within a protein [16] with low *O*-GlcNAcylation rates in most cases [17–19] as exemplified by the case of tau protein. Furthermore, as OGT is the sole enzyme involved with its OGA counterpart in the *O*-GlcNAc cycling of the whole *O*-GlcNAc proteome in human cells, the recruitment of regulatory subunits could be required to achieve substrate specificity, which complicates the enzymatic modification of protein substrates with recombinant OGT [20,21]. In order to introduce site-specifically *O*-GlcNAcylated residues to full-length proteins, established methods such as amber stop codon suppression alone are not generally applicable [22]. Instead of a direct incorporation of glycosylated amino acids into proteins by biochemical methods, a chemical modification approach to generate protein glycoconjugates was described for instance by the incorporation of alkyne-containing amino acids into proteins by amber suppression or auxotrophic expression, followed by copper-catalyzed Huisgen cycloaddition [23]. Another approach was proposed, in which dehydroalanine is generated from Cys residues, enabling conjugation of thiol-nucleophiles via conjugate addition to full-length proteins [24,25]. However, the formation of dehydroalanine renders proteins bearing the installed PTMs on amino acids with racemic mixtures. Moreover, conjugate additions deliver glycan building blocks attached to all surface-exposed Cys residues.

Consequently, the most powerful methods to site-specifically install natural occurring PTMs on proteins are native chemical ligation (NCL) [26] and expressed protein ligation (EPL) [27,28]. Thereby, the installation of native *O*-GlcNAcylation can be ensured to access, for instance, libraries of glycoforms of human interleukin-6 for extensive biochemical and biophysical studies [29] or dissect the ability of *O*-GlcNAcylation to block aggregation and toxicity of the protein  $\alpha$ -synuclein in association to Parkinson's disease [30].

We herein present the first semi-synthesis of the tau protein with a single *O*-GlcNAcylation in position Ser400 by a combination of NCL and EPL and its purification by a photocleavable biotin tag. In this proof-of-principle study, the C-terminal portion of the protein was obtained by solid phase peptide synthesis (SPPS) and NCL, followed by radical initiated homogeneous desulfurization [31]. In contrast to the linear synthesis of the peptide, this methodology gave rise to sufficient amounts of *O*-GlcNAcylated peptide that was further applied for EPL to  $^{13}\text{C}$ -labeled and  $^{15}\text{N}$ -labeled expressed protein thioester, generated by intein-fusion in *E. coli* [27]. With this successful synthesis, we paved the way to further investigate structural and functional consequences of *O*-GlcNAcylation on the tau protein.

## Materials and Methods

**For General Information and Protein Expression, see Supporting Information.**

### *Synthesis of thiazolidine-tau(GlcNAc-Ser400)[391-425]-Nbz (1).*

The synthesis of peptide **1** was carried out on a Dawson Dbz NovaSynTGR resin (0.22 mmol/g) in a 0.1 mmol scale on an Activo-P11 synthesizer applying 10 eq. amino acid, *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uranium hexafluorophosphate, *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphate (HBTU), hydroxybenzotriazole (HOBt), and diisopropylethylamine (DIPEA). The coupling of Fmoc-Ser( $\beta$ -D-GlcNAc(Ac)<sub>3</sub>)-OH was carried out with 2 eq. of the amino acid, HBTU, HOBt, and DIPEA in *N,N*-dimethylformamide (DMF) over a time of 6 h. The rest of the amino acids were coupled manually in a tenfold excess of amino acids and coupling reagents for 1–2 h while the coupling of Val398 and Val399 proceeded over 12 h each coupling using 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) and 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU) as coupling reagents. The resin was activated with *p*-nitrophenyl chloroformate (100 mg, 0.5 mmol, 5 eq.) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  for 40 min at rt. Hereafter, the resin was washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5  $\times$  5 ml) and subsequently exposed to a 0.5 M solution of DIPEA in DMF for 20 min at rt. The peptide was cleaved off the resin by a mixture of trifluoroacetic acid (TFA)/dithiothreitol (DTT)/triisopropylsilane (TIS)/thioanisole (95/2/2/1) in 3 h. The desired peptide **1** was purified by preparative HPLC (Method E) and obtained with a yield of 3% (12.6 mg, 2.9  $\mu\text{mol}$ ); molar mass peptide = 4304.0 Da; ESI-MS: *m/z*: 1435.57 [*M* + 3*H*]<sup>3+</sup> (calcd. *m/z*: 1435.67); 1076.94 [*M* + 4*H*]<sup>4+</sup> (calcd. *m/z*: 1077.24).

### *Synthesis of tau(biotinyl-photolinker-Lys438)[426-441] (3).*

The synthesis of peptide **3** was performed manually on H-Leu-HMPB NovaPEG resin (0.49 mmol/g) in a 0.1 mmol scale. Lys438 was introduced with an orthogonal allyloxycarbonyl (Alloc) protection on the side chain, which was removed after SPPS by the addition of a 4 ml solution of chloroform/acetic acid/*N*-methylmorpholine (37:2:1, v/v) to the resin, and 3 eq. tetrakis-(triphenylphosphine)palladium (0) were added. Then, the suspension was stirred under nitrogen atmosphere. Photolinked biotin was generated by the addition of the bifunctional nitrobenzyl-linker (**2**) (69.8 mg, 0.2 mmol, 2 eq.) and DIPEA (85  $\mu\text{l}$ , 0.5 mmol, 5 eq.) in 4 ml DMF [32,33]. The reaction was shaken for 20 h at rt and then washed with DMF (5x),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5x), DMF (5x). Afterward, a solution containing D-(+)-biotin (122 mg, 0.4 mmol, 4 eq.), HOBt (54 mg, 0.4 mmol, 4 eq.), diisopropylcarbodiimide (DIC, 62  $\mu\text{l}$ , 0.4 mmol, 4 eq.), and tri-*n*-butylphosphine (125  $\mu\text{l}$ , 0.5 mmol, 5 eq.) in *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP) was added, and the mixture was shaken for 90 min at rt. After washing the resin, the peptide was cleaved by the addition of 4 ml TFA/DTT/TIS/thioanisole (95/2/2/1, v/v) solution over 3 h. The yield after preparative HPLC purification (Method E) was 3% (5.9 mg, 2.9  $\mu\text{mol}$ ); molar mass peptide = 2038.9 Da; ESI-MS: *m/z*: 1020.37 [*M* + 2*H*]<sup>2+</sup> (calcd. *m/z*: 1020.47; *m/z*: 680.6509 [*M* + 3*H*]<sup>3+</sup> (calcd. *m/z*: 680.6519).

### *NCL between peptides 1 and 3.*

Ligation buffer (6 M Guanidine hydrochloride (Gn·HCl), 200 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 200 mM 4-mercaptophenylacetic acid (MPAA), 100 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP·HCl)) was prepared and the

pH set to 7.5 by the addition of conc. NaOH solution. Peptides **1** (12.5 mg, 2.9  $\mu\text{mol}$ , 1.3 eq.) and **3** (4.5 mg, 2.2  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) were dissolved in 1.2 ml (concentration of peptide **1** was 2.4 mM) ligation buffer and the pH was quickly readjusted to 7.5. The ligation was allowed to proceed for 2 h at rt, while the reaction flask was constantly flooded with nitrogen gas. The ligation product (**4**) was isolated by semi-preparative HPLC (Method D, elution at 45.2% B, 28.5 min) and obtained with a yield of 36% (4.92 mg, 0.79  $\mu\text{mol}$ ); molar mass peptide = 6169.8758 Da; HRMS:  $m/z$ : 1542.9698 [ $M + 4H$ ] $^{4+}$  (calcd.  $m/z$ : 1542.9762); 1234.8666 [ $M + 5H$ ] $^{5+}$  (calcd.  $m/z$ : 1234.5824).

#### Desulfurization and deprotection of peptide **4**

A mixture of EtSH (750  $\mu\text{l}$ ), 0.5 M TCEP·HCl (1.12 ml, pH 7.0), *t*-BuSH (75  $\mu\text{l}$ ) and a 0.1 M solution radical initiator 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane]dihydrochloride (VA-044, 38  $\mu\text{l}$ ) was prepared in a 15 ml Falcon tube and equipped with a stirring bar. Hereafter, the peptide **4** (4 mg, 0.66  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in this mixture, and the Falcon tube was put into a water bath of 37 °C. The reaction mixture was stirred for 2 h, after which the complete desulfurization was observed by HPLC-MS. The peptide was directly purified from the mixture by semi-preparative HPLC (Method D) and the desulfurized peptide was obtained with a yield of 40% (1.7 mg, 0.27  $\mu\text{mol}$ ). To deprotect the GlcNAc moiety, the lyophilized product was dissolved in methanol (5 ml) containing 200  $\mu\text{l}$  acetonitrile. The pH was set to 9.5 by addition of a 30% sodium methanolate in methanol solution, and the mixture was stirred for 3 h at rt. Afterward, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the peptide was dissolved in a methoxyamine hydrochloride solution (0.2 M, pH 3.8, 3 ml) to deprotect the thiazolidine (Thz) group to the desired Cys. The resulting product (**5**) was lyophilized and investigated by HPLC and MS; molar mass peptide = 5995.86 Da; MS:  $m/z$ : 1501.38 [ $M + 4H$ ] $^{4+}$  (calcd.  $m/z$ : 1500.48). Because the salts from the deprotection of the GlcNAc moiety and the Thz group were not considered harmful for further reactions, no further purification was carried out, and the yield was determined according to the desulfurized peptide (1.6 mg, 0.27  $\mu\text{mol}$ ).

#### EPL and purification

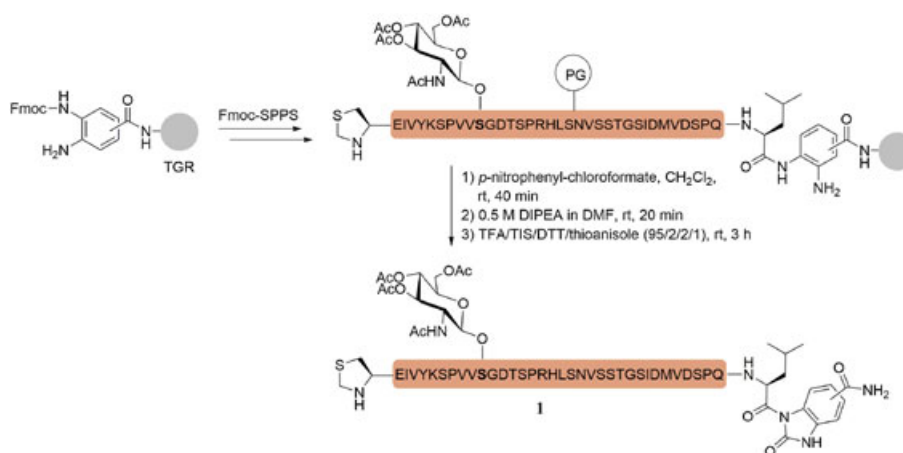
A volume of 3 ml settled glutathione beads containing the labeled fusion-protein tau-intein-GST was washed (10  $\times$  3 mL)

with equilibration buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1% Triton X-100, 10 mM TCEP). Subsequently, the beads were quickly flushed once with cleavage buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM TCEP, 100 mM 4-(mercaptomethyl)benzoic acid (MMBA)). Afterward, peptide **5** (1.6 mg, 0.27  $\mu\text{mol}$ ) was poured onto the glutathione beads in 3 ml cleavage buffer, and the suspension was left rocking at 4 °C for 72 h to let the EPL proceed. Subsequently, the filtered mixture was poured directly onto 3 mL of streptavidin-coated agarose beads (binding capacity > 85 nmol/mL settled resin) in an 8 mL reactor and incubated for 1 h at rt on a rocker. The beads were subsequently washed 10 times with a reducing buffer (20 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM DTT). In a subsequent step, the beads were covered with 3 mL of the reducing buffer, and the immobilized EPL product was eluted by UV light irradiation as reported previously to remove the unreacted tau[1-389] from the reaction mixture [32]. For this purpose, the reactor was placed in 20 cm distance to the light source (for details to the light source, see Supporting Information) and was irradiated 3 times for 10 min at 297 nm while stirring. In a final step, the unreacted excess peptide was removed by separation on a desalting column (GE Healthcare Life Sciences, HiTrap Desalting 5 ml column, Sephadex G-25 material), before the sample was frozen at -20 °C. The ligation product (**7**) was obtained with a yield of approx. 1 mg as determined by UV absorption (NanoDrop, ND-1000 spectrophotometer, Thermo Scientific).

## Results and Discussion

### Solid Phase Peptide Synthesis of the NCL Fragments

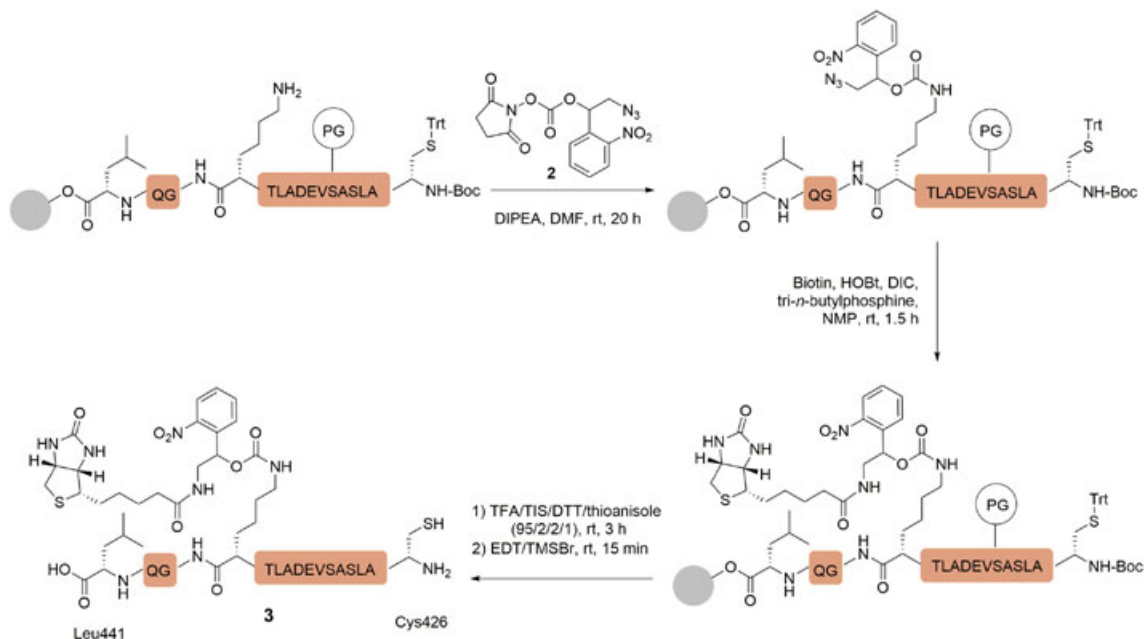
The semi-synthesis of *O*-GlcNAcylated tau protein was developed using NCL and EPL approaches. Because the synthesis of the 52-amino acid *O*-GlcNAcylated C-terminus of tau on solid support gave the product only in a very low purity (Figure S1, Supporting Information), a sequential NCL protocol from two peptide segments was applied. Because the ligation site between tau[390-410] and tau[411-441] at Asn and  $\beta$ -mercaptovaline suffered from thioester hydrolysis and



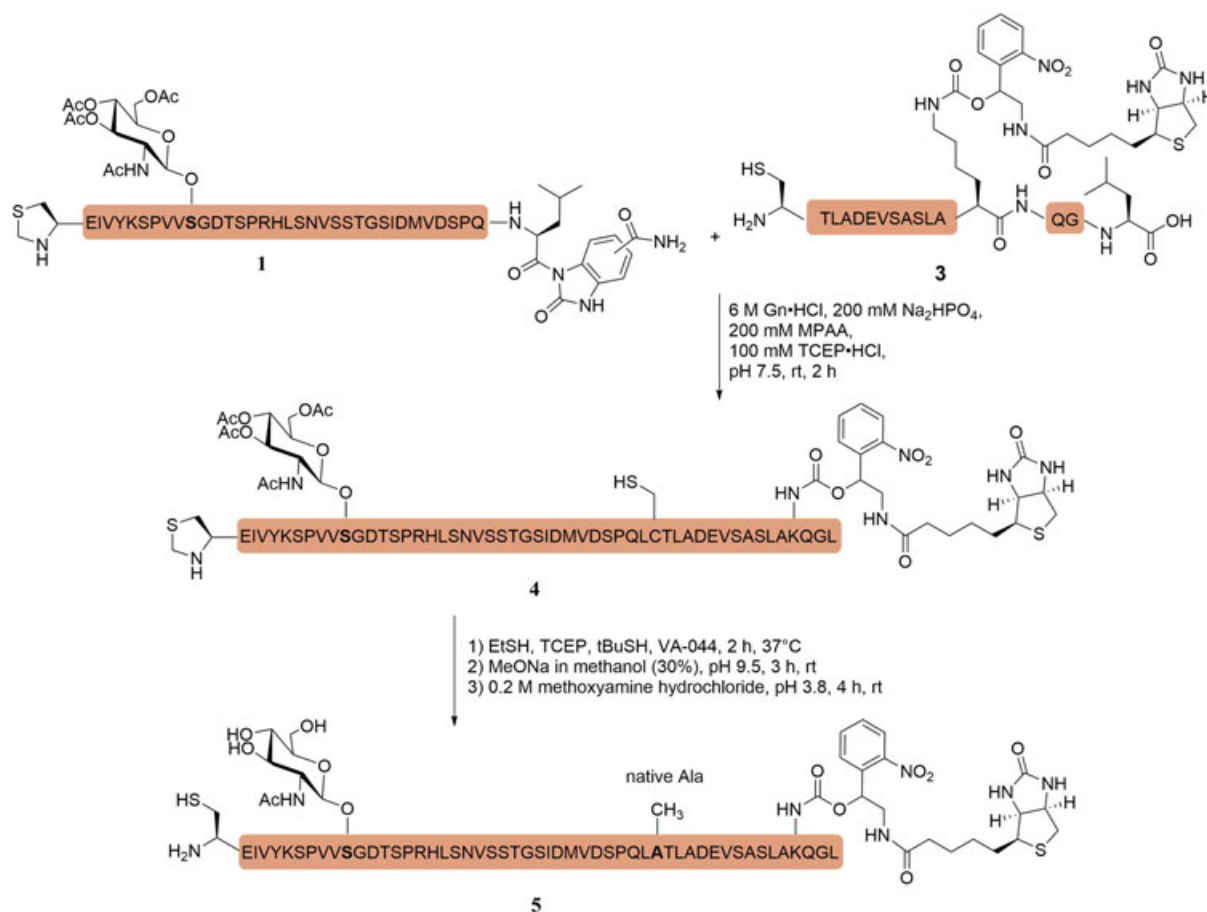
**Scheme 1.** Synthesis of peptide Thz-tau(GlcNAc-Ser400)[391-425]-Nbz (**1**).

predominantly aspartimide formation [34], a ligation site between Leu425 and Ala426 was applied as described previously [32]. In here, the O-GlcNAcylated tau[391–425] fragment (1)

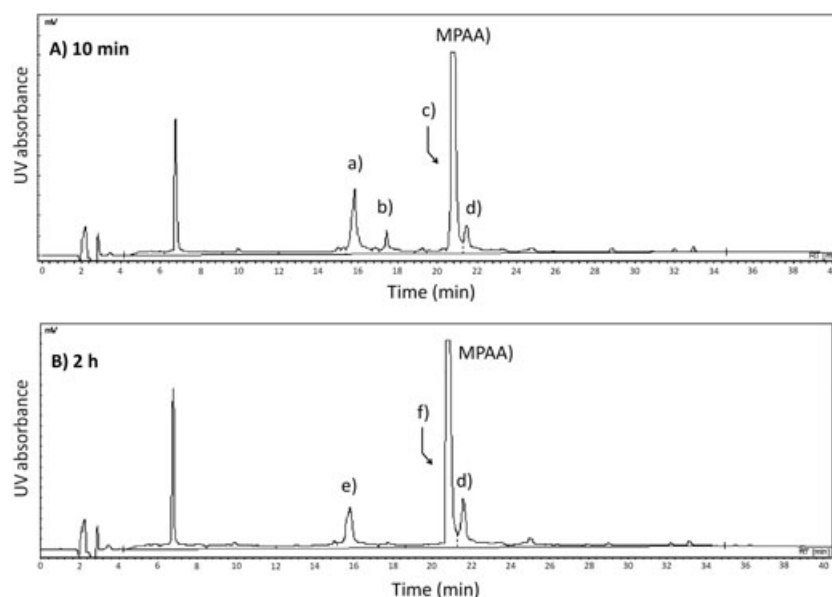
(Scheme 1) was synthesized using a method developed by Dawson *et al.* [35]. After the loading of Fmoc-Leu-OH on the 4-diaminobenzoic acid (Dbz) NovaSynTGR resin, no additional



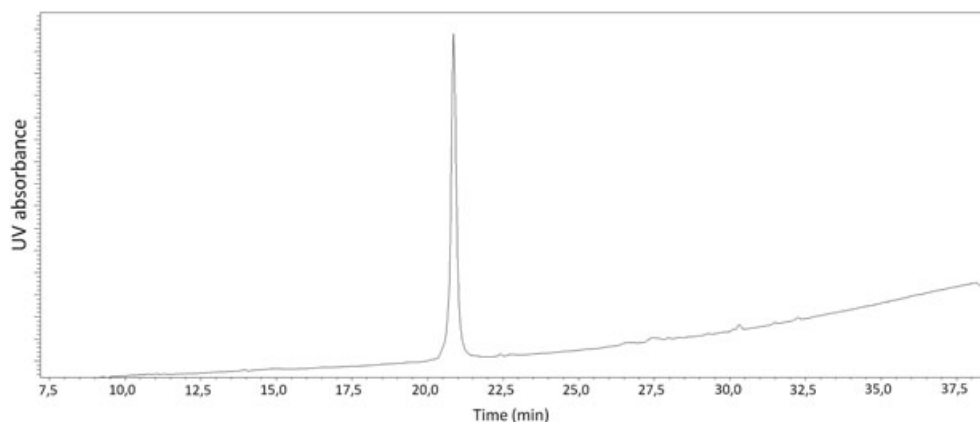
**Scheme 2.** Synthesis of tau(biotinyl-photolinker-Lys438)[426-441] (3) [32].



**Scheme 3.** Native chemical ligation between peptides (1) and (3) yielding O-GlcNAcylated C-terminal tau (4).



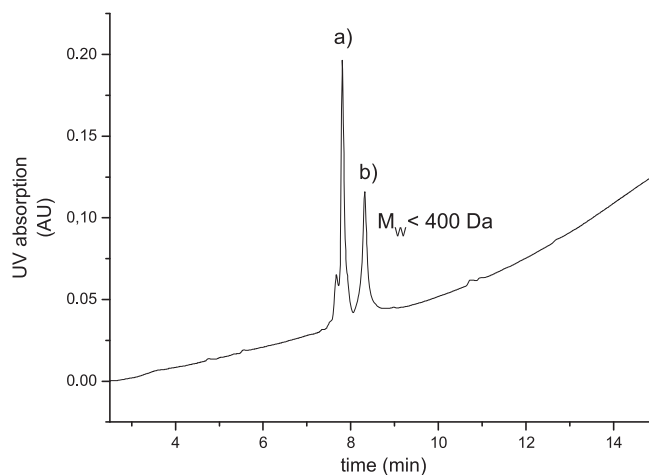
**Figure 1.** (A) NCL reaction monitored after 10 min: (a) Nbz-thioester precursor peptide **1**; (b) MPAA thioester of peptide **1**; (c) underneath the MPAA peak lies peptide **3**, as determined by mass spectrometry; (d) ligation product (**4**). (B) NCL reaction monitored after 2 h: (e) hydrolyzed peptide **1**, bearing a free acid at the C-terminus; (f) peptide **3** containing oxidized methionine; (d) ligation product (**4**).



**Figure 2.** HPLC-UV trace of purified ligation product (**4**).

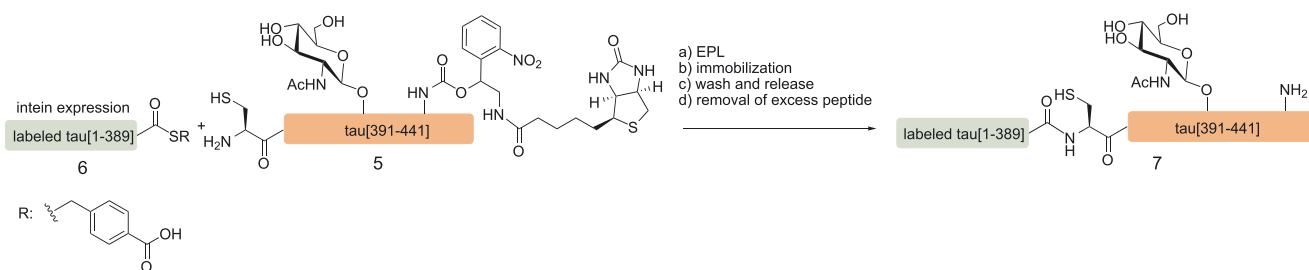
coupling on the second free amino group was observed and no further protections were necessary. The Fmoc-Ser( $\beta$ -D-GlcNAc (Ac)<sub>3</sub>-OH) building block was synthesized according to the literature [36–38] (see Supporting Information, compound **19**) and was manually coupled using HBTU, HOBt, and DIPEA in DMF within 6 h. The introduction of an N-terminal Thz on tau (GlcNAc-Ser400)[391–425]-Dbz was followed by converting the Dbz to *N*-Acyl-benzimidazolinone (Nbz) by addition of *p*-nitrophenyl chloroformate. After HPLC purification, the activated GlcNAcylated tau fragment (**1**) could be obtained in 3% overall yield including SPPS.

The second tau peptide for NCL was synthesized on Fmoc-Leu-HMPB Nova PEG resin carrying an Alloc protected Lysine at position 438. Following to the N-terminal Cys coupling, the Lys438 was deprotected under Pd-catalysis. Subsequently, a synthesized light cleavable linker (**2**) [32,33] (see Supporting Information) was incorporated on the free amino group (Scheme 2). The reduction of the azido group and the biotin coupling were conducted in a one-pot reaction. The

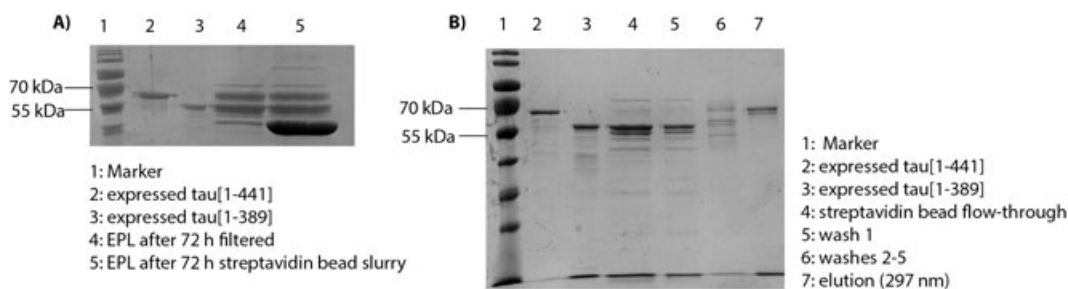


**Figure 3.** HPLC-UV trace of desulfurized and deacetylated peptide (**5**). Two peaks were observed: (a) desulfurized and deacetylated product (**5**) ( $m/z$ : 1501.38 [ $M + 4H$ ]<sup>4+</sup>; calcd.  $m/z$ : 1500.48); (b) unidentified compound with a molecular weight < 400 Da.





**Scheme 4.** Expressed protein ligation between  $^{13}\text{C}$ -labeled/ $^{15}\text{N}$ -labeled tau[1-389] (**6**) and tau[GlcNAc-Ser400][390-441] (**5**).



**Figure 4.** Coomassie stained SDS-PAGE gel (12%) showing (A) the progress of the EPL reaction after 72 h and (B) the purification of the ligation with product (**7**) in lane 7.

tau[426-441] fragment (**3**) containing this purification tag was obtained in 3% yield after HPLC purification.

### Native Chemical Ligation and Deprotection

The ligation between peptides **1** and **3** was carried out under argon atmosphere at pH 7.5 with a slight excess of 1.3 eq. of fragment **1** (Scheme 3). After 2 h reaction time, no further changes in the UV-chromatograms could be monitored (Figure 1). Due to hydrolysis of **1**, the NCL conversion was moderate, peptide **4** was obtained after HPLC purification with an isolated yield of 36%, and high purity was achieved (Figure 2). To perform the desulfurization on the ligation product (**4**), the homogeneous desulfurization protocol including the use of radical initiator VA-044 was applied. The desulfurization of the unprotected thiol was complete after 2 h as confirmed by LCMS-UV. After the HPLC purification, the deprotection of the *O*-GlcNAc moiety on the desulfurized peptide was carried out at pH 9.5 with 30% sodium methoxide in methanol over 3 h. After the solvent was removed by evaporation, the Thz group was deprotected by dissolving the peptide in methoxyamine hydrochloride solution at pH 3.8. The lyophilized product (**5**) contained an unidentified impurity without distinct masses above 400 Da (Figure 3). Assuming that this impurity does not disturb the following EPL, peptide **5** was used without further purification and isolation.

### Expressed Protein Ligation and Purification

The tau[1-389] fragment was expressed containing  $^{13}\text{C}$ -labeling and  $^{15}\text{N}$ -labeling for further application as an intein-GST fusion-protein in *E. coli*. The ligation of the expressed protein (**6**) was carried out in the presence of 4-(mercaptomethyl)benzoic acid

(MMBA) with a slight excess of the 52-amino acid long *O*-GlcNAcylated C-terminal tau peptide (**5**) in 3 days (Scheme 4). This particular benzylic thiol MMBA was shown to efficiently further ligations at neutral pH, while the formed MMBA thioesters are quite resistant to hydrolysis [29]. This stability is more important when longer reaction times are required like in EPL reactions often the case. After 72 h EPL reaction time at 4 °C, the filtrated mixture was loaded onto streptavidin-coated agarose beads and irradiated with 297 nm UV light as described in the literature [32]. The released *O*-GlcNAcylated protein (**7**) was successfully separated from the unreacted labeled protein and was identified by SDS-PAGE. The band size was as expected in accordance with the unglycosylated tau[1-441] (Figure 4). The unreacted fragment was subsequently removed and additional MALDI MS analysis confirmed the correct mass of the ligated product tau (GlcNAc-Ser400)[1-441] (**7**) (Figure S9).

### Conclusion

In summary, we were able to show the first successful semi-synthesis of the Alzheimer-relevant tau protein containing a homogeneous *O*-GlcNAcylation site at Ser400. Importantly, this site is the sole consensual *O*-GlcNAc site on tau protein that has been found in several studies aiming at describing the tau *O*-GlcNAcylation pattern as herein earlier explained. Thereby, native chemical ligation was combined with expressed protein ligation, both powerful tools for protein engineering. Furthermore, we were able to isolate the  $^{13}\text{C}$ -labeled/ $^{15}\text{N}$ -labeled protein **7** by using a traceless cleavable biotin-photo-linker for purification on streptavidin-coated agarose beads. We strongly believe that this isotopically labeled, full-length protein will allow the investigation of structural and functional changes that result from a specific *O*-GlcNAcylation of tau, which will be reported in due course.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the support from the DFG (SFB 765, SPP1623), the Fonds der Chemischen Industrie, the Einstein Foundation, the Boehringer-Ingelheim Foundation (Plus 3 Award), and the LabEx (Laboratory of Excellence) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease).

## References

- 1 Kopke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**: 24374.
- 2 Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Merkle RK, Gong CX. Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 2002; **512**: 101.
- 3 Martin L, Latypova X, Terro F. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 2011; **58**: 458.
- 4 Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2002; **103**: 26.
- 5 Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 1992; **42**: 631.
- 6 Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, Whitworth GE, Stubbs KA, McEachern EJ, Davies GJ, Vocadlo DJ. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat. Chem. Biol.* 2008; **4**: 483.
- 7 Smet-Nocca C, Broncel M, Wieruszeski JM, Tokarski C, Hanouille X, Leroy A, Landrieu I, Rolando C, Lippens G, Hackenberger CP. Identification of O-GlcNAc sites within peptides of the tau protein and their impact on phosphorylation. *Mol. Biosyst.* 2011; **7**: 1420.
- 8 Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; **101**: 10804.
- 9 Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, Marko D, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Biernat J, Wu YZ, Mandelkow EM, Eisenbrand G, Meijer L. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 251.
- 10 Morris M, Knudsen GM, Maeda S, Trinidad JC, Ioanoviciu A, Burlingame AL, Mucke L. Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat. Neurosci.* 2015; **18**: 1183.
- 11 Yuzwa SA, Yadav AK, Skorobogatko Y, Clark T, Vosseller K, Vocadlo DJ. Mapping O-GlcNAc modification sites on tau and generation of a site-specific O-GlcNAc tau antibody. *Amino Acids* 2011; **40**: 857.
- 12 Yuzwa SA, Shan X, Macauley MS, Clark T, Skorobogatko Y, Vosseller K, Vocadlo DJ. Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat. Chem. Biol.* 2012; **8**: 393.
- 13 Graham DL, Gray AJ, Joyce JA, Yu D, O'Moore J, Carlson GA, Shearman MS, Dellovade TL, Hering H. Increased O-GlcNAcylation reduces pathological tau without affecting its normal phosphorylation in a mouse model of tauopathy. *Neuropharmacology* 2014; **79**: 307.
- 14 Yuzwa SA, Cheung AH, Okon M, McIntosh LP, Vocadlo DJ. O-GlcNAc modification of tau directly inhibits its aggregation without perturbing the conformational properties of tau monomers. *J. Mol. Biol.* 2014; **426**: 1736.
- 15 Koeller KM, Wong CH. Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 2001; **409**: 232.
- 16 Lazarus MB, Nam Y, Jiang J, Sliz P, Walker S. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature* 2011; **469**: 564.
- 17 Khidekel N, Arndt S, Lamarre-Vincent N, Lippert A, Poulin-Kerstien KG, Ramakrishnan B, Qasba PK, Hsieh-Wilson LC. A chemoenzymatic approach toward the rapid and sensitive detection of O-GlcNAc posttranslational modifications. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; **125**: 16162.
- 18 Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. Exploring the O-GlcNAc proteome: direct identification of O-GlcNAc-modified proteins from the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; **101**: 13132.
- 19 Wang Z, Udeshi ND, O'Malley M, Shabanowitz J, Hunt DF, Hart GW. Enrichment and site mapping of O-linked N-acetylglucosamine by a combination of chemical/enzymatic tagging, photochemical cleavage, and electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 2010; **9**: 153.
- 20 Nagel AK, Ball LE. O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase: achieving target substrate specificity. *Amino Acids* 2014; **46**: 2305.
- 21 Cheung WD, Sakabe K, Housley MP, Dias WB, Hart GW. O-linked beta-N-acetylglucosaminyltransferase substrate specificity is regulated by myosin phosphatase targeting and other interacting proteins. *J. Biol. Chem.* 2008; **283**: 33935.
- 22 Park HS, Hohn MJ, Umehara T, Guo LT, Osborne EM, Benner J, Noren CJ, Rinehart J, Soll D. Expanding the genetic code of *Escherichia coli* with phosphoserine. *Science* 2011; **333**: 1151.
- 23 Artner LM, Merkel L, Bohlke N, Beceren-Braun F, Weise C, Dervede J, Budisa N, Hackenberger CP. Site-selective modification of proteins for the synthesis of structurally defined multivalent scaffolds. *Chem. Commun.* 2012; **48**: 522.
- 24 Chalker JM, Lercher L, Rose NR, Schofield CJ, Davis BG. Conversion of cysteine into dehydroalanine enables access to synthetic histones bearing diverse post-translational modifications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012; **51**: 1835.
- 25 Chalker JM, Gunnoo SB, Boutureira O, Gerstberger SC, Fernandez-Gonzalez M, Bernardes GJL, Griffin L, Hailu H, Schofield CJ, Davis BG. Methods for converting cysteine to dehydroalanine on peptides and proteins. *Chem. Sci.* 2011; **2**: 1666.
- 26 Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent SB. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* 1994; **266**: 776.
- 27 Muir TW, Sondhi D, Cole PA. Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; **95**: 6705.
- 28 Hackenberger CP, Schwarzer D. Chemoselective ligation and modification strategies for peptides and proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2008; **47**: 10030.
- 29 Reif A, Siebenhaar S, Troster A, Schmalzlein M, Lechner C, Velisetty P, Gottwald K, Pohner C, Boos I, Schubert V, Rose-John S, Unverzagt C. Semisynthesis of biologically active glycoforms of the human cytokine interleukin 6. *Angew. Chem.-Int. Ed.* 2014; **53**: 12125.
- 30 Marotta NP, Lin YH, Lewis YE, Ambrosio MR, Zaro BW, Roth MT, Arnold DB, Langen R, Pratt MR. O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the protein alpha-synuclein associated with Parkinson's disease. *Nat. Chem.* 2015; **7**: 913.
- 31 Wan Q, Danishefsky SJ. Free-radical-based, specific desulfurization of cysteine: a powerful advance in the synthesis of polypeptides and glycopolypeptides. *Angew. Chem.* 2007; **119**: 9408.
- 32 Reimann O, Smet-Nocca C, Hackenberger CP. Traceless purification and desulfurization of tau protein ligation products. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015; **54**: 306.
- 33 Bindman N, Merckx R, Koehler R, Herrman N, van der Donk WA. Photochemical cleavage of leader peptides. *Chem. Commun. (Camb.)* 2010; **46**: 8935.
- 34 Reimann O, Glanz M, Hackenberger CP. Native chemical ligation between asparagine and valine: application and limitations for the synthesis of tri-phosphorylated C-terminal tau. *Bioorg. Med. Chem.* 2015; **23**: 2890.
- 35 Blanco-Canosa JB, Dawson PE. An efficient Fmoc-SPPS approach for the generation of thioester peptide precursors for use in native chemical ligation. *Angew. Chem.* 2008; **120**: 6957.
- 36 Schlummer S, Vetter R, Kuder N, Henkel A, Chen YX, Li YM, Kuhlmann J, Waldmann H. Influence of serine O-glycosylation or O-phosphorylation close to the vJun nuclear localisation sequence on nuclear import. *ChemBioChem* 2006; **7**: 88.
- 37 Dullenkopf W, CastroPalomino JC, Manzoni L, Schmidt RR. N-trichloroethoxycarbonyl-glucosamine derivatives as glycosyl donors. *Carbohydr. Res.* 1996; **296**: 135.
- 38 Salvador LA, Elofsson M, Kihlberg J. Preparation of building-blocks for glycopeptide synthesis by glycosylation of Fmoc amino-acids having unprotected carboxyl groups. *Tetrahedron* 1995; **51**: 5643.

## Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.